



HAL
open science

Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha

Thomas Pouthier

► **To cite this version:**

Thomas Pouthier. Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2006. Français. NNT: . tel-00353412

HAL Id: tel-00353412

<https://theses.hal.science/tel-00353412>

Submitted on 15 Jan 2009

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

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

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES
ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par **Thomas POUTHIER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Mise en évidence de cassures double brin de l'ADN induites
par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha**

Thèse soutenue le : 22 décembre 2006

Après avis de :

Mme. Claire Rodriguez-Lafrasse, Professeur
Mme. Geneviève Gourdon, Directeur de Recherche

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

Mme. Anne Flüry-Herard, Docteur
Mme. Claudia Fournier, Docteur
M. Bernard Haas, Directeur de Recherche
M. François Ichas, Directeur de Recherche

Examineurs

M. Philippe Moretto, Professeur
M. Hervé Seznec, Chargé de Recherche

Directeurs de thèse

Mes remerciements s'adressent, en premier lieu, aux membres du jury qui ont eu la gentillesse d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à remercier, Monsieur Bernard Haas, directeur de recherche au CNRS et directeur du CENBG, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour tout l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je remercie très vivement Madame Geneviève Gourdon, directrice de recherche INSERM et Madame Claire Rodriguez-Lafrasse, professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également Madame Anne Flüry-Herard, médecin, chercheur au CEA et Monsieur François Ichas, directeur de recherche INSERM, d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Par ailleurs, je remercie Madame Claudia Fournier, collaborateur scientifique senior du GSI à Darmstadt (Allemagne) d'avoir également accepté d'être examinateur de ce travail et d'avoir fait l'effort de lire ce manuscrit en français.

Qu'ils soient tous assurés de mon estime et de ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent, en second lieu, aux membres du groupe Interface Physique-Biologie du CENBG avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler au cours de ces années de thèse.

Je tiens ainsi à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur Philippe Moretto, professeur à l'Université Bordeaux I. Merci Philippe de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions et pour la confiance que vous m'avez accordée. Je vous remercie non seulement de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir encadré, mais également pour toute la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve au cours de ces trois années, ainsi que pour tout l'enseignement que vous m'avez apporté.

Ce travail est également indissociable de Monsieur Hervé Seznec, chargé de recherche au CNRS et co-directeur de cette thèse. Sa rigueur, sa disponibilité ainsi que ses nombreux conseils, encouragements et son infinie patience m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les besoins d'une démarche scientifique. Ton arrivée a permis à ce sujet de prendre un nouvel essor, et je sais également ce que je te dois dans ma formation.

Travailler avec vous deux a été un réel plaisir et m'a beaucoup apporté, autant sur le plan humain que scientifique.

Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Monsieur Sébastien Incerti, chargé de recherche au CNRS. Merci d'avoir toujours été disponible pour moi et merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, notamment pour la partie microdosimétrie de ce travail.

Merci également à Monsieur Philippe Barberet, maître de conférences à l'Université Bordeaux I, à Monsieur Markus Heiß, ancien post-doctorant, et plus récemment à Monsieur Fredrik Andersson pour la partie technique et physique des irradiations cellulaires et pour avoir contribué à faire des temps de faisceau des moments si particuliers.

A la nouvelle arrivée, Mademoiselle Marina Simon, je te souhaite beaucoup de courage pour les trois années à venir et j'espère que tu éprouveras autant de satisfactions que moi dans ce travail de thèse.

Un grand merci également à Madame Claire Habchi, maître de conférences à l'Université Bordeaux I, Monsieur Etienne Gontier, ancien post-doctorant, Monsieur Duy-Thuy Nguyen, doctorant, sans oublier les stagiaires d'un été, Thomas et Ernest avec lesquels j'ai débuté, mais aussi, Claire, Yann, Julien, Odile, Hoa, Alexia... qui ont donné au groupe IPB une ambiance de travail très agréable. Merci pour votre contribution.

Je tiens à nouveau à remercier Monsieur Bernard Haas, directeur du CENBG, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour tout l'égard qu'il a porté et porte encore à cette thématique.

J'adresse de sincères remerciements à Monsieur Pierre Aguer et ce, à plusieurs titres. Tout d'abord, en tant qu'ancien directeur du CENBG pour avoir débuté les démarches pour l'accueil d'un doctorant biologiste au sein d'un laboratoire de physique nucléaire mais également en tant que membre du groupe Interface Physique-Biologie, pour tout l'intérêt qu'il a porté et qu'il continue de porter à ce travail de thèse.

Je tiens à remercier les services administratifs, instrumentation, AIFIRA, mécanique et le bureau d'étude du laboratoire d'avoir toujours été à l'écoute de mes demandes, et d'avoir toujours répondu à mes attentes. Merci Pascale pour ton aide lors de l'édition de ce manuscrit.

Je dois également souligner la disponibilité du service informatique et les en remercier, en particulier Monsieur Johnny Pinson pour son aide, et ce, même à des centaines de kilomètres de distance.

Enfin, je tiens à élargir ces remerciements à l'ensemble du personnel du CENBG pour avoir fait de ce laboratoire un lieu de travail privilégié. Trop nombreux pour être cités nommément, que chacun trouve ici l'expression de ma sympathie.

Ce travail a également bénéficié d'aides extérieures, aides sans lesquelles il aurait été difficile d'obtenir une telle vue d'ensemble. Mes remerciements s'adressent donc aux membres des équipes qui ont collaboré à ce travail.

Je remercie très chaleureusement Francesca et François Ichas : merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire et merci pour vos précieux conseils. Que toute votre équipe trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour leur sympathie et leur accueil chaleureux et en particulier Madame Francesca Ichas, Madame Renée Dalibart et Madame Anne-Marie Vacher pour toute l'aide technique et les conseils que vous m'avez apportés.

Je remercie également Madame Cristel Pujol pour sa collaboration au développement de la méthode quantitative de comptage des foci γ -H2A.X et Monsieur Philippe Legros pour avoir fait des heures de microscopie confocale des moments d'échanges très enrichissants.

Merci également à Madame Stéphanie Durrieu pour son aide et sa disponibilité pour le tri des clones transfectés.

Enfin, je remercie Monsieur Jean Louis Lefaix et Madame Nathalie Gault, du département de Radiobiologie et Radiopathologie du CEA de Fontenay aux Roses pour leur aide dans la mise en place de toute la partie biologie de ce projet.

J'adresse mes plus vifs remerciements à la COGEMA et plus particulièrement à Madame Inès de Laguerrie, Monsieur Jean-Louis Nigon et Monsieur Benoît Quesne pour le soutien financier apporté à ce projet.

Mes remerciements vont aussi aux membres du laboratoire CNAB qui ont été des interlocuteurs privilégiés tout au long de cette thèse. Je remercie ainsi tout particulièrement Monsieur Richard Ortega, Monsieur Guillaume Devès et Monsieur Stéphane Roudeau.

Je n'oublie pas mes complices, Thomas Bacquart et Aurélien Fraysse, avec qui j'ai partagé d'agréables moments au sein du laboratoire. Je vous souhaite beaucoup de courage pour la rédaction qui arrive.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu et épaulé. C'est en partie grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui.

Comme j'ai beaucoup de mal à trouver les mots justes pour te remercier comme tu le mérites, j'irai au plus simple : par conséquent, et tout simplement, merci beaucoup Virginie.

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AIEA	: Agence Internationale de l'Energie Atomique
AIFIRA	: Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine
ARN	: Acide Ribonucléique
Bq	: Becquerel
Cat. No.	: Référence catalogue
CDB	: Cassures double brin
CENBG	: Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan
CICR	: Centre International de Recherche sur le Cancer
CIPR	: Commission Internationale de Protection Radiologique
CSB	: Cassures simple brin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EBR	: Efficacité Biologique Relative
EDTA	: Acide éthylène diamine tétracétique disodique
EPA	: Environmental Protection Agency
ESA	: Agence Spatiale Européenne
eV	: Electron Volt
FACs	: Fluorescence - activated cell sorter
Geant4	: GEometry ANd Tracking
GFP	: Green Fluorescent Protein
GSI	: Gesellschaft für Schwerionenforschung Institute
Gy	: Gray
HR	: Recombinaison Homologue
HVEE	: High Voltage Engineering Europa
ICRP	: Commission Internationale de Protection Radiologique
IECB	: Institut Européen de Chimie et de Biologie
IL-8	: Interleukine-8
INFN	: Istituto Nazionale di Fisica Nucleare
IRSN	: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
IRSN	: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
JAERI	: Japan Atomic Energy Research Institute
LB	: Lysogeny Broth (bouillon de culture) et par extension Luria Bertani
LCS	: Leica Confocal Software
LMDS	: Locally multiply damages sites
LSS	: Life Span Study
NHEJ	: « <i>Non Homologous End Joining</i> » ou recombinaison non homologue

pb	: Paires de bases
PBS	: Phosphate buffered Saline
PFGE	: Pulse Field Gel Electrophoresis ou électrophorèse en champ pulsé
PICIN	: Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'Institut des Neurosciences – Univ. Bordeaux II
PIXE	: Particle Induced X-ray Emission
PNSE	: Plan National Santé-Environnement
RARAF	: Radiological Research Accelerator Facility
RBS	: Rutherford Backscattering Spectrometry
RLSS	: Relation linéaire sans seuil
SFM	: <i>Serum-Free Keratinocyte Medium for the Culture of Human Keratinocytes</i>
SGSE	: Single Cell Gel Electrophoresis Assay
SNAKE	: Superconducting Nanoscope for Applied Nuclear-Kern- physics Experiments
STIM	: Scanning Transmission Ion Microscopy
Sv	: Sievert
TLE	: Transfert Linéaire d'Energie
TMRM	: Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester
UNSCEAR	: United Nations Scientific Committee on Effects of Atomic Radiation
UV	: Ultraviolet
Δm	: Potentiel transmembranaire mitochondrial

Remerciements	3
Listes des abréviations	7
<i>Introduction</i>	15
<i>Chapitre I : Les rayonnements ionisants</i>	
1. Les rayonnements ionisants	23
2. La notion de dose en radiobiologie – quelques définitions	24
a. Le Transfert Linéaire d'Energie ou TLE	25
b. La dose absorbée	26
c. L'Efficacité Biologique Relative ou EBR	26
d. Dose équivalente et dose efficace	27
3. Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant	29
a. Généralités	29
b. Les lésions de l'ADN	31
c. Les conséquences des rayonnements	36
4. Les sources d'expositions aux rayonnements ionisants	36
a. Sources d'irradiation naturelles	37
b. Sources d'irradiation médicales	40
c. Autres sources	40
d. L'observation des risques induits et les problèmes posés	42
5. Rayonnements ionisants et radioprotection	45
6. Conclusion	47

Chapitre II : Rayonnements ionisants, faibles doses : contexte et état de l'art

1. La problématique des faibles doses	53
2. Les faibles doses et les modèles proposés	54
3. L'apport des microfaisceaux en radiobiologie	59
4. Les différents dispositifs en fonctionnement	63
5. Mise en évidence des dommages ADN par des marqueurs moléculaires	65
a. La protéine histone H2A.X	65
b. Quantification des foci γ -H2A.X	71
6. La microdosimétrie pour l'irradiation cellulaire	71
a. La microdosimétrie à l'échelle cellulaire	72
b. La microdosimétrie Monte Carlo pour l'irradiation cellulaire	73

Chapitre III : Dispositif expérimental : le microfaisceau du CENBG

1. La ligne microfaisceau du CENBG	79
a. Généralités	79
b. Les accélérateurs	81
c. La ligne microfaisceau	83
d. La ligne microfaisceau en mode irradiation	85
2. L'application μrad	87
a. Acquisition de la mosaïque	88
b. Traitement des images et irradiation	88
3. Les puits de culture	88

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1. Lignées cellulaires d'intérêt	95
a. Les lignées de kératinocytes humains	95
b. Les conditions de culture	97
c. Transfection	98
d. Caractérisation de la lignée HaCaT/[H2B-GFP]Tg	100
2. Les conditions d'irradiation	102
a. Préparation du puits d'irradiation et culture cellulaire	102
b. Conditions de culture sous microfaisceau	103
c. Procédure d'irradiation cellule par cellule	103
d. Conditions de culture post-irradiation	105
3. Imagerie et microscopie en épifluorescence	105
a. Définition des compartiments subcellulaires et identification des dommages cellulaires radio-induits	105
b. Microscopie confocale et imagerie cellulaire haute résolution en 3D	107
c. Microscopie confocale et analyse numérique qualitative des cassures double brin de l'ADN	107
d. Microscopie confocale et analyse numérique quantitative des cassures double brin de l'ADN	108
4. Imagerie cellulaire, microscopie ionique et cartographie chimique élémentaire	108
a. Préparation des échantillons	109
b. Analyses PIXE et RBS	109

**Chapitre V : Génération dose-dépendante de cassures double brin de l'ADN.
Cinétique de phosphorylation de l'histone H2A.X**

1. Validation des puits de culture	115
2. L'obtention et la caractérisation de la population de kératinocytes humains transgéniques HaCaT/[H2B-GFP]Tg	117
3. Définition des conditions optimales d'irradiation cellulaire sous microfaisceau	122
a. Microdosimétrie et comparaison des conditions d'étude 4-24h	122
b. Simulation - microdosimétrie cellulaire	127
4. Validation expérimentale sur matériel biologique de la ligne d'irradiation du CENBG	130
a. Mise en évidence des cassures double brin de l'ADN induits sous microfaisceau d'alpha	132
b. Distribution nucléaire périphérique des cassures double brin « radio-induites » de l'ADN.	133
c. Distribution des cassures double brin « radio-induites » de l'ADN sous forme de « clusters »	134
d. Analyse quantitative des cassures double brin « radio-induites » de l'ADN. Vers la définition d'une relation dose-effet en fonction du temps.	135
e. Apoptose et Micronoyaux	139
 Conclusion générale - Discussion	 143
 Index des figures	 157
Index des tableaux	158
Références bibliographiques	163

Peu de temps après la découverte des rayons X par William Röntgen en décembre 1895 et de la radioactivité par Henri Becquerel en mars 1896, les premières observations médicales alertaient les expérimentateurs de la prudence avec laquelle il convenait de faire usage de ces rayons. Les premières manifestations de l'action des rayonnements ionisants sur les tissus vivants furent des lésions cutanées et des chutes de cheveux. Pierre Curie, qui avait, avec son épouse Marie Curie, isolé le polonium et le radium en 1898, expérimenta sur lui-même les effets du radium, faisant ainsi apparaître une lésion dont il décrit la morphologie et l'évolution.

Quelques années plus tard, avec la vulgarisation de la radioscopie, des radionécroses nécessitant l'amputation des extrémités, furent observées. Plus sournoisement, sont apparus les effets génétiques et les cancers. Le premier cancer de la peau radio-induit fut décrit en 1902. Nul n'ignore que Marie Curie et, 22 ans plus tard sa fille Irène Joliot-Curie, sont décédées des suites d'une leucémie dont la cause est probablement liée aux radionucléides qu'elles manipulaient sans grande précaution, à une époque où on en ignorait encore tous les dangers.

De nos jours, l'interaction des rayonnements ionisants avec le milieu vivant joue un rôle prépondérant dans de très nombreux domaines, que ce soit dans la définition des risques associés aux expositions à de faibles doses de rayonnements ionisants issus de l'environnement naturel ou professionnel, de l'oncogénèse ou encore des nouvelles thérapies anticancéreuses.

Comprendre comment agissent les rayonnements ionisants sur la matière vivante, notamment lors de l'exposition à de faibles doses telles que celles que l'on peut trouver dans un environnement industriel ou dans la nature, reste un enjeu majeur pour l'évaluation du risque associé. Le rapport de la Commission d'orientation sur le cancer (janvier 2003) estime de 4 à 8,5% la proportion des cancers d'origine professionnelle. Amiante, benzène, poussières de bois et rayonnements ionisants couvrent, à eux seuls, 98% des cancers d'origine professionnelle avérée. Selon l'Institut de Veille Sanitaire, la fraction attribuable aux cancers professionnels est sous-estimée : seulement 10% des cancers professionnels seraient reconnus. Par ailleurs, le même institut estime de 5 à 10% le pourcentage de cancers pouvant être attribués à l'environnement. Selon les différentes estimations, la part effective de l'environnement dans la survenue des cancers est très variable, et dépend principalement de la définition que l'on donne aux facteurs environnementaux.

Généralement, le terme « environnement » recouvre les agents chimiques (pesticides, dioxine), les agents biologiques (infections virales, bactériennes) et les agents physiques (les rayonnements ultra-violet et les rayonnements ionisants, dont le gaz radon). L'exposition à ces agents s'opère au travers des différents milieux de vie : environnements intérieurs, extérieurs, professionnels. Selon les données de l'UNSCEAR (United Nations Scientific

Committee on Effects of Atomic Radiation) et de l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) publiées respectivement en 1993 et 2005, l'exposition aux rayonnements ionisants naturels représenterait la seconde source de radiation, après les sources d'origine médicale (radiologies, mammographies, radiothérapies,...). En France, l'exposition naturelle individuelle moyenne approche les 2,5 mSv/an, chiffre auquel il faut rajouter près de 1,5 mSv annuel pour les expositions médicales radiologiques. Bien évidemment, l'exposition est très variable en fonction des régions, de la nature des sols et de leur richesse en radioéléments naturels (radon émanant des roches granitiques...), et de l'altitude (rayonnements cosmiques)... Le radon est un gaz radioactif d'origine naturelle. Il provient de la désintégration de l'uranium et du radium présents dans la croûte terrestre. Présent partout à la surface de la planète, le radon provient essentiellement des sous-sols granitiques et volcaniques ainsi que de certains matériaux de construction. Sur une partie du territoire, la population serait donc soumise à des doses 10 fois supérieures à la moyenne nationale (c'est le cas de l'Auvergne par exemple). Une étude réalisée par l'Académie Américaine des Sciences sur les effets sur la santé d'une exposition environnementale aux radioéléments descendant du radon (National Research Council, 1998) a montré qu'environ 15% de la mortalité par cancer du poumon sur le territoire américain serait due à l'exposition au radon, soit près de 20 000 décès chaque année. Ces données épidémiologiques sur l'exposition professionnelle de mineurs d'uranium montrent une relation très étroite entre l'exposition au radon dans la vie courante et la santé humaine et notamment l'apparition de cancers.

La dose admissible pour le grand public pour toute exposition couverte par une surveillance réglementaire est de 1 mSv/an. L'exposition aux rayonnements ionisants à laquelle tout individu est soumis au cours de son existence est relativement variable, cette variabilité dépendant en grande partie des taux d'exposition naturelle. Cependant, les recommandations de la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) sont pour l'instant basées sur des études et des principes non spécifiques à ce type de rayonnement. Ainsi, l'étude épidémiologique la plus connue et la plus utilisée reste celle de la cohorte LSS (Life Span Study) qui concerne le suivi de l'augmentation des taux de leucémies et de tumeurs solides des quelques 120 300 survivants aux attaques nucléaires de Hiroshima et Nagasaki. Il ressort de cette étude une corrélation entre l'excès relatif de risque d'apparition d'un cancer et la dose. Pour les leucémies, apparues très rapidement après les explosions, cette relation est de type quadratique, alors qu'elle est de type linéaire pour les tumeurs de type solide, apparues sur le long terme. Mais, quel que soit le type de relation, des fluctuations statistiques pour des doses inférieures à 200 mSv interdisent toute validation de l'extrapolation de ces résultats pour les faibles doses.

Malgré tout, la gestion des risques induits par l'effet des faibles doses repose aujourd'hui en grande partie sur ces extrapolations. L'extrapolation des fortes aux faibles doses pose

également un problème car les effets de phénomènes biologiques masqués à fortes doses peuvent devenir prépondérants à plus faibles doses. Ainsi, on parle de plus en plus de la possibilité d'un effet de proximité (ou « bystander ») ou encore des phénomènes de réponse adaptative ou de radio-résistance / radio-sensibilité. Il existe, par conséquent, un réel besoin de données expérimentales fiables concernant l'effet biologique de ces faibles doses de rayonnements ionisants.

La nécessité d'améliorer les connaissances sur les risques de cancérogenèses professionnels et environnementaux est inscrite dans le Plan Cancer (mesures 13 et 14). Cet objectif est également repris dans le Plan National Santé-Environnement (PNSE), qui prévoit de renforcer l'évaluation des risques sanitaires liés aux contaminants environnementaux (y compris en milieu professionnel) ainsi que les connaissances scientifiques des effets de l'environnement sur la santé humaine.

Les données statistiques et épidémiologiques actuellement disponibles en France ne permettent pas de répondre efficacement à ce problème de société car il demeure difficile d'évaluer précisément le risque d'une population exposée à différents agents cancérogènes, et ce pour plusieurs raisons : **(i)** la connaissance des expositions professionnelles est encore très incomplète en France ; **(ii)** le degré d'exposition provoquant une augmentation du risque de cancer reste mal connu ; **(iii)** ces expositions à de faibles doses sont très difficiles à reproduire en laboratoire selon les procédures classiquement utilisées. La méthodologie habituelle, basée sur l'irradiation aléatoire à faible fluence de monocouches cellulaires adhérentes, consiste à déterminer le nombre moyen de particules ayant interagi avec la cellule, et repose ainsi sur des lois de distribution statistique. La faible probabilité d'obtenir une irradiation d'une cellule unique par une particule unique est ainsi difficilement reproduite à cause des fluctuations statistiques. A titre d'exemple, lors d'expositions domestiques à des émetteurs α , la probabilité pour qu'au cours de toute une vie, une cellule d'un individu soit traversée par plus d'une particule est extrêmement faible. Ces conditions sont très difficiles à reproduire *in vitro* par irradiation aléatoire sur des modèles biologiques. Les inévitables impacts multiples, la variété de cibles intracellulaires touchées (noyau ou cytoplasme), les effets indirects induits par les impacts sur les cellules voisines ou simplement extracellulaires sont autant de phénomènes qui compliquent sérieusement l'interprétation des données.

Il était donc nécessaire de développer un outil qui permette de procéder à des irradiations ciblées (cellule par cellule) et contrôlées (ion par ion), tout en maîtrisant parfaitement le nombre de particules délivrées (jusqu'à un ion par cellule), avec une précision de l'ordre de quelques micromètres. Par leur conception, les microfaisceaux d'ions présentent une résolution spatiale de quelques micromètres, inférieure à la taille d'une cellule. Il n'existe actuellement dans le monde que trois dispositifs d'irradiation de ce type avec une production scientifique avérée : Université Columbia, New York, USA ; Gray Laboratory

Cancer Research Trust, UK et Texas A&M University, College Station, USA. Plusieurs dispositifs sont en construction, ou viennent d'être construits, en Europe : GSI (Darmstadt, Allemagne), LIPSION (Leipzig, Allemagne) et le dispositif du Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG). Dans le cadre d'un programme de recherches interdisciplinaires basé sur l'utilisation de microfaisceaux d'ions (programme AIFIRA), le CENBG s'est récemment doté d'un nouvel accélérateur électrostatique (3.5 MV HVEE Singletron) délivrant des faisceaux d'ions de faible énergie (quelques MeV). Ce dispositif expérimental de dernière génération présente des caractéristiques qui autorisent la production de faisceaux d'ions focalisés extrêmement stables.

Le développement de notre ligne d'irradiation s'est appuyé sur la microsonde nucléaire existante ; tout le challenge consistant à contrôler le faisceau en mode ion par ion tout en gardant une résolution spatiale de quelques micromètres après extraction de ce faisceau à l'air. Le début de cette thèse a coïncidé avec les premières irradiations en conditions réelles. Ce programme de recherche propose une stratégie expérimentale basée sur l'utilisation conjointe des technologies des faisceaux d'ions, de biologie moléculaire, de microscopie confocale et de microdosimétrie par simulation Monte Carlo (Geant4). L'ensemble du programme est basé sur l'étude des effets biologiques induits en réponse à de faibles doses de rayonnements ionisants à l'échelle de la cellule unique.

Le travail effectué au cours de cette thèse s'est articulé autour de quatre axes principaux : **(i)** le développement et la validation des conditions expérimentales relatives à l'irradiation cellulaire sous microfaisceau d'ions ; **(ii)** le développement et la caractérisation de modèles cellulaires utilisant les techniques de marquage sub-cellulaire ; **(iii)** le développement de méthodes d'analyse quantitative aux échelles moléculaire et cellulaire de marqueurs des voies métaboliques spécifiques induites en réponse à des dommages radio-induits (la réparation de cassures double brin de l'ADN, l'apoptose) ; **(iv)** la détermination des caractéristiques géométriques des diverses lignées cellulaires développées en relation avec la microdosimétrie Monte-Carlo afin de quantifier la dose déposée à l'échelle de la cellule unique.

Ainsi, notre travail a consisté à déterminer : **(i)** la nature et la quantité (en fonction de la dose incidente) des dommages d'ADN (cassures double brin) produits par de faibles doses de particules α ; **(ii)** les processus moléculaires précoces induits en réponse à ces doses ; **(iii)** la capacité des cellules endommagées à reconnaître et à réparer des dommages radio-induits ; **(iv)** si un seuil existe pour les faibles doses d'exposition ; **(v)** la présence d'un effet de proximité (ou « bystander »), c'est-à-dire déterminer la capacité des cellules avoisinantes non-irradiées à induire des voies métaboliques spécifiques ; **(vi)** une microdosimétrie précise et reproductible au niveau cellulaire dans nos conditions d'irradiation (par rapport au type de cellule, au nombre et à l'énergie des particules, à la cible sub-cellulaire...).

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous commencerons par la problématique liée à l'étude des faibles doses d'irradiation en abordant l'origine de ces rayonnements, les effets biologiques induits ainsi que leur implication dans l'apparition des cancers et enfin la notion de dose. Le contexte international, l'état actuel des connaissances concernant les expositions à des faibles doses de rayonnements ionisants sur le vivant ainsi que l'apport des microfaisceaux dans ce type d'étude seront décrits dans le chapitre 2. La description du dispositif expérimental nécessaire à l'irradiation cellulaire sera ensuite présentée dans le chapitre 3. Le chapitre 4 sera consacré à l'ensemble des développements méthodologiques et des travaux expérimentaux réalisés au cours de ces trois années de thèse. Enfin, le dernier chapitre regroupera les résultats obtenus lors des irradiations microfaisceau sur cellules vivantes, et traitera de la validation sur matériel biologique de la ligne microfaisceau, des premières observations des effets des irradiations sur le métabolisme des cassures double brin de l'ADN, et enfin de la microdosimétrie associée à nos conditions expérimentales.

Chapitre I

Les rayonnements ionisants

1. Les rayonnements ionisants

Lorsqu'il pénètre dans la matière vivante, un rayonnement ionisant peut interagir avec les atomes ou les molécules selon une suite d'évènements. Il est possible de schématiser cette suite d'évènements par quatre étapes. Au cours de la première, très courte (10^{-15} s) et qualifiée de « physique », l'énergie d'incidence est transférée au milieu par une suite d'évènements primaires plus ou moins nombreux en fonction du type de rayonnement. Pour des particules chargées, si l'on excepte les interactions avec les noyaux, somme toute assez rares, ce transfert est en général progressif et sa nature dépend du domaine d'énergie mis en jeu. Il se fait, par exemple par interaction coulombienne avec les nombreux électrons du milieu le long du parcours des particules (ce qui mène à l'ionisation ou l'excitation des cortèges électroniques) ou bien par émission de rayonnement électromagnétique (rayonnement de freinage par exemple). Pour les photons (X ou γ), l'atténuation se fait généralement par transfert de l'énergie vers les électrons du milieu qui se comportent ensuite comme des particules chargées « secondaires » dont le comportement ultérieur est décrit plus haut. Là aussi, et en fonction de l'énergie d'incidence, le transfert peut être progressif (diffusion Compton) ou limité à une seule interaction (effet photoélectrique ou création de paires). Pour les particules neutres, comme les neutrons qui n'interagissent qu'au cours de processus nucléaires, la perte d'énergie peut encore être soit progressive (diffusions élastiques multiples) et mener à la « modération », soit plus brutale (processus inélastiques tels que la capture par un noyau du milieu ou un autre type de réaction nucléaire...). Ici aussi, le recul des noyaux cible, chargés par définition, va générer un dépôt d'énergie selon le scénario décrit plus haut. Cette liste des interactions possibles n'est pas exhaustive et ne tient pas compte, par exemple, des innombrables photons émis au cours des désexcitations atomiques qui peuvent eux aussi générer des événements en cascade.

Ces nombreux évènements secondaires se terminent lors d'une phase « Physico-chimique » (entre 10^{-15} s et 10^{-12} s après impact) au cours de laquelle les photons et les particules sont thermalisés. Les multiples ionisations mènent à la destruction des liaisons chimiques et à la production d'espèces chimiques très réactives (radicaux oxygénés par exemple) suite à la radiolyse du milieu.

Jusqu'à 10^{-6} s après impact, va se développer une phase dite de « chimie pure » au cours de laquelle, les espèces radicalaires créées vont diffuser dans le milieu et dégrader les molécules biologiques à leur portée. Ce n'est qu'après toute cette suite d'évènements que va se produire une phase « biologique » que l'on peut scinder en réponses précoce et tardive.

D'une manière générale, un rayonnement est défini comme ionisant lorsqu'il « porte » une énergie suffisante pour générer une ionisation. Formellement, l'énergie seuil peut être fixée à 13,6 eV, énergie d'ionisation de l'atome d'hydrogène. Donc, de ce fait, il est exclu l'ensemble des photons UV, visibles ou infra-rouges en plus des rayonnements électromagnétiques de type micro-onde issus de fours ou de téléphones portables.

En matière de protection, les rayonnements ionisants sont classés en quatre catégories, selon les types d'interactions avec le milieu (Galle & Paulin, 1992) :

(i) les particules chargées lourdes, essentiellement protons, alphas (α) et produits de fission qui interagissent par interaction coulombienne ou nucléaire. Ces rayonnements, en général mono-énergétiques, sont peu pénétrants mais peuvent déposer une énergie considérable le long de leur faible parcours. Ils sont de ce fait très ionisants. Leur parcours est également faible dans l'air.

(ii) les particules chargées légères comme les électrons (e^- , e^+) qui interagissent essentiellement par interaction coulombienne. Issue de la radioactivité naturelle ou artificielle (émission bêta (β^- , β^+) ou capture électronique), leur énergie est limitée à quelques centaines de keV et leur parcours est assez faible dans les tissus (inférieur au millimètre). Lorsqu'elles sont produites par des accélérateurs (thérapie anticancéreuse) à des énergies de plusieurs dizaines de MeV, elles peuvent traverser des épaisseurs de tissu plus importantes (quelques centimètres).

(iii) les photons X ou gamma (γ) qui ont un pouvoir ionisant plus faible et interagissent principalement avec les cortèges électroniques par effet photoélectrique, diffusion cohérente, diffusion Compton et création de paires. Les photons, en fonction de leur énergie, peuvent parfois traverser le corps humain sans interagir et peuvent parcourir des kilomètres dans l'air. Leur parcours moyen est moins bien défini que celui des particules chargées. Les écrans qui permettent de s'en prémunir doivent être composés d'éléments lourds (plomb par exemple).

(iv) les neutrons qui interagissent uniquement par interaction avec les noyaux des atomes puisqu'ils ne portent aucune charge électrique. De ce fait, ils peuvent traverser des épaisseurs importantes de matière (plusieurs mètres de béton pour des neutrons rapides de 20 MeV). Ils peuvent être modérés et thermalisés par des écrans riches en hydrogène (polymères, eau) et absorbés par des écrans en bore ou cadmium.

2. La notion de dose en radiobiologie – quelques définitions

La quantification des doses de rayonnements ionisants pouvant induire des dommages au matériel biologique fait appel à une série de grandeurs dont les définitions vont être rappelées dans les paragraphes qui suivent.

a. Le Transfert Linéaire d'Énergie ou TLE

Depuis 1962, la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP), définit « le Transfert Linéaire d'Énergie (TLE) d'une particule ou d'un photon dans un milieu comme le rapport dE/dl représentant l'énergie moyenne transférée localement au milieu par unité de longueur par cette particule ou ce photon le long de leur parcours » (Hall, 2000a). Les physiciens parlent plutôt de pouvoir d'arrêt. L'unité la plus couramment utilisée est le keV/ μm . Pour un type de particule donné, le TLE varie avec l'énergie. Une bonne connaissance de ce TLE permet de calculer précisément la perte d'énergie le long de la trace d'une particule ionisante. La perte locale d'énergie pouvant être reliée à la densité d'ionisation le long de la trace, ce paramètre joue un rôle primordial pour caractériser et parfois prédire la relation entre la dose reçue et les effets biologiques induits par les rayonnements ionisants.

On distingue en général les rayonnements de faible et de haut TLE. La nature des lésions induites, surtout par effet direct au niveau de l'ADN, dépend étroitement de la valeur de ce TLE. Ainsi, les rayonnements à TLE élevé (neutrons, particules α ou ions lourds) induisent surtout, sur quelques dizaines de paires de bases au niveau de l'ADN un ensemble de lésions multiples de différents types, en « grappes » ou clusters (LMDS pour *locally multiply damages sites*) difficilement réparables (Mustonen *et al.* 1999, Goodhead 1999, Blakely & Kronenberg, 1998). Ces clusters ou LMDS sont plus nombreux et plus complexes après une exposition à des rayonnements de TLE élevé qu'après une exposition à des rayonnements de faible TLE (photons, électrons et ondes électromagnétiques X et γ) du fait de l'importance de l'énergie déposée le long de la trace de la particule de fort TLE. La compréhension de ce phénomène se résume pour l'instant à l'induction des dommages, et, la complexité des voies de signalisation inhérentes à ces dommages rend difficile cette investigation.

Ce sont principalement les particules α qui seront considérées dans les travaux rapportés dans ce mémoire. Elles constituent un rayonnement de TLE élevé (plus de 100 keV/ μm aux énergies des faisceaux utilisés dans cette étude). Les parcours dans l'eau sont alors inférieurs à une dizaine de micromètres. La perte d'énergie se faisant principalement par collision avec les électrons du milieu, le rapport des masses particule-électron largement en faveur des alphas induit une cinématique qui favorise la diffusion aux petits angles. La trajectoire de ces particules est donc quasi linéaire jusqu'à l'arrêt de la particule.

En dehors de son intérêt dans la classification des rayonnements ionisants, le TLE est une donnée physique qui permet de calculer le dépôt d'énergie total le long de la trace de la particule. Mais pour caractériser complètement une exposition, il faut faire appel à d'autres concepts, tels que la dose absorbée, l'efficacité biologique relative ou encore les doses équivalente et efficace. Ces grandeurs sont universellement employées aujourd'hui dans le monde médical comme dans le monde industriel où certains secteurs d'activités nécessitent un suivi radiologique de leurs travailleurs exposés (IRSN, 2006).

b. La dose absorbée

La dose absorbée par un milieu, lorsqu'il est exposé à des rayonnements, correspond à la quantité d'énergie déposée par unité de masse. Cette dose essentiellement « physique » s'exprime en Gray (1 Gy = 1 joule/kg). Cette dose absorbée fut introduite dans l'histoire de la radioprotection et de la médecine nucléaire dès 1920 par les physiciens qui étaient déjà capables d'estimer les énergies déposées par les rayonnements provenant de leurs sources ou appareils. Ils ont introduit le « rad » comme première unité de dose absorbée. Cette unité est aujourd'hui remplacée par le gray qui équivaut à 100 rad. Les appareils délivrent à un organe des doses de l'ordre du gray en radiothérapie ou du milligray en radiodiagnostic.

Cependant, à dose « physique » égale déposée par différents types de rayonnements dans des milieux vivants, l'effet biologique peut être différent selon le rayonnement considéré. Ainsi une dose de 1 Gy déposée par des particules α induit plus de « dégâts » qu'une dose équivalente déposée par des photons X (Cherry, 2000 ; Masse, 2001).

c. L'Efficacité Biologique Relative ou EBR

Les informations fournies par la dose absorbée ne permettant pas d'appréhender les effets biologiques d'un type de rayonnement donné, il est nécessaire d'introduire un facteur de pondération dépendant du rayonnement considéré et spécifique du tissu exposé. L'Efficacité Biologique Relative ou EBR, issue de résultats expérimentaux, permet la comparaison de divers types de rayonnements. Cette efficacité s'exprime par rapport à une dose de référence : celle qui résulte d'une exposition à des photons X produits par un tube à rayons X d'une tension de 200 kV (Scholz, 2003).

L'EBR est alors donné par le rapport de la dose absorbée du rayonnement de référence (DR) sur la dose absorbée du rayonnement considéré (D) nécessaire pour obtenir un effet biologique équivalent :

$$EBR = \frac{DR}{D}$$

L'EBR est donc une grandeur radiobiologique permettant de relier une dose déposée à un effet biologique et l'ensemble des EBR obtenues expérimentalement permet de proposer un facteur de pondération pour chaque type de rayonnements.

Ce facteur de pondération est fonction de nombreux paramètres. Il est ainsi dose dépendant, puisque la valeur observée pour un type de rayonnement donné varie en

fonction de la dose avec une baisse de cette valeur en fonction de la dose. Pour les particules chargées, il dépend non seulement du type de particule mais également de son énergie.

Enfin, les caractéristiques biologiques du type cellulaire considéré, en particulier son fond génétique, jouent un rôle non négligeable lors de la mesure de cet EBR et en font ainsi un paramètre difficilement utilisable en pratique car non transposable. L'EBR est malgré tout utilisée en clinique dans les plans de traitement pour la radiothérapie lors du traitement d'une tumeur. Pour qu'un traitement soit efficace, il faut un effet différentiel : à dose égale, l'effet biologique doit être plus élevé sur les cellules tumorales que sur les cellules saines du fait de la non sélectivité des rayonnements ionisants vis-à-vis des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. La connaissance de l'EBR des tissus sains comme des tissus tumoraux permet d'évaluer l'avantage clinique de l'utilisation de tel ou tel type de rayonnement (Scholz, 2003).

d. Dose équivalente et dose efficace

L'efficacité biologique relative reste un paramètre complexe, difficilement utilisable pour la définition des doses limites utilisées en radioprotection. Dans les années 1950, des irradiations en photons et de neutrons, ont montré qu'un « gray » de neutrons était environ dix fois plus cancérigène qu'un « gray » de photons.

Pour la même dose physique, ceci conduisit à multiplier par 10 la dose finalement considérée dans le cas des neutrons et à l'appeler « dose équivalente ». Cette valeur est très utilisée pour l'évaluation du risque tardif généré par les rayonnements mais n'est pas adaptée à l'étude des effets précoces des rayonnements.

Un facteur de pondération dépendant du type de rayonnement, et parfois de l'énergie, a alors été introduit. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 1 (page 28). La dose équivalente, qui s'exprime en sievert (Sv), est obtenue en multipliant la dose absorbée par ce facteur. Les facteurs de pondération des différents types de rayonnements ionisants sont définis par la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) à partir de valeurs expérimentales de l'EBR concernant des effets biologiques spécifiques pertinents pour la radioprotection (tels que l'induction de cancers à faibles doses par exemple).

Type de rayonnement et énergie	Facteur de pondération
Photons, toutes énergies	1
Electrons et muons, toutes énergies	1
Neutrons	
<10 keV	5
de 10 keV à 100 keV	10
de 100 keV à 2 MeV	20
de 2 MeV à 20 MeV	10
> 20 Me V	5
Protons (autres que les protons de recul) d'énergie > 2MeV, particules α , fragments de fission, ions lourds	20

Tableau 1 : *Facteurs de pondération des différents types de rayonnements en fonction de leurs énergies selon l'ICRP (1991).*

Tissu ou Organe	Facteur de pondération tissulaire
Gonade	0.20
Moelle	0.12
Colon	0.12
Poumon	0.12
Estomac	0.12
Vessie	0.05
Sein	0.05
Foie	0.05
Œsophage	0.05
Thyroïde	0.05
Peau	0.01
Os	0.01
Reste	0.05

Tableau 2 : *Facteurs de pondération correspondant aux différents types de tissus selon l'arrêté du 1^{er} septembre 2003 définissant les modalités de calcul des doses efficaces et des doses équivalentes résultant de l'exposition des personnes aux rayonnements ionisants, publié au journal officiel le 13 novembre 2003. La somme de tous ces facteurs est égale à 1. Les valeurs du facteur de pondération tissulaire ont été déterminées à partir d'une population de référence comprenant un nombre égal de personnes des deux sexes et représentant un large éventail d'âges. Dans la détermination de la dose efficace, elles s'appliquent aux travailleurs et à la population dans son ensemble, indépendamment du sexe.*

Dans le domaine des radiodiagnostic, pour lequel ne sont seulement utilisés que des rayonnements β ou γ , les facteurs de pondération sont égaux à 1. La dose absorbée par un organe et la dose équivalente sont numériquement égales, il n'y a que l'unité qui change.

On peut alors aussi bien parler de sieverts que de grays. La règle est cependant d'utiliser la dose équivalente et de parler de sieverts.

Pour une dose équivalente donnée, la sensibilité du matériel vivant aux rayonnements varie également de manière tissu spécifique. Afin de prendre en compte ce phénomène, l'ICRP a introduit la notion de facteur de pondération tissulaire (tableau 2 page 28). Ce facteur représente la contribution relative de chaque tissu et/ou organe à l'effet biologique total induit par une irradiation uniforme du corps entier. Le produit de la dose équivalente par ce facteur donne accès à la dose efficace, également exprimée en Sv. Cette dose efficace est utilisée pour la définition et la gestion des normes de radioprotection, afin d'évaluer l'exposition des individus alors que la dose équivalente est plutôt utilisée en médecine. La dose efficace permet donc d'estimer le dommage subi par l'organisme en fonction de l'endroit où les doses sont absorbées et ce, en tenant compte des sensibilités aux rayonnements qui varient beaucoup d'un tissu à l'autre. La dose efficace est obtenue par une somme pondérée des doses équivalentes de tous les tissus et organes. Les facteurs de pondération sont calculés de façon à ce que dans le cas particulier d'une irradiation uniforme par des photons γ , la dose efficace en sieverts soit équivalente à la dose absorbée en gray. La dose efficace présente l'avantage de globaliser les dommages et de pouvoir comparer des expositions correspondant à différents types d'irradiations (ICRP, 1991).

3. Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant

a. Généralités

A chaque instant, le vivant est soumis à un univers dans lequel la radioactivité est omniprésente. Il convient donc de s'interroger sur les conséquences des interactions entre les rayonnements ionisants et la matière biologique.

Les effets induits par les rayonnements dépendent principalement de leur nature. Les rayonnements ayant la capacité de parcourir de longs trajets dans la matière sont particulièrement dangereux en cas d'expositions externes.

Dans le cas d'expositions internes, le faible pouvoir de pénétration (40 μm dans l'eau ou les tissus biologiques) combiné à la forte énergie (4 à 5 MeV), cédée sur de petits parcours, font des particules α , l'un des rayonnements les plus dangereux.

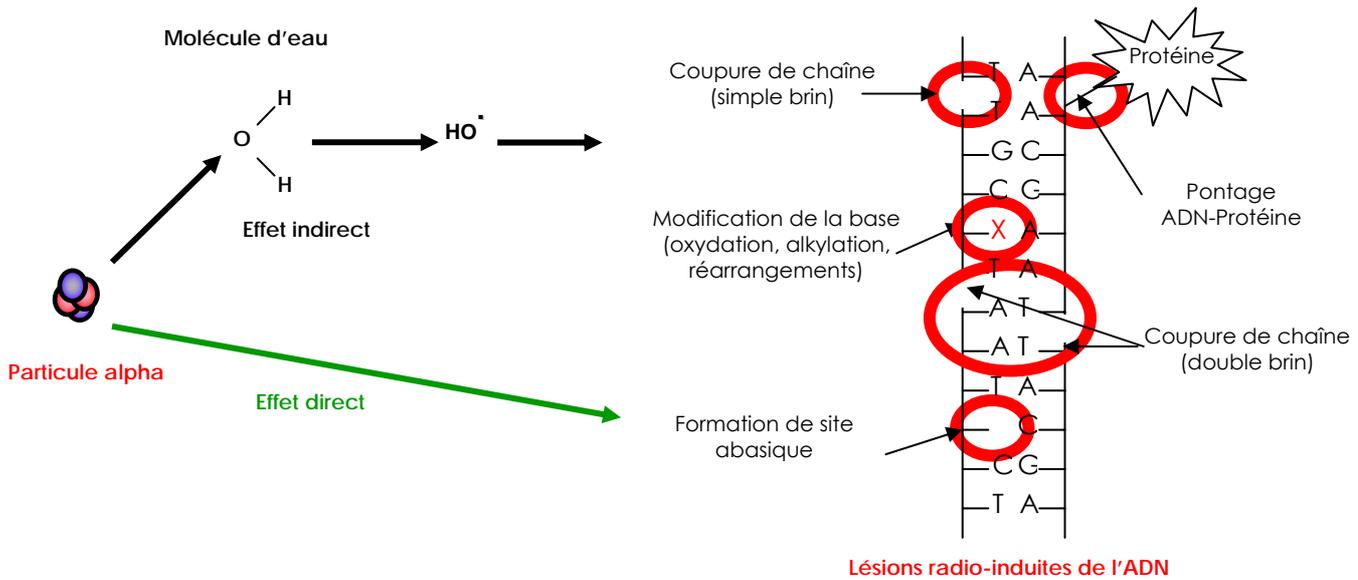


Figure 1 : **Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN.** Représentation schématique des effets directs et indirects (ici par une particule α) sur l'ADN. La particule α va ioniser et endommager l'ADN (effet direct) ou interagir avec une molécule d'eau pour créer un radical libre (HO^\bullet) qui va réagir avec l'ADN (effet indirect). Les lésions radio-induites peuvent être de diverses origines, allant de la lésion affectant les bases, au pontage ADN-protéine, ou encore aux cassures de brin.

Dans le cas d'expositions prolongées dans le temps ou à forte dose, les effets générés sur le vivant peuvent s'avérer très délétères. Ces effets nocifs des rayonnements ionisants sont qualifiés soit :

- (i) d'effets déterministes apparaissant de manière systématique en cas d'exposition à des doses radiologiques dépassant un certain seuil,
- (ii) d'effets stochastiques, observés lors des expositions à de plus faibles doses radiologiques. Ces effets apparaissent de manière aléatoire et peuvent être différés chez les individus exposés (apparitions de cancers...).

Si les effets déterministes sont relativement bien appréhendés de par la quantité de données existantes pour des expositions à de fortes doses de rayonnements, le cas des effets stochastiques induits par des faibles doses est tout autre.

Il est largement admis que les effets biologiques induits par les rayonnements ionisants ont pour cible la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) : dans le cas d'interaction entre les rayonnements ionisants et le vivant, les atomes constituant l'ADN pourront être ionisés, voire éliminés par rupture des liaisons chimiques, générant ainsi des dommages biologiques par un effet qualifié d'« effet direct » des rayonnements, tels que cassures simple et double brin, modification ou perte de base, pontages avec différentes protéines...

Parallèlement, les rayonnements ionisants peuvent interagir avec d'autres molécules présentes dans le milieu biologique, et en particulier avec la molécule d'eau qui, par radiolyse, va créer des radicaux libres, espèce radicalaire très réactive pouvant interagir avec la molécule d'ADN. Cette interaction via la radiolyse de l'eau est qualifiée d' « effet indirect ».

La cible privilégiée des rayonnements ionisants est la molécule d'ADN, qui peut subir divers types de lésions radio-induites, telles que cassures simple et double brin, modification ou perte de bases, pontages avec différentes protéines (figure 1) ; ces dommages résultant des effets directs ou indirects des interactions entre rayonnements ionisants et matière vivante (Alpen, 1990 ; Symons, 1994).

b. Les lésions de l'ADN

Les rayonnements ionisants peuvent générer différents types de lésions de la molécule d'ADN, modifications des bases, pontage ADN-protéine, ou encore cassures de brins.

Lorsque les lésions peuvent être réparées, l'effet biologique se limite alors à l'échelle moléculaire et l'intégrité de la cellule est préservée. Lorsque la cellule ne peut pas réparer son ADN lésé, les modifications sont à l'origine d'arrêts prolongés dans le cycle cellulaire, d'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, de la ségrégation des chromosomes. Peuvent alors apparaître des mutations et des aberrations chromosomiques : ces détecteurs de dommages et acteurs de la réparation sont en effet étroitement liés à la régulation du cycle cellulaire. Lorsque le nombre de lésions devient trop important ou lorsque les dommages sont trop complexes pour être réparés, les cellules peuvent, **(i)** soit poursuivre le processus de réparation au risque d'introduire des mutations, **(ii)** soit arrêter le cycle cellulaire (Elkind & Whitmore, 1967) et s'engager dans le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) (voir Teyssier *et al.*, 1999 ; Ward 1994 pour revue).

Lésion des bases :

Toutes les altérations qui impliquent les bases constitutives de l'ADN, résultent de l'attaque par ionisation directe ou par attaque radicalaire de la molécule d'ADN, issus par exemple de la radiolyse de l'eau, le radical hydroxyle HO° étant le plus réactif. Les réactions principales sont l'addition du radical HO° sur la double liaison en position C₅ et C₆ des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C₄ et C₈ des bases puriques (adénine, guanine). Il résulte de ces réactions une multitude de possibilités de modifications des bases : certaines modifications génèrent des composés instables qui se transforment spontanément en produits plus stables. Une vingtaine de bases modifiées ont été mises en évidence, certaines, comme la 8-oxo-

guanosine, possédant un fort pouvoir mutagène *in vitro* (Cadet *et al.*, 1999 ; Wallace, 1994 & 1998).

Certaines lésions de bases peuvent générer la formation de sites abasiques, due à la déstabilisation de la liaison N-glycosidique entre la base et le squelette composé par le sucre et le phosphate. Dans le cas des bases puriques, le site abasique est généré par dépurination et dans le cas des bases pyrimidiques, par la dépyrimidination.

Les cassures de brins de l'ADN :

Un autre type de lésions générées sur la molécule d'ADN correspond aux cassures de brins, qu'il s'agisse de cassures simple brin (CSB) ou de cassures double brin (CDB).

Les cassures simple brin

Les cassures simple brin résultent principalement de l'attaque des radicaux HO° (formés lors de la radiolyse de l'eau) qui entraînent la rupture des liaisons phosphate-sucre suite à l'attaque d'un atome d'hydrogène de la molécule de 2-désoxyribose par le radical.

La coupure de chaîne de l'ADN peut également venir de la perte d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose capté par le radical 5-hydroxy-5,6-dihydropyrimid-6-yle.

Mais il faut néanmoins noter que ce processus est relativement peu efficace. En effet, le taux de formation des cassures simple brin varie linéairement en fonction de la dose et est plus faible lorsque le TLE du rayonnement augmente. Par ailleurs, ces lésions sont relativement vite réparées (en moins d'une heure) et ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire selon des études basées sur la survie clonogénique.

Ainsi, le nombre de CSB est estimé à environ 1000 par cellule de mammifère et par Gy pour un rayonnement de faible TLE et de 500 par cellule et par Gy dans le cas de rayonnement de haut TLE (Tubiana & Aurengo, 2005).

Les cassures double brin

Les cassures double brin correspondant à une rupture des deux chaînes en des sites proches l'un de l'autre, forment une catégorie de lésions parmi les plus délétères. Leur nombre est estimé entre 40 et 100 dans une cellule de mammifère par Gy de rayonnement (Tubiana & Aurengo, 2005). La formation de telles lésions peut être expliquée par deux mécanismes. Le premier suppose l'action d'un seul radical HO° sur le 2-désoxyribose avec transfert du radical sur le deuxième brin alors que le second implique l'attaque de l'ADN par plusieurs radicaux hydroxyle dans des zones rapprochées (Siddiqi & Bothe, 1987).

Il faut noter que l'efficacité de formation de ces CDB s'accroît avec l'augmentation du TLE (Heilmann *et al.*, 1996). La cinétique de réparation des CDB, relativement longue et dépendante de la taille des cassures ainsi que du type cellulaire, intervient comme un

paramètre important dans la radiosensibilité cellulaire (Löbrich *et al.*, 1998). De nombreux systèmes de réparation de l'ADN détectent ces lésions et les réparent de façon à protéger les cellules touchées de manière plus ou moins efficace selon le type cellulaire atteint ou la position dans le cycle. Les nombreux paramètres qui activent les voies de réparation dépendent du cycle cellulaire et de l'activation de certaines protéines.

Les cassures double brin de l'ADN peuvent être réparées selon le processus dirigé par une séquence homologue. Dans ce cas, la recombinaison homologue participe également au maintien de la stabilité du génome et les gènes qui contrôlent la recombinaison homologue peuvent être associés à des gènes dits « suppresseurs » de tumeurs tels que BRCA1 et BRCA2 (Pierce *et al.*, 2001). L'intégrité du génome est garantie par l'information portée par une séquence homologue et intacte, soit sur la chromatide soeur, sur le même chromosome, le chromosome homologue, ou encore un chromosome hétérologue (figure 2).

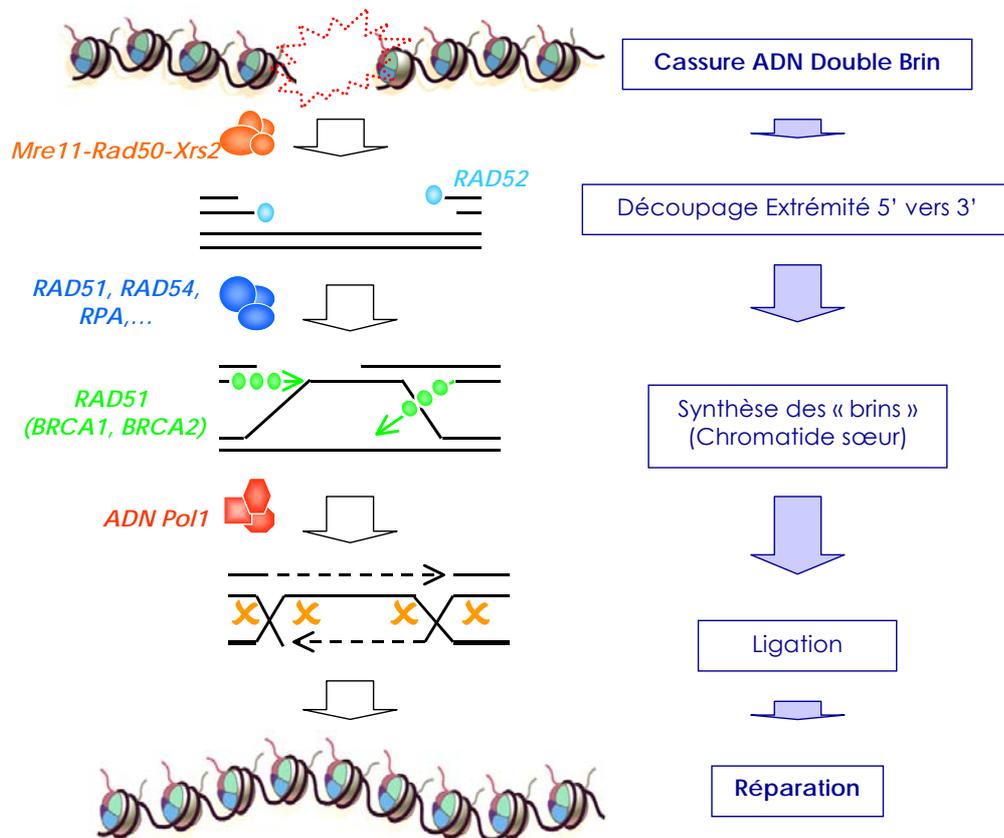


Figure 2 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par Recombinaison Homologue (HR) (modifié de Peterson & Cote, 2004). Représentation générale des principales étapes de la réparation des cassures double brin de l'ADN par Recombinaison Homologue. Les analyses génétiques réalisées chez *S. cerevisiae* (Paques & Haber, 1999) ont permis d'identifier plusieurs gènes - *RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, MRE11, XRS2, ...* - qui jouent un rôle prépondérant dans la recombinaison homologue et dont les déficiences conduisent à une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants. Les événements impliqués lors de la recombinaison homologue sont complexes et sont résumés succinctement dans cette illustration : (i) activité nucléolytique 5'-3' ; (ii) reconnaissance des extrémités ADN 3' par la protéine Rad51 en association avec les protéines RPA, Rad54, Rad52 ; (iii) échange de brin d'ADN entre chromatide soeur ; (iv) Extension des extrémités 3' par l'ADN polymérase 1 ; (v) ligature (ADN ligase 1). Finalement, les jonctions de « Holliday » sont éliminées par clivage et ligature. La séquence nucléotidique ainsi réparée est très souvent dépourvue d'erreurs.

Les cassures peuvent également être réparées par recombinaison non homologue (ou NHEJ pour « Non Homologous End Joining ») par ligature des extrémités de la cassure de l'ADN. Cette réparation des CDB par NHEJ s'accompagne en général de délétions (Jeggo, 1998 ; Hefferin & Tomkinson, 2005) et le gène réparé par ce mécanisme n'est plus fonctionnel (figure 3).

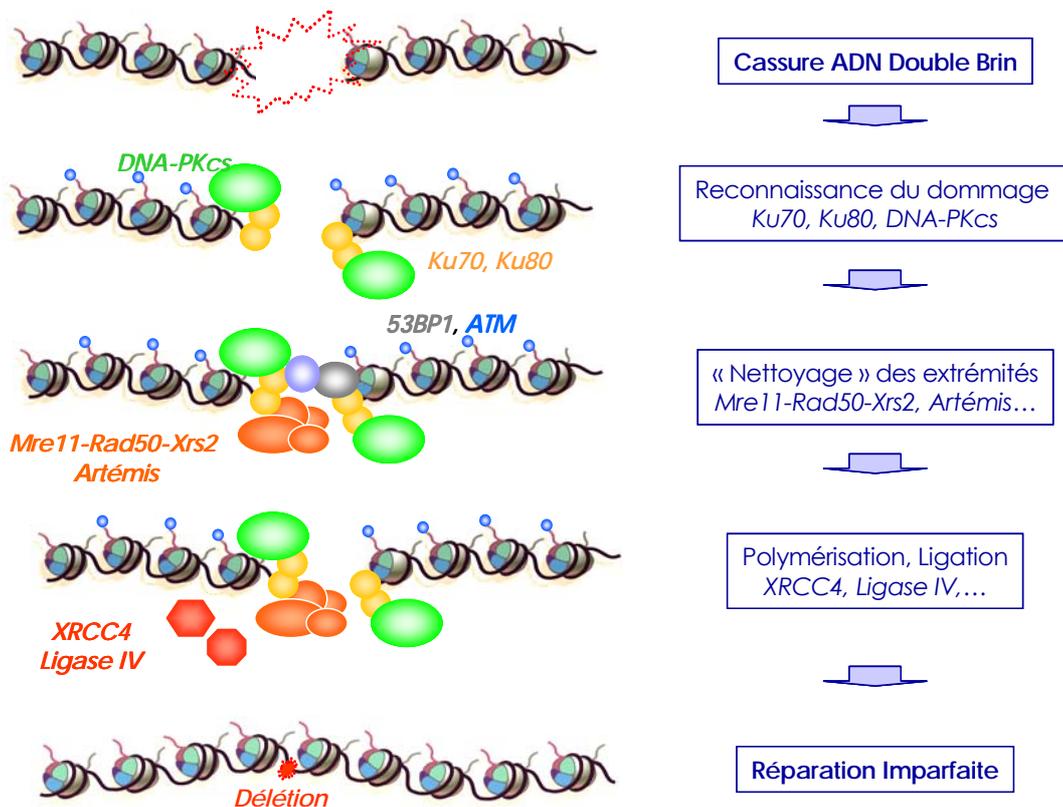


Figure 3 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par la Recombinaison Non-Homologue (NHEJ) (d'après Critchlow & Jackson, 1998). Représentation schématique de la voie de réparation des cassures double brin de l'ADN par la recombinaison non-homologue (NEHJ). Le complexe NHEJ se fixe directement sur les deux extrémités libres de l'ADN ce qui conduit généralement à de petites délétions chromosomiques. Ce mécanisme de réparation requiert les protéines Ku qui se lient aux extrémités libres de l'ADN et le recrutement de DNA-PKcs. Par la suite Ku recrute XRCC4 ainsi que l'ADN ligase IV, et DNA-PKcs induit la phosphorylation de XRCC4, modulant ainsi son activité. La Ligase IV permet la réaction de liaison physique des extrémités de l'ADN. Le complexe Mre11-Rad50-Xrs2/Nsb1 contient les activités exo- /endo-nucléases et hélicases et peut intervenir dans la voie de réparation NHEJ, plus spécifiquement si les extrémités de l'ADN nécessitent d'être remaniées avant ligature. Cependant, d'autres nucléases (Artémis, ...) peuvent intervenir dans ce processus à la place de Mre11.

Suite à la génération de lésions sur la molécule d'ADN, la réparation de ces dommages nécessite à la fois leur détection et l'induction d'une signalisation de ce dommage aux compartiments cellulaires afin de ralentir le cycle par l'action de protéines effectrices et d'induire une réparation de l'ADN par l'action d'autres protéines. La coordination entre le métabolisme de l'ADN et le cycle cellulaire est importante pour permettre une réparation efficace (voir revue Daboussi et al., 2002).

L'induction des CDB entraîne l'activation de nombreuses protéines, dont les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia RAD3 Related) appartenant à la famille des PIKK (Phosphatidylinositol-3-Kinase related kinase), qui grâce à leur domaine « PI3K-like » vont phosphoryler d'autres protéines impliquées dans la signalisation (telle que la protéine histone H2A.X, détaillée dans le chapitre II) et le métabolisme de réparation de l'ADN. D'ailleurs, ces protéines ATM et ATR jouent un rôle central dans la réponse à des dommages sur l'ADN (Kurz & Lees-Miller, 2004). Et bien que le rôle de chacune de ces protéines soit similaire, l'activation de l'une ou de l'autre est dépendante de la gravité de la lésion.

Ainsi, la phosphorylation de la protéine ATM, très précoce, fait suite à une CDB de l'ADN alors que l'activation d'ATR suivrait celle d'ATM et n'interviendrait que pour la réparation de lésions plus sévères et tardives (Bakkenist & Kastan, 2003).

Suite à une irradiation, des complexes hMut α (composé par hMSH2-hMSH6)-hMutL α (composé par hMLH1-hPMS2)-ADN se forment dans les zones lésées (Stojic *et al.*, 2004), et permettent la phosphorylation d'ATM. Sous forme de dimère à l'état inactif, la phosphorylation d'un monomère d'ATM par l'autre, entraîne la séparation de ces dimères en monomères qui s'associent aux extrémités double-brin générées sur le site de la cassure.

Suite à l'activation des protéines ATR et ATM, de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire, dans la réparation et dans l'apoptose, sont phosphorylées : ATM ralentit le cycle cellulaire en activant CHK2, CHK1 et p53 ; Diverses voies de réparation sont activées par ATM via cABL, BRCA1 et NBS1 ; p53 et MDM2, protéines impliquées dans l'entrée en apoptose sont également activées par ATM (Soussi, 2000 ; Kobayashi *et al.*, 2004 ; Vogelstein & Kinzler, 2004).

Enfin, suite à la formation d'une CDB, une modification de la chromatine résulte de la phosphorylation de la protéine H2A.X par ATM, permettant une plus grande accessibilité de la région lésée pour la réparation.

Les pontages ADN-protéine :

Des pontages intra-chaîne ou inter-chaînes ou entre l'ADN et des protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet indirect du rayonnement ionisant. Le nombre des pontages radio-induits entre ADN et protéines est d'environ 150 par cellule par Gy de rayonnement. Ils peuvent se former (en absence d'oxygène) lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines proches de l'ADN. Ces pontages impliquent principalement les tyrosines des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN (Dizdaroglu & Gajewski, 1989 ; Frankenberg-Schwager, 1990).

c. Les conséquences des rayonnements

Jusqu'à présent, d'un point de vue très schématique, à la suite d'une irradiation la radiobiologie n'envisageait que deux cas de figure : soit la mort de la cellule à plus ou moins long terme dans le cas de lésions non réparables, soit la réparation des dommages ; cette réparation pouvant s'avérer fidèle et n'engendrer aucune conséquence pour la cellule ou réparation non fidèle, engendrant l'apparition de séquences génétiques modifiées, provoquant l'apparition de mutations au niveau de l'information génétique ou de modifications chromosomiques. Ainsi, les études effectuées sur les effets engendrés par les irradiations à faibles doses concernent principalement des mesures de survie cellulaire au travers de courbes de survie, mais également la mesure des mutations à long terme sans pour autant prendre en compte des mécanismes alternatifs pouvant jouer un rôle dans ces dommages comme l'effet de proximité ou encore le phénomène de radiorésistance. Cependant, tous les principes édictés en radiobiologie reposent sur les conclusions tirées d'études épidémiologiques effectuées *a posteriori* sur des populations ayant reçu de fortes doses. A faible dose, ces mécanismes peuvent jouer un rôle plus important qu'à forte dose où les effets macroscopiques masquent des effets mineurs (Hall, 2000b ; Masse, 2001).

4. Les sources d'expositions aux rayonnements ionisants

Les expositions aux rayonnements ionisants peuvent être de deux types, soit une exposition externe lorsque la source est à l'extérieur de l'organisme, soit une exposition interne lorsque la source est absorbée par l'organisme.

Les expositions de type externe peuvent provenir : **(i)** d'une source de rayonnements externe et distante (rayonnements cosmiques, radiothérapie, radiographie...) ; **(ii)** de la présence de substances radioactives sur la peau (contamination externe).

Parallèlement à ces expositions de type externe, il est possible d'observer des expositions de type interne comme : **(i)** l'inhalation de substances radioactives (gaz ou particules) ; **(ii)** l'ingestion de produits contaminés ; **(iii)** la pénétration transcutanée d'un contaminant ; **(iv)** lors d'un examen médical (injection de traceurs radioactifs).

Naturellement, une exposition de type interne va persister tant que la substance demeure dans le corps, avec une diminution au cours du temps en accord avec la loi de la décroissance radioactive du radioélément concerné et en fonction de sa demi-vie biologique.

Dans la vie courante, de nombreuses sources de rayonnements de « faible activité » sont répertoriées.

a. Sources d'irradiation naturelles

La radioactivité naturelle représente la principale source d'exposition aux rayonnements soit 2.5 mSv par an selon les données publiées par l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) en 2002. L'exposition aux rayonnements ionisants à laquelle tout individu est soumis au cours de son existence est relativement variable. En France, le taux de radioactivité naturelle varie selon le mode de vie de chaque individu, mais également selon les régions (facteurs environnementaux tels que la composition géologique ou l'altitude) ; une partie du territoire serait donc exposée à des doses 10 fois supérieures à la moyenne nationale (cas de l'Auvergne par exemple) (Rannou & Tymen, 1989). La moyenne mondiale est estimée aux alentours de 3,5 mSv/an : néanmoins, certaines régions affichent 100 mSv/an, comme en Iran (région de Ramsar), sans qu'aucune précaution sanitaire particulière ne soit prise (Gonzalez, 1999).

La radioactivité naturelle provient de radionucléides primordiaux, présents lors de la formation de la terre et dont la période est au moins égale à 300 millions d'années, constituant l'écorce terrestre (par exemple, le potassium 40 – période de 1.28×10^9 ans, le rubidium 87 - période de 4.8×10^{10} ans, le thorium 232 - période de 1.4×10^{10} ans, l'uranium 238 - période de 4.47×10^9 ans ou encore l'uranium 235 - période de 7.08×10^8 ans...), des composés chimiques élémentaires présents à l'état de trace dans l'atmosphère ou encore dans l'eau, des éléments tels que le potassium 40, le carbone 14 ou encore la composante cosmique. Des particules du rayonnement cosmique (0.27 mSv au niveau de la mer) émises par des sources galactiques ou solaires nous parviennent en permanence et sont constituées de protons, de photons, de noyaux atomiques, d'électrons et de neutrons de haute énergie.

Si ces différentes expositions entraînent essentiellement une exposition externe, une des composantes les plus importantes de l'exposition naturelle vient de la contamination interne suite à l'inhalation de radon, un gaz rare dont l'isotope radioactif le plus abondant est le ^{222}Rn . Le radon, élément chimique naturel numéro 86 de la classification périodique, est un gaz rare qui comporte 3 isotopes radioactifs émetteur α ($A = 219, 220$ et 222) faisant partie des trois grandes chaînes radioactives naturelles (respectivement ^{235}U , ^{232}Th et ^{238}U). Leurs périodes physiques (respectivement 3.96 secondes, 55.6 secondes et 3.82 jours) sont suffisamment courtes pour que l'activité correspondante doivent être prise en compte lorsque le précurseur est inhalé. Les trois isotopes du radon, leurs descendants radioactifs sont donc soit émetteurs α , soit émetteurs β avec également une activité, comparativement plus faible, en émission gamma associée.

Le radon est donc produit en permanence par désintégration radioactive d'isotopes du radium dans les familles naturelles de ^{235}U , ^{232}Th et ^{238}U , composants ubiquitaires de l'écorce terrestre. A cause de la faible concentration en ^{235}U , seuls les isotopes 220 et 222 sont réellement considérés sur le plan sanitaire puisque le ^{222}Rn est responsable en moyenne de 90% des expositions humaines, alors que le ^{220}Rn apporte une contribution potentielle de l'ordre de 33% dans le cas des faibles doses d'expositions (Rannou et Thymen, 1989). Le radon est présent sur toute la surface de la croûte terrestre et peut passer dans l'atmosphère après s'être échappé de sous-sols volcaniques ou granitiques, ainsi que de matériaux de construction (phosphogypse par exemple). Dans l'atmosphère, sa concentration varie non seulement en fonction de la composition géologique des sols et sous-sols, mais également en fonction des conditions météorologiques (pluie, vent). Lors de sa remontée, le gaz radon a une tendance naturelle à s'accumuler dans des espaces clos, et notamment, au sein des pièces mal ventilées des habitations.

Les isotopes du radon se désintègrent en donnant naissance à des produits de filiation non gazeux, polonium, bismuth et plomb stable (figure 4), qui possèdent un comportement, dans l'air inhalé, défini par la taille des particules sur lesquels ils se fixent. En plus de l'exposition au gaz lui-même, ces produits peuvent ainsi diffuser rapidement et se fixer sur les parois nasales, laryngées et trachéo-bronchiques dans le cas de tailles nanométriques, ou rester au niveau nasal ou laryngé dans le cas de tailles micrométriques (figure 5). Ils génèrent ainsi des dommages des épithéliums bronchiques et pulmonaires avec, pour conséquence majeure, l'induction de processus oncogéniques dus à la libération d'énergie au cours des dernières phases de décomposition. En 1988, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé le radon comme cancérigène pulmonaire certain chez l'homme. Il représente le deuxième facteur de risque connu de cancer du poumon après le tabac en terme d'impact (CIRC, 1998). Le devenir du radon inhalé est connu grâce à l'expérimentation animale. Le gaz radon diffuse rapidement dans les tissus où il est peu retenu. Dans les graisses, le niveau est environ 20 fois supérieur à celui des tissus et 95% de l'équilibre est atteint en 6 heures. Pour une exposition continue à une atmosphère contenant 37 kBq de ^{222}Rn , une concentration de 180 Bq peut être attendue dans les tissus adipeux. Il est toutefois reconnu que l'essentiel de la dose délivrée au poumon n'est pas du au radon mais à ses produits de filiation (Cohn *et al.*, 1953 ; Haut Comité de la Santé Publique, 2000).

Afin de caractériser plus précisément les expositions au radon par inhalation et les risques associés, une grande campagne de mesure des taux de radon dans les habitations a été lancée dès les années 1980 par l'IRSN, à la demande de la Direction générale de la santé et se poursuit aujourd'hui. Dès 1999, la France s'est engagée officiellement dans la gestion du risque radon (Rapport de la commission VROUSOS, 2004). Les dernières données montrent

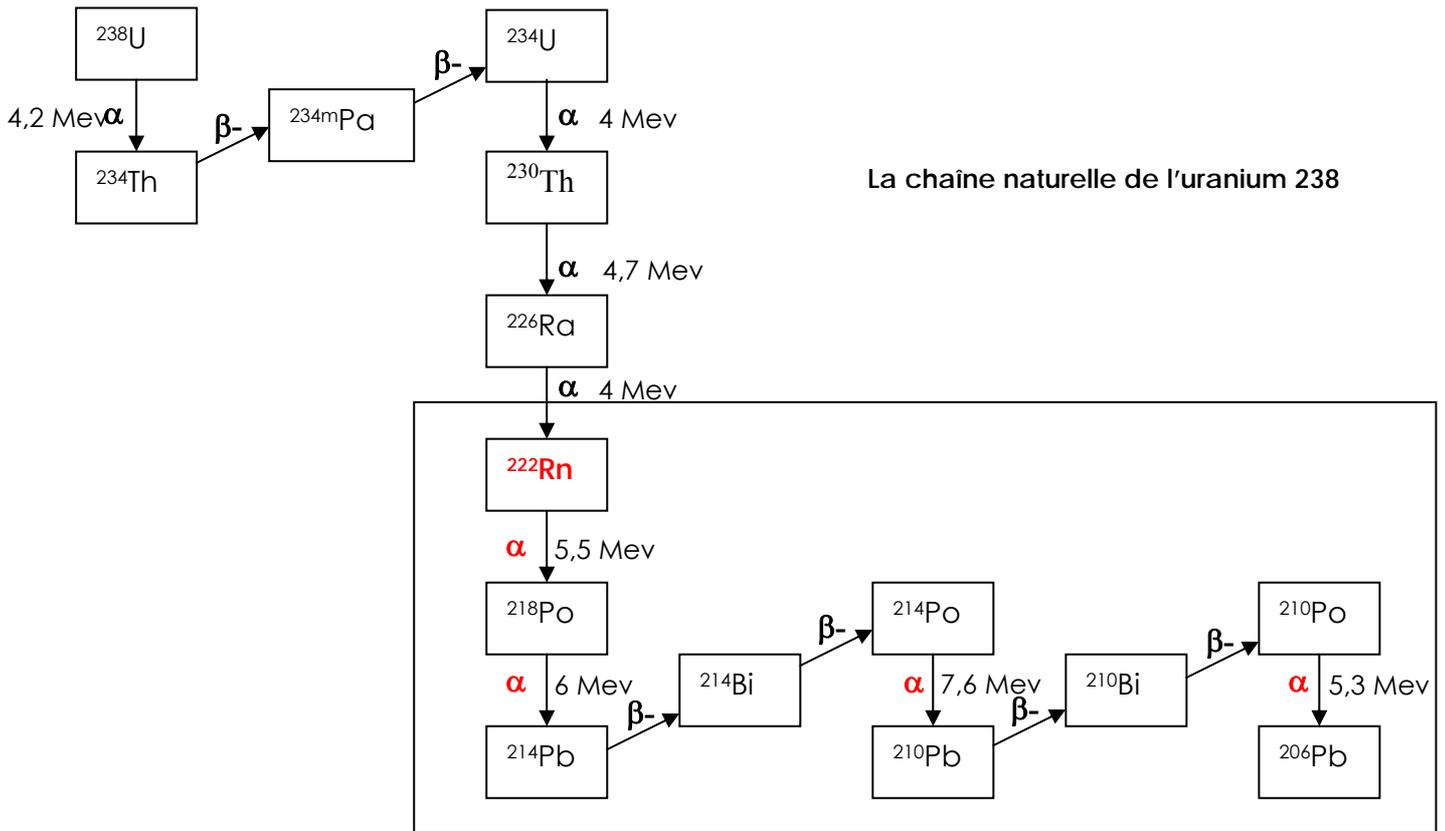


Figure 4 : **Chaîne de désintégration du radon.** Un noyau d' ^{238}U se désintègre par émission α en un noyau fils de Thorium ^{234}Th . Le thorium se transforme ensuite rapidement en Protactinium ^{234}Pa , puis en ^{234}U , par émission β^- . Ce dernier se transforme en ^{230}Th , à son tour instable, qui donne le radium ^{226}Ra qui lui-même se transforme en radon ^{222}Rn . Le radon, seul gaz de ce cycle, peut être inhalé comme ses descendants radioactifs, polonium, plomb, bismuth et induire des dégâts dans l'organisme. Cette cascade d'événements ne s'arrête que lorsqu'un noyau stable est produit. Ceci survient à la quatorzième génération avec un isotope du plomb : le ^{206}Pb .

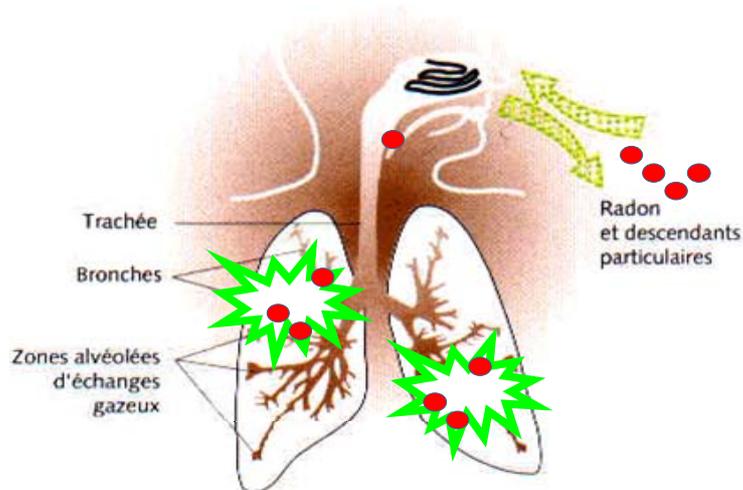


Figure 5 : **Les atteintes par l'inhalation du radon et de ses descendants.** Le radon et ses descendants radioactifs, émetteurs de particules α ou émetteurs β^- , peuvent endommager les cellules de l'épithélium bronchique et être à l'origine de cancers du poumon lors de son inhalation.

une concentration domestique en radon de l'ordre de 89 Bq.m⁻³ (Billon *et al.*, 2004) sur 12 261 mesures françaises. Ces concentrations, combinées à la dangerosité du radon, en font un enjeu de santé publique majeur (Catelinois *et al.*, 2006). Cependant, la probabilité pour une cellule d'un organisme d'une personne de 70 ans, en dehors de toute exposition professionnelle, d'avoir été touchée par une particule au cours de la vie est extrêmement faible. L'étude des effets éventuels sur la santé tombe donc dans un domaine statistique non déterministe qu'il convient d'aborder avec la plus grande rigueur scientifique.

b. Sources d'irradiation médicales

Depuis plus d'un siècle, l'utilisation du rayonnement X n'a cessé de se développer dans le domaine de la médecine nucléaire. Cette utilisation représente la seconde source d'exposition du public dans les pays développés et particulièrement en France, avec une dose d'exposition moyenne annuelle de 1,5 mSv par habitant (Masse & Pasquier, 1997). L'utilisation des rayonnements ionisants dans le milieu médical provient : **(i)** des examens de radiodiagnostic du patient (radiographie conventionnelle, mammographie, scanner, angiographie et radiologie interventionnelle) avec des différences très importantes dans les doses délivrées ; **(ii)** de la réalisation d'examens en médecine nucléaire (scintigraphies...) ; **(iii)** de la radiothérapie et la curiethérapie.

c. Autres sources

Face à la radioactivité d'origine environnementale ou médicale, d'autres sources d'irradiation sont issues du monde industriel. Celles-ci viennent de l'industrie électronucléaire (exposition minime autour de 10 µSv par an et de 100 µSv à proximité immédiate d'installations de retraitement de déchets – IRSN, 2006) ainsi que des applications en sources. On peut ensuite rajouter les sources d'origine militaire : les attaques nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki par exemple.

Depuis le début des années 2000, les soupçons engendrés par l'apparition de diverses pathologies dont des leucémies rapportées chez des militaires ayant participé à la guerre des Balkans ou à la guerre du Golfe (l'uranium appauvri des armes utilisées lors de ces conflits a très largement été mis en cause (Tirmarche *et al.*, 2004)) ont montré le besoin de connaissances et d'informations sur les effets des faibles doses sur le vivant. Plus récemment, la publication de données épidémiologiques suggérant la relation très controversée entre l'augmentation de l'incidence du cancer de la thyroïde dans la population de Polynésie Française et les essais nucléaires français (Violot *et al.*, 2004) accentue ce besoin.

Parmi les sources d'irradiations on peut noter :

Les essais nucléaires en atmosphère

Les retombées radioactives des divers essais nucléaires atmosphériques ont produit toute une gamme de radioéléments, des produits de fission aux actinides. Les diverses populations exposées, l'ont été principalement par des irradiations externes dues aux dépôts au sol et par des contaminations par ingestion. La dose efficace individuelle moyenne en résultant, calculée sur toute une vie, est estimée à 4,4 mSv dans l'hémisphère nord, 3,1 mSv dans l'hémisphère sud et 3,7 mSv pour la population mondiale (source UNSCEAR). Parallèlement, les populations vivant près des sites où les essais ont été menés, ont été exposées à des retombées locales et ont ainsi reçu des doses plus élevées. Ainsi, par exemple, et toujours selon l'UNSCEAR, la centaine d'essais de surface conduits entre 1951 et 1962 sur le site américain du Nevada a potentiellement atteint la population résidant jusqu'à une centaine de kilomètres du site, soit une population évaluée à 180 000 personnes. La dosimétrie individuelle à la thyroïde a révélé des doses allant jusqu'à un gray pour des enfants, doses dépendant à la fois de l'âge mais également de l'alimentation. Cependant, aucune augmentation significative de l'incidence de cancer thyroïdien n'a été notée. Des accidents ont également eu lieu lors de certains tests : Ainsi, à Béryl dans le Sahara pour la France, entre 600 et 700 personnes ont subi une exposition globale de l'organisme alors qu'à Bikini dans le Pacifique pour les Etats-Unis, 259 personnes ont été exposées accidentellement à de l'iode radioactif, notamment au niveau de la thyroïde à des doses de plusieurs dizaines de grays. Le suivi de ces populations se poursuit encore aujourd'hui (UNSCEAR, 2000a).

Les retombées de Tchernobyl

L'utilisation de l'énergie nucléaire a généré quelques accidents dans les domaines civils et militaires. Les premiers accidents remontent à l'époque à laquelle a débuté la course aux armements marquée par la contamination à Mayak (ex-URSS, Vorobiova *et al.*, 1999), de 1949 à 1956, de la rivière Técha au sud de l'Oural par des déchets radioactifs rejetés directement dans des lacs ou par l'explosion d'un réservoir de stockage de déchets par faute de refroidissement lors de l'accident britannique de Windscale en 1957.

A partir des conclusions tirées de ces accidents, l'expertise a permis de générer la culture de « sécurité » de l'industrie civile nucléaire, entachée toutefois de deux accidents majeurs : le premier à Three Mile Island près de Washington aux Etats-Unis, en 1979, causa la perte d'un réacteur mais épargna les populations alentour grâce aux dispositifs de confinement (*United States Nuclear Regulatory Commission*, 2006) ; le second, beaucoup plus important a touché la centrale de Tchernobyl en Ukraine en 1986 et a généré la plus dramatique catastrophe nucléaire, marquée par la dispersion d'un nuage radioactif à 10 000 mètres d'altitude due à l'absence d'enceinte de confinement. Ce nuage s'est répandu sur des millions de kilomètres carrés, dispersé par les vents, touchant ainsi l'Europe occidentale. 3,8 millions de personnes ont été évacués des territoires affectés par la catastrophe. Une zone « morte » de 29 km de

rayon a été complètement isolée par les autorités ukrainiennes. Sur les 600 000 « liquidateurs » envoyés pour limiter la catastrophe, 10 % d'entre eux ont reçu des doses de plus de 250 mSv et 20 % des doses comprises entre 100 et 165 mSv (IRSN, 2005).

Selon l'UNSCEAR, l'année de l'accident, les doses reçues par les populations européennes varient de 0,05 à 0,5 mSv ; les doses reçues, dans les trois ans qui ont suivi, par les 273 000 personnes habitant dans les zones contaminées proches de la centrale, s'étalent de 5 à 200 mSv, avec une moyenne de 35 mSv. Suite à ces expositions, le bilan le plus récent, lors du Forum Tchernobyl de l'Agence International de l'Energie Atomique (AIEA) fait état de l'apparition de 5 000 cas de cancers thyroïdiens chez des personnes de moins de 18 ans en 1986.

Aujourd'hui, en Biélorussie, en Russie et en Ukraine, près de 7 millions de personnes vivent dans des régions présentant une radioactivité importante due au césium 137. Ces personnes reçoivent des doses moyennes comprises entre 1 et 4 mSv par an et peuvent même subir des doses d'une dizaine de mSv lors d'ingestion de denrées agricoles contaminées.

La catastrophe de Tchernobyl a généré de nombreuses questions sur la gestion des risques à court et long terme, notamment sur l'absence d'estimations fiables des retombées de l'accident sur le sol européen.

d. L'observation des risques induits et les problèmes posés

L'observation des effets biologiques induits par les rayonnements ionisants a été réalisée sur des populations exposées accidentellement. Elle a permis de définir des relations entre les doses et les effets sur le vivant et, *in fine*, d'établir toute la réglementation concernant la radioprotection et de définir les notions de risque. Les études épidémiologiques ont constitué les premières données qui ont permis d'identifier les risques associés. Néanmoins, ces études présentent quelques lacunes, notamment au regard des effets générés par les rayonnements ionisants à faible dose. Les interrogations sur ces effets restent nombreuses puisque toute la réglementation reste basée sur des extrapolations et non sur des observations.

En général, les études épidémiologiques reposent sur l'observation des fréquences d'apparition de cancers suite à une exposition d'une population définie. Les premières données ont été obtenues auprès des populations des villes japonaises de Hiroshima et de Nagasaki qui ont subi des attaques nucléaires au mois d'août 1945 (Pierce *et al.*, 1996 ; Kellerer, 2001). Il a ainsi pu être établi très rapidement que le suivi de l'incidence des cancers du sein de ces populations représente une des meilleures indications de l'association dose-effet. Une corrélation linéaire entre la dose estimée et l'apparition des cancers a pu être montrée.

Les cancers sont en perpétuelle augmentation dans les pays industrialisés depuis la fin de la seconde guerre mondiale, et représentent aujourd'hui la seconde cause de mortalité chez

les personnes âgées de moins de 65 ans, avec plus de 150 000 décès par an en France (données du plan Cancer) et près de 1 711 000 en Europe pour l'année 2004 à comparer aux 2 886 800 décès découlant de maladies cardiovasculaires. L'incidence la plus élevée de mort par cancer est localisée dans le poumon avec près de 20 % (Boyle & Ferlay, 2005). En 15 ans, le nombre de décès imputables au cancer du poumon a augmenté de près de 15 %. Naturellement, cette évolution peut être multifactorielle avec, tout d'abord une augmentation des comportements à risque tel que le tabagisme, mais aussi le perfectionnement des techniques de soins et de la médecine qui permettent une meilleure détection de cette maladie et encore une augmentation de l'espérance de vie avec son lot d'apparition de cancers tardifs (plan Cancer ; Brennan & Bray, 2002). Parmi l'ensemble des causes de cancer répertoriées dans l'environnement, un grand nombre de données sont disponibles pour expliquer l'implication des rayonnements ionisants (UNSCEAR, 2000 a-b) : ainsi, l'exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants serait une composante de cette augmentation continue de l'incidence des cancers. Cette hypothèse est aujourd'hui le centre d'intérêt de nombreux groupes de recherche (voir pour revue Brenner *et al.*, 2003). L'impact sanitaire associé à de telles expositions est de plus en plus étudié.

Les problèmes posés par ces expositions

L'exposition aux rayonnements ionisants, même à faible dose, pose problème, notamment : **(i)** les expositions lors de radiodiagnostic répétés, **(ii)** le lien entre l'exposition au radon et l'apparition de cancer.

La radioactivité constitue indéniablement un outil irremplaçable en médecine, où l'utilisation d'isotopes radioactifs a considérablement amélioré l'exploration des fonctions du vivant. Cependant, il est nécessaire de s'interroger sur les effets induits lors de la répétition au cours du temps, d'examens sur un même organe. La prise en charge d'un cancer grâce à l'apport d'un radiodiagnostic précoce garantit de meilleures chances de survie. Néanmoins, les interactions entre les rayonnements et le vivant ne sont pas négligeables et doivent être prises en considération, même à faible dose, et ce, en fonction de l'âge de l'individu (Bradbury & Olopade, 2006).

Le risque de développer un cancer est influencé par des interactions entre un grand nombre de facteurs extérieurs et le fond génétique de chaque individu. Pour certains cancers, ce fond génétique joue un rôle prépondérant dans le déclenchement de la maladie, et plus précisément à cause des gènes de pré-disposition au cancer (pRB, p53, MEN1, APC, ATM, BRCA1 ou encore BRCA2...) (de Moura Gallo *et al.*, 2005 ; Uhrhammer *et al.*, 2005 ; Peshkin & Isaacs, 2005 ; Risch, 2001 ; Skolnick *et al.*, 1997 ; Janin, 1995). Dans ce cas, les expositions répétées à des doses non négligeables de rayonnements ionisants dans un contexte médical peuvent avoir pour conséquence l'induction de processus oncogènes. Des études réalisées sur des rongeurs ainsi que des observations *in vitro* sur des cellules humaines tendent à valider

cette hypothèse, et notamment sur le rôle central de l'instabilité chromosomique induite par les rayonnements ionisants dans le processus de tumorigenèse. (Kadhim *et al.*, 1992 ; Morgan *et al.*, 1996 ; Ponnaiya *et al.*, 1997 ; Ullrich *et al.*, 1996).

Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. Ainsi, dans le cas des familles à risque pour lesquelles le radiodiagnostic se fait très tôt, c'est-à-dire avant l'âge de 15 ans, ce nombre d'analyses répétées sur un même organe au cours de la vie induit-il le déclenchement du cancer ? Une étude britannique publiée récemment suggère une corrélation entre les doses cumulées relatives aux mammographies et l'âge de prescription du premier examen (Bradbury & Olopade, 2006). Ces mêmes expositions chroniques favorisent-elles l'apparition du phénomène de radiorésistance ? Quels sont les mécanismes mis en jeu ?

Le problème posé par l'impact des rayonnements ionisants sur la santé peut également être illustré par la relation entre l'augmentation de l'incidence de cancer du poumon et l'exposition au radon. Considéré aujourd'hui comme la source principale d'exposition aux rayonnements ionisants de type naturel (données de l'UNSCEAR, 1993), le radon, malgré une période relativement courte de 3.8 jours présente un risque non négligeable pour la santé puisque ses produits de désintégration sont également radioactifs (Kendall & Smith, 2002).

Cette problématique est apparue après des études épidémiologiques effectuées aux Etats-Unis sur des cohortes de mineurs d'uranium, des professionnels ayant été en contact avec de fortes doses de rayonnements ionisants générés par le radon et ses descendants. Ces études suggèrent une augmentation significative de l'incidence de cancer du poumon en relation avec des taux élevés de gaz radon (Environmental Protection Agency, EPA, 2003). Ce type d'exposition serait à l'origine de plus de 21 600 décès par an aux Etats-Unis. De plus, sur la base de ces résultats, et d'après une étude réalisée par l'Académie des Sciences Américaine sur les effets sur la santé d'une exposition environnementale aux radioéléments descendant du radon (*National Research Council, 1998*) près de 15 % de la mortalité par cancer du poumon sur le territoire américain seraient la conséquence d'une exposition à ce gaz radioactif. Ces données épidémiologiques montrent une relation très étroite entre l'exposition au radon dans la vie courante et la santé humaine (Miller *et al.*, 1999). Toutefois, il est très difficile dans ces études de dissocier l'impact réel associé à l'exposition au radon de la part liée au mode de vie (homme, tabagisme, alcool...), ces études ne prenant pas en compte les caractéristiques intrinsèques de la population (fumeur, habitat...). Il en résulte un certain nombre de biais : cette cohorte constituée exclusivement d'hommes, en âge de travailler, excluait les expositions ayant pu être observées dans les habitations... ; par ailleurs, les cellules épithéliales des mineurs d'uranium ont pu être exposées à de multiples traversées de particules α sur une courte période suite à l'inhalation de radon, ce qui représente un cas de figure extrêmement rare pour des personnes soumises uniquement à des expositions de

type domestique. Tout ceci remet fortement en question l'emploi de données épidémiologiques dans la recherche d'effets dus aux faibles doses, de nombreuses études contradictoires étant publiées (Heindereich *et al.*, 2004 ; Laurier *et al.*, 2005 ; Bijwaard *et al.*, 2005).

La contamination par l'uranium est souvent citée comme un facteur de risque. Cependant, la relation dose-effet est rarement étudiée : il en résulte une évaluation rétrospective de l'exposition individuelle, ce qui est généralement insuffisant. En outre, il est difficile de faire la part entre la radio-toxicité propre de l'uranium, sa toxicité chimique et la radio-toxicité de ses descendants. Les études sur les mineurs d'uranium, bien que démontrant une augmentation du risque de cancer du poumon en relation avec l'exposition cumulée au radon, montrent une mortalité pour les travailleurs de l'uranium, inférieure à celle de la population générale (effet travailleur sain) (Tirmarche *et al.*, 2004). En fait, les effets du radon inhalé et sa transformation en produits de filiation émetteurs α n'est qu'un facteur parmi les multiples facteurs cancérigènes, comme l'irradiation externe importante pour les mineurs de fond, la présence de poussières, le tabagisme...

Pour pallier à ces insuffisances, des études épidémiologiques ont été réalisées en France, en 2005, dans le cadre d'un vaste programme européen. Ces études indiquent une augmentation du risque de cancer du poumon liée à l'inhalation de radon selon une relation dose d'exposition/effets recensés. Cette étude basée sur le principe « cas-témoins » a été réalisée sur 486 cas et 984 témoins, sélectionnés selon leur âge (inférieur à 75 ans) et selon le temps passé dans les régions considérées (au moins 25 des 30 dernières années) dans quatre régions françaises : l'Auvergne, la Bretagne, le Languedoc-Roussillon et le Limousin. Les variations de teneur en gaz radon dans ces régions ont été prises en compte. Les deux premières régions citées présentent les taux les plus élevés en radon (sous-sols granitiques, volcaniques). Pour chaque sujet, l'historique des habitations, et les facteurs de risques ont été répertoriés et une dosimétrie d'ambiance en gaz radon à l'intérieur des habitations a été effectuée. (Baysson *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, en France, un arrêté du 22 juillet 2004 précise la nécessité de réfléchir à des modalités de gestion du risque radon dans les lieux recevant du public.

5. Rayonnements ionisants et radioprotection

Les recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) sont, pour l'instant, basées sur des études et des principes prenant en compte des données épidémiologiques d'exposition à des rayonnements à forte dose ; les normes de radioprotection étant mises en place à partir d'extrapolation aux faibles doses. Ainsi, l'étude épidémiologique la plus connue et la plus utilisée reste la cohorte LSS (Life Span Study) (Pierce *et al.*, 1996). Les résultats de la LSS représentent ainsi la première source de données

pour l'évaluation des risques de cancers radio-induits desquels découle la fixation des valeurs limites d'exposition en radioprotection. De cette cohorte de très grande taille composée d'individus des deux sexes et de tous âges présents dans un rayon de 10 km autour du point d'impact de la bombe, il ressort une relation entre l'excès de risque d'apparition d'un cancer relatif et la dose. Pour les leucémies, apparues très rapidement après les explosions, cette relation est de type quadratique, alors qu'elle se trouve être de type linéaire pour les tumeurs de type solide, apparues sur le long terme. Mais, quel que soit le type de relation, les incertitudes pour des doses inférieures à 200 mSv ne permettent pas de valider l'extrapolation de ces résultats pour les faibles doses (Kellerer, 2001) et ce, malgré un nombre de sujets suivis élevé.

Il résulte de ces observations la définition de recommandations. La dose admissible pour le grand public, quel que soit le type de rayonnement, pour toute exposition couverte par une surveillance réglementaire (auprès d'installations recensées et classées à risques) est de 1 mSv/an (IRSN, 2006).

La situation actuelle n'est pas totalement satisfaisante. En particulier, et même si la manière dont la dose a été délivrée dans le temps commence à apparaître dans la réglementation, la mesure de débit de dose est toujours assez difficile à mettre en œuvre sur le terrain en matière de radioprotection. La dosimétrie opérationnelle qui permet un suivi précis dans le temps n'est pas encore généralisé. En radiothérapie, des doses importantes sont délivrées sur une courte durée afin d'être plus nocives que des doses étalées dans le temps. Par ailleurs, le fractionnement des doses délivrées au patient, permettant de moduler la réponse de l'individu, est un paramètre essentiel de la réponse biologique aux rayonnements qui n'est pas pris en compte.

D'un autre côté, il existe un réel besoin de données expérimentales fiables concernant l'effet biologique des faibles doses de rayonnements ionisants. Les données épidémiologiques ne sont pas en mesure de répondre aux interrogations. En prenant le cas d'une relation linéaire entre l'excès de risque et la dose de rayonnement, un échantillon de 500 personnes est suffisant pour l'étude des effets de doses aux alentours de 1 Sv. En revanche, l'étude de doses au niveau de 100 mSv nécessite l'observation d'une cohorte de 50 000 personnes pour mettre en évidence des événements par définition « rares ». Si cela s'avérait nécessaire, dans le cas des très faibles doses de l'ordre de 10 mSv, il faudrait observer 5 millions de personnes... Pourtant ce sont ces événements rares qui pourraient en partie conditionner la réponse aux faibles doses comme par exemple l'effet de proximité ou la réponse adaptative. Or ceux-ci sont vraisemblablement masqués à forte dose.

Enfin, la notion d'échelle reste toujours difficile à appréhender. La réglementation tient déjà compte du premier facteur d'échelle entre la dose corps entier et la dose organe ou tissu.

L'autre facteur apparaît lorsque l'on veut transférer les données obtenues en radiobiologie expérimentale par irradiation de cellules individuelles, que ce soit en matière de dosimétrie locale, la « microdosimétrie », ou encore en matière de réponse biologique. Cette dernière passe forcément par l'organe ou le système (système immunitaire par exemple) et ne peut être prise en compte par la radiobiologie de type cellulaire, même si on commence à s'intéresser à des problématiques expérimentales liées à une signalisation inter-cellulaire. On peut enfin s'interroger sur la notion de faible dose en fonction de cette échelle. Pour un individu, les faibles doses sont définies comme étant des expositions inférieures à 200 mSv (données IRSN). Par contre, au niveau cellulaire, cette notion reste beaucoup plus délicate à définir. L'exposition reste en tout cas toujours inférieure à l'interaction de quelques particules ionisantes par cellule, voire une seule, une situation qui reste très difficile à reproduire expérimentalement.

6. Conclusion

En conclusion, l'interaction de particules chargées avec le milieu vivant joue un rôle prépondérant dans de très nombreux domaines, que ce soit l'exposition aux rayonnements issus de la radioactivité naturelle, la cancérogenèse ou encore la thérapie anticancéreuse. Cependant, de nombreuses zones d'ombre subsistent encore et, une des questions majeures concerne la capacité de la cellule lésée à détecter et réparer les dommages biologiques induits par des rayonnements de faible dose. L'exposition de la population à de faibles doses est pourtant une réalité au quotidien, que ce soit via l'emploi de ces rayonnements dans les diagnostics médicaux ou par le poids de la composante environnementale. Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'interaction des rayonnements ionisants avec la matière vivante, notamment à des doses telles que celles que l'on peut trouver dans un environnement industriel ou dans la nature, en général inférieures à 200 mSv. Il s'agit d'un problème de société qui ne peut trouver de réponse dans les études épidémiologiques classiques.

Stratégie d'étude

Les données épidémiologiques ne sont pas en mesure de répondre aux différentes approches concernant l'étude des faibles doses.

Malheureusement, les conditions d'études à faible dose sont très difficiles à reproduire en laboratoire. La méthode principalement utilisée, basée sur l'irradiation aléatoire à faible fluence, consiste à déterminer le nombre moyen de particules ayant interagi avec la cellule, et repose ainsi sur des lois de distribution statistique, qui ne permettent pas de reproduire la faible probabilité d'une irradiation cellulaire par plusieurs particules. A titre d'exemple, lors d'expositions domestiques à des émetteurs α , la probabilité pour qu'une cellule d'un individu

soit traversée par plus d'une particule au cours de toute une vie est extrêmement faible. Ces conditions sont très difficiles à reproduire *in vitro* par irradiation aléatoire sur des modèles biologiques. Les inévitables impacts multiples, la variété de cibles intracellulaires touchées (noyau ou cytoplasme), les effets indirects induits par les impacts sur les cellules voisines ou simplement extracellulaires sont autant de phénomènes qui compliquent sérieusement l'interprétation des données.

Il apparaît donc nécessaire de développer un outil performant afin de réaliser des études de radiobiologie cellulaire qui permettent de procéder à des irradiations ciblées (cellule par cellule) et contrôlées (ion par ion). Il est également indispensable de contrôler le nombre exact de particules délivrées par cellule (jusqu'à un ion par cellule), de cibler un point défini pour l'impact, avec une précision à l'air de l'ordre de quelques micromètres. Ainsi, les faisceaux d'ions, développés en premier lieu pour des études de physique nucléaire et de physique des particules, se sont révélés être des outils efficaces pour étudier les mécanismes de réparation et de signalisation à l'échelle cellulaire (Shao *et al.*, 2004 ; Tartier *et al.*, 2003). En effet, de par leur conception, ces faisceaux d'ions présentent une résolution spatiale de l'ordre de 10 μm , soit une résolution inférieure à la taille d'une cellule.

Le microfaisceau représente un nouvel outil pour la recherche sur les effets des rayonnements ionisants de faible dose, outil grâce auquel de nombreuses avancées ont été effectuées dans l'étude de ces rayonnements. Cette technologie permet, en effet, de contrôler en terme de dose et de localisation le nombre de particules incidentes ; le but ultime étant de pouvoir délivrer une particule α sur une cellule unique afin de suivre les effets induits sur la cellule par la particule.

Ce projet s'inscrit ainsi dans une problématique d'expositions à des rayonnements ionisants de faible dose, de type environnemental, typiquement le gaz radon et ses descendants, émetteurs de particules α . Ainsi, dans les propositions pour la mise en place et le renforcement d'activités de surveillance des expositions et des risques associés à l'inhalation du radon, l'Institut de Veille Sanitaire (2003) préconise le lancement de tests sur la réparation de l'ADN après irradiation.

Cependant, l'emploi d'une telle technologie pour l'étude des rayonnements de faible dose sur le vivant nécessite de pouvoir détecter à l'échelle cellulaire les effets biologiques induits.

De nombreuses questions se trouvent donc posées afin de distinguer les réponses aux rayonnements parmi le bruit de fond généré en temps normal mais également, quelles conséquences sont générées par une faible dose à l'échelle cellulaire, quels sont les types et la quantité de dommages induits. En outre, il est nécessaire de s'interroger sur la capacité à détecter et distinguer les dommages générés par une faible dose des dommages générés spontanément. Ainsi, pour travailler de manière reproductible et ne pas être soumis aux effets du bruit de fond, nous avons choisi des lignées cellulaires comme modèle d'étude.

Chapitre II

**Rayonnements ionisants, faibles doses :
contexte et état de l'art**

L'étude des effets biologiques lors d'expositions à de faibles doses de rayonnements ionisants, a été notamment ralentie par la difficulté à mettre en place des méthodologies sensibles et robustes pour mesurer les altérations cellulaires pertinentes. Des méthodes beaucoup plus résolutive ont donc été développées et l'une des avancées les plus importantes a été la capacité de générer, au niveau cellulaire, des dommages spécifiques, comme, par exemple, les cassures double brin de l'ADN et de les détecter *in situ* de manière qualitative et quantitative.

Parmi ces avancées méthodologiques et technologiques peuvent être cités **(i)** le développement et la validation des microfaisceaux d'ions ; **(ii)** les techniques de détection de dommages cellulaires, et notamment les cassures double brin de l'ADN avec la caractérisation de cinétique de phosphorylation de protéines telles que la protéine histone H2A.X ; **(iii)** la capacité de développer des techniques de reconnaissance et de quantification automatique de dommages à l'échelle cellulaire et dans les phases précoces de réponse cellulaire.

1. La problématique des faibles doses

Le développement des microfaisceaux d'ions a été initié il y a une quinzaine d'années afin de reproduire en laboratoire (*in vitro*) les expositions à des particules chargées (protons, alphas et ions lourds) à faible dose (Österreicher *et al.*, 2003a ; *Proceedings of the 6th International Workshop of Microbeam Probes of Cellular Radiation Response*, 2004 ; Prise *et al.*, 2005). Jusqu'aux années 1990, ce type d'étude était basé sur l'utilisation de dispositifs d'irradiation délivrant des faisceaux d'ions ou de photons γ à faible fluence (sources électrodéposées, macrofaisceaux). Ces différents dispositifs ne permettent pas de contrôle de la dose au niveau cellulaire, ni de localisation précise du site d'irradiation. Il peut en résulter une hétérogénéité de la dose déposée par cellule, une grande variété des cibles intracellulaires touchées (noyau ou cytoplasme), et enfin une variabilité intra et inter-expériences parfois mal maîtrisée. Ces irradiations aléatoires à faible fluence obéissent, en effet, à des lois de distribution statistique qui ne permettent pas d'établir avec précision les relations dose/effet à l'échelle des faibles doses comme la dose ultime d'une seule particule sur une cellule unique.

En revanche, la méthodologie microfaisceau a pour caractéristique majeure de prendre en compte les points critiques suivants : **(i)** le contrôle de dose à l'échelle de la cellule unique, **(ii)** le contrôle de la cible à l'échelle sub-cellulaire, **(iii)** le contrôle de la qualité et de la reproductibilité de l'expérience au cours du temps. Cette méthodologie expérimentale récente a permis d'envisager différents types d'analyses à l'échelle moléculaire et cellulaire et dans les phases précoces de la réponse cellulaire, par exemple l'étude des effets

biologiques générés : **(i)** par un nombre défini et prédéterminé de particules ionisantes à l'échelle d'une cellule unique ; **(ii)** au sein d'une population non irradiée « au contact » d'une population irradiée ; **(iii)** entre une irradiation nucléaire ou cytoplasmique (comparaison des effets directs et indirects des rayonnements ionisants).

Avec l'avènement de ce nouveau type de sonde, le besoin s'est fait sentir d'adapter les méthodologies de mesure à l'échelle de la cellule unique, afin de mettre en évidence les effets d'une seule particule sur une cellule. A l'échelle moléculaire, il fallait notamment être capable de déterminer les cinétiques de réponses précoces suite à l'interaction d'une particule chargée. La caractérisation de protéines impliquées dans les processus de reconnaissance et de réparation des dommages directs générés sur l'ADN en particulier, ou dans l'induction de cascades apoptotiques, a permis de disséquer finement les réponses cellulaires et moléculaires induites dans des échelles de temps de l'ordre de la minute. Les avancées dans la caractérisation de la cinétique de phosphorylation de la protéine histone H2A.X impliquée dans le recrutement des facteurs de réparation de cassures double brin de l'ADN a constitué l'une de ces étapes primordiales (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004 ; Kobayashi, 2004). Associés à ces différentes données moléculaires, le développement et l'utilisation de nouvelles méthodes de quantification « automatisées » et objectives ont permis d'appréhender des réponses moléculaires complexes de quelques minutes à quelques heures après irradiation, à l'échelle de la cellule unique. Ces différentes avancées, aussi bien au niveau physique que biologique, ont conduit à repenser la manière d'étudier les relations dose/effet observées aux niveaux moléculaire et cellulaire, leur relation avec les autres niveaux d'organisation : tissu, organe et individu.

L'ensemble des études réalisées ces dernières années a remis en question des principes fondamentaux de radiobiologie classique, avec notamment la mise en évidence de nouveaux processus de réponse, tels que l'effet de proximité, la réponse adaptative, les effets clastogéniques (Morgan, 2002)... A ce jour, il reste de nombreux points à éclaircir, et notamment, l'impact de ces nouveaux mécanismes mis en jeu à ce niveau de dose.

2. Les faibles doses et les modèles proposés

L'exposition des êtres vivants à des doses de quelques mGy ou dizaines de mGy, doses comparables à celles de l'exposition naturelle, pose deux questions majeures : **(i)** ces faibles doses comportent-elles ou non un risque ? **(ii)** à ces niveaux de dose, l'irradiation peut-elle avoir d'autres effets que les effets attendus à fortes doses ?

Comme pour tout autre agent toxique de nature chimique ou physique, il est possible de déterminer, pour les rayonnements ionisants, les seuils des effets détectables, c'est-à-dire les doses au-dessous desquelles, le risque, s'il existe, est si faible qu'il est impossible de le mettre en évidence.

En fait, il n'existe pas un seuil, mais toute une série de seuils correspondant chacun à une variété de cancer, à un type donné de rayonnements et à une modalité donnée d'irradiation (les rayonnements X ou γ délivrés à faible débit sont, par exemple, moins nocifs que ces mêmes rayonnements à fort débit). Pour exemple, chez l'homme, il est estimé que : **(i)** les rayonnements α émis par le radium induisent des cancers de l'os à partir d'un seuil de 0,8 Gy ; **(ii)** les rayonnements X et γ avec un débit moyen de dose induisent des cancers du caecum, du rectum, de l'os ou de l'utérus à partir d'un seuil de 10 Gy. Cependant, les seuils les plus faibles observés chez les survivants de Hiroshima et Nagasaki (débit de dose extrêmement élevé, exposition au rayonnement γ et aux neutrons plus une irradiation globale du corps) ont été estimés entre 0,1 et 0,2 Gy pour les leucémies, les cancers de la peau, les cancers du sein ou encore les cancers de la thyroïde chez les enfants (Kellerer, 2001).

En l'absence de données expérimentales directes, il est très difficile de définir la relation dose/effet pour des expositions chroniques ou ponctuelles à de faibles doses de rayonnements ionisants. De plus, le caractère essentiellement aléatoire du dépôt d'énergie dans les cellules, ainsi que la très faible probabilité p , que l'une des quelques 10^{14} cellules d'un homme irradié à 1 Gy se transforme en un cancer, ont longtemps paru justifier l'approche probabiliste du risque de cancer ou d'anomalies héréditaires chez l'homme. Il était donc tentant d'utiliser des modèles mathématiques qui auraient permis, à partir des relations dose-effet observées à forte dose, d'extrapoler ces courbes à l'origine et d'attribuer ainsi un risque jusqu'aux plus faibles doses.

De ce fait, la définition de modèles prédictifs afin d'estimer, par extrapolation, le risque potentiel inhérent à de faible dose d'expositions domestiques, environnementales ou professionnelles a été tentée. Ainsi, dès la fin de la seconde guerre mondiale, les estimations de ce « risque » ont reposé sur les données épidémiologiques obtenues à partir des différentes cohortes disponibles : **(i)** populations japonaises ayant subi et survécu aux attaques nucléaires de Hiroshima et Nagasaki (1945, cohorte « *Life Span Study* » - Preston et al., 2003) ; **(ii)** populations professionnelles potentiellement à « risque » (populations ouvrières des mines d'uranium, des constructions navales de sous-marins nucléaires, utilisateurs de peinture au radium) (Giussani et al., 2000). De ces études épidémiologiques, plusieurs modèles prédictifs ont été définis et proposent, à partir d'observations effectuées à forte dose d'exposition, des relations dose/effet à faible dose. Outre le fait que ces modèles prédictifs reposent sur des « extrapolations mathématiques et statistiques », ce type d'études repose mathématiquement sur des incertitudes inhérentes à l'absence de populations « contrôle » (conditions environnementales, mode de vie, fond génétique, distribution âge/sexe identique mais sans exposition) et sur la difficulté de définir une dosimétrie précise. Néanmoins, plusieurs modèles de prédiction des effets biologiques à de faibles doses d'exposition à des rayonnements ionisants ont été développés et proposés. Débats et

controverses sont aujourd'hui toujours d'actualité en ce qui concerne la validité de différents modèles.

Modélisation des faibles doses

Très succinctement, la méthode utilisée dans ce but est la suivante : une courbe représentant une relation entre le nombre de cancers radio-induits et la dose est établie dans les limites de dose où l'effet est encore décelable. Les données expérimentales (épidémiologiques) à forte dose sont disponibles et montrent une étroite corrélation entre l'effet observé et la dose reçue, alors que pour les doses les plus faibles (inférieures à 0,2 Gy), bien que l'effet soit encore décelable, l'imprécision est souvent trop grande pour qu'il puisse être quantifié avec rigueur. Pour des doses supérieures à 0,5 Gy, l'effet devient mesurable et une courbe peut être tracée. Les courbes obtenues sont rarement linéaires, et l'extrapolation vers les doses les plus faibles ne peut alors être qu'arbitraire.

Ainsi, les premières modélisations proposées ont établi une « relation linéaire sans seuil » ou « linear nonthreshold model » et une relation quadratique (d'après le *National Council on Radiation Protection*, 1993). Ce modèle est celui actuellement appliqué en radioprotection où les doses à considérer sont généralement inférieures à 0,02 Gy/an (limite autorisée pour les travailleurs, soit 20 mSv sur 12 mois). Pour ces faibles doses et débits de doses, l'appréciation des risques, s'ils existent, est impossible. Dans un but de précaution, il est admis, d'après ce modèle, que le risque est toujours présent jusqu'à la dose zéro, et qu'il varie de façon linéaire avec la dose. C'est sur ce principe que repose la définition du Sievert et la notion de facteur de risque.

Ce modèle applique donc une grande marge de précaution et de sécurité vis à vis des effets potentiellement toxiques sur le vivant et soulève encore de nombreuses discussions. Ainsi, l'utilisation de la notion du sievert basée sur ce principe peut donner lieu à quelques interprétations excessives. Pour exemple, elle ferait apparaître qu'en France (60 millions d'individus), l'irradiation naturelle, estimée à 2,5 mSv en moyenne par personne et par an, serait responsable de plus de 8 000 morts par cancers et par an (avec un facteur de risque associé de 5% de cancers mortels par sievert). Suivre ce raisonnement reviendrait à suspecter que la radiologie médicale serait responsable de 3 000 cancers mortels chaque année.

Face à ces excès, plusieurs recommandations internationales ont été proposées en 1989, 1995 et 1996 par l'Académie des Sciences et la « Health Physics Society » afin d'assurer une certaine prudence quant aux appréciations quantitatives du risque biologique pour des doses inférieures à 100 mSv par individu au cours de la vie pour les expositions environnementales et domestiques, et inférieure à 50 mSv/an pour les expositions professionnelles (Académies des Sciences, 1995 ; Health Physics Society, 1995 ; UNSCAR, 2000).

Cependant, les effets biologiques à de faibles doses sont en réalité plus complexes que ce que présentent les prédictions du modèle « linéaire sans seuil ». De nombreuses données contradictoires ont donné naissance à plusieurs modèles de prédiction. Parmi ces modèles, le modèle « linéaire avec seuil » postule que le risque de faibles doses de rayonnements ionisants est moindre, voire inexistant au-dessous d'un certain seuil. L'analyse des données épidémiologiques, toujours basée pour l'essentiel sur l'étude de la cohorte japonaise (LSS), semble indiquer, dans certains cas, une linéarité entre la dose et le risque à faible dose, sans toutefois exclure un effet seuil à 60 mSv (Pierce & Preston., 2000 ; Little, 2000).

Enfin, trois autres concepts suscitent une attention toute particulière : il s'agit de l'hormésis, de la réponse adaptative et de l'effet de proximité.

Le concept hormésis repose sur l'observation qu'un grand nombre d'agents physiques ou chimiques dont l'action toxique est reconnue au-delà d'une certaine dose, peuvent avoir un effet bénéfique aux doses plus faibles. L'exemple des rayonnements ultra-violets illustre ce phénomène. En effet, deux mécanismes d'action peuvent être mis en évidence pour différentes doses d'expositions de rayonnements ultra-violets sur la peau : **(i)** à forte dose, une action cancérigène ; **(ii)** à faible dose, une action bénéfique en prévenant les manifestations du rachitisme chez l'enfant (transformation de l'ergostérol en vitamine D2, et du 7-dehydrocholéstérol en vitamine D3) (Reichrath, 2006).

En ce qui concerne la mise en évidence de cet effet hormésis dans le cadre d'expositions environnementales de faibles doses de rayonnements ionisants, il est très difficile de conclure. Afin de mettre en évidence ces effets, on soustrait généralement l'échantillon à l'agent causal, ce qui est quasiment impossible dans le cadre d'expositions environnementales. Malgré ces difficultés expérimentales, certains travaux ont montré l'effet « stimulant » de faibles doses, notamment de l'irradiation naturelle, sur la croissance de populations cellulaires. De même a été observée une stimulation du système immunitaire sous l'influence des rayonnements et notamment des rayonnements γ sur des souris (Sanakkayala *et al.*, 2005 ; Epperly *et al.*, 2006).

De ce concept « hormésis » se rapproche la notion de « réponse adaptative » selon laquelle de faibles doses de rayonnements ionisants, dans certaines conditions, pourraient aussi avoir un effet bénéfique. Il est ainsi admis que la réponse adaptative est induite pour des doses comprises entre 1-100 mGy de rayonnements γ , c'est à dire pour une dose 100 à 10 000 fois supérieure aux doses de radioactivité naturelle (0,01 mSv/jour). Ce concept a été proposé pour la première fois en 1984 afin d'expliquer les observations faites sur des populations en culture de lymphocytes humains mises en présence de faibles concentrations de thymidine radioactive. De manière tout à fait surprenante et inattendue, ces populations cellulaires exposées à de « faibles doses » de rayonnements ionisants présentent un taux d'anomalies

chromosomiques plus faible que les populations cellulaires exposées à de fortes doses de rayonnements (Olivieri *et al.* 1984). D'autres études viennent également étayer ce modèle (Mitchel *et al.*, 1990 ; Azzam *et al.*, 1994 ; Azzam *et al.*, 1996 ; Mitchel *et al.*, 1999).

Enfin, le dernier concept émis soulève à la fois beaucoup d'interrogations et d'intérêts. Appelé effet de proximité ou « bystander », ce concept postule que les faibles doses de rayonnements ionisants génèrent beaucoup plus de dommages que ne le prédit le modèle « linéaire sans seuil ». Par exemple, l'interaction d'une seule particule α par cellule et pour seulement 1% d'une population cellulaire donnée, induit une augmentation du taux de remaniements génétiques dans plus de 30% de la population cellulaire (« échanges entre chromatides sœurs ») (Nagasawa & Little, 1992). D'autres études ont été également menées par différents groupes et semblent corroborer cette hypothèse (Azzam *et al.*, 2001 ; Sawant *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2002). Il a été largement proposé, afin d'expliquer cet effet de proximité, que les cellules irradiées développeraient une réponse cellulaire spécifique et communiqueraient leur « stress » aux cellules voisines (Ballarini *et al.*, 2002). Plusieurs hypothèses ont été avancées et, parmi elles, la suggestion d'un mécanisme de communication par interaction cellulaire directe (Mitchell *et al.*, 2004) ou bien médiée par la production de seconds messagers excrétés dans le milieu de culture environnant. Cette dernière hypothèse repose sur des études, qui montrent que l'effet de proximité peut se propager à des cellules en culture non irradiées mais incubées en présence de milieu conditionné, obtenu à partir de cultures cellulaires irradiées (Mothersill *et al.*, 1998 ; 2001). Un candidat potentiel, impliqué dans cet effet de proximité pourrait être l'interleukine 8 (IL-8) (Narayanan *et al.*, 1999), une cytokine impliquée dans les processus de chemo-attraction cellulaire et les processus d'activation des leucocytes polynucléaires. Cette molécule de signalisation est sur-exprimée et excrétée dans une grande variété de types cellulaires, et, en particulier, durant les phases de stress oxydant. La réponse adaptative et l'effet de proximité peuvent s'exprimer conjointement. Ainsi l'utilisation d'un microfaisceau pour irradier une population cellulaire de C3H10T^{1/2} avec un nombre prédéfini de particules α , a permis de mettre en évidence une diminution du taux de survie cellulaire (65%) par comparaison aux estimations proposées par le modèle « linéaire sans seuil » (90% de taux de survie). D'après les auteurs de ces travaux, cette différence de taux de survie serait l'expression de l'effet de proximité. Cependant, si cette même culture cellulaire est exposée à une dose de 20 mGy de rayonnements γ , 6 heures avant la même exposition aux particules α , le taux de survie est augmenté (75%). Cette étude souligne que ces deux phénomènes présentent des différences importantes, notamment au niveau du type de rayonnement considéré. L'effet de proximité serait typiquement induit par des particules α alors que la réponse adaptative le serait par des rayonnements γ (Sawant *et al.*, 2001).

Pour explorer ces différents concepts et surtout déterminer les effets induits par des rayonnements à faible dose, la nécessité de développer un outil performant s'est imposée afin de réaliser des irradiations parfaitement contrôlées et permettant d'atteindre la « dose ultime » d'une seule particule délivrée par cellule. Actuellement, la démarche est d'accumuler des preuves biologiques de la réelle existence de ces concepts.

3. L'apport des microfaisceaux en radiobiologie

Les premiers microfaisceaux de particules chargées (protons et α et ions lourds) sont apparus il y a une quinzaine d'années environ, avec une énergie dans la gamme du MeV (en α et protons) et du MeV/nucléon pour les ions plus lourds. Leur capacité à délivrer un faible nombre de particules, exactement prédéterminé, dans des compartiments cellulaires spécifiques (noyau ou cytoplasme) et ce, avec une résolution spatiale de quelques micromètres, a permis d'envisager des études de réponse cellulaire de plus en plus robustes aux faibles doses. Cependant, les études actuellement envisagées avec ce type d'outil dépassent le cadre de la radiobiologie classique et contribuent à de véritables recherches en biologie moléculaire (Tartier *et al.*, 2003 ; Shao *et al.*, 2004).

Jusqu'au développement de ces dispositifs, les études expérimentales en particules chargées reposaient exclusivement sur des processus d'irradiation non ciblée en macrofaisceaux à faible fluence. Celles-ci ne permettaient pas un suivi des phases précoces de réponse et excluaient également toute possibilité de suivi de phénomènes rares comme le sont les effets des faibles doses. En effet, lors d'expositions domestiques à des émetteurs α , la probabilité pour qu'une cellule d'un individu soit traversée par plus d'une particule au cours de toute une vie est extrêmement faible. Les méthodes d'irradiation non ciblées ne permettent pas de délivrer de manière homogène une dose équivalente à chacune des cellules d'une population cellulaire en monocouche (une particule α par cellule par exemple). Les inévitables impacts multiples sur une partie de la population cellulaire, la variété de cibles intracellulaires touchées (noyau ou cytoplasme), les effets indirects induits par les impacts sur les cellules voisines ou simplement extracellulaires sont autant de phénomènes qui compliquent sérieusement l'interprétation des données (Folkard *et al.*, 2002).

La radiobiologie expérimentale « classique » sur lignées cellulaires est surtout basée sur le suivi des cellules irradiées dans le temps. A long terme, ces études nécessitent un grand nombre de cellules, et l'emploi de méthodologies d'analyse très robustes pour l'étude des phases précoces. La méthode d'analyse la plus employée reste l'établissement *in vitro* de courbes de survie cellulaire en fonction de la dose. Ces courbes dose-effet permettent de quantifier la létalité induite par le type de rayonnement et reposent sur le test de clonogénicité. Les

résultats ainsi obtenus représentent une réponse globale d'une population à une irradiation (arrêt du cycle cellulaire, entrée en apoptose, différenciation cellulaire prématurée...). Pour la recherche des effets à long terme après irradiation, la radiosensibilité intrinsèque qui caractérise la capacité des cellules à réparer fidèlement les dommages de l'ADN est également très étudiée, particulièrement les réarrangements chromosomiques, la génération de micronoyaux ou encore les mutations générées.

La radiobiologie « classique » s'intéresse également à l'étude des effets induits sur l'ADN et notamment les lésions générées par le passage des particules. L'identification des cassures double brin de l'ADN, lésions susceptibles d'amener à la mort cellulaire avec la meilleure probabilité, sert de base au développement de nombreuses techniques mesurant les dommages de l'ADN dans une population cellulaire. Ces méthodes ne mesurent pas directement les cassures double brin, mais les fragments d'ADN générés par l'irradiation, que ce soit par élution neutre sur filtre, par électrophorèse en champ pulsé ou encore par relaxation de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée repose sur l'analyse dite des comètes (ou Single Cell Gel Electrophoresis Assay - SGSE). Ce test SGSE permet la mesure des cassures de l'ADN et des sites alcali-labiles dans les cellules isolées, exposées à des génotoxiques. Ces études ont permis de montrer une corrélation entre le nombre de cassures double brin induites par les rayonnements et la radiosensibilité, que ce soit par PFGE comme dans l'étude d'Almodovar *et al.*, (2002) ou encore grâce au test comètes dans l'étude de Brammer *et al.* (2001). Naturellement, des études concernant le métabolisme de reconnaissance et de réparation de l'ADN ont été entreprises, et notamment, sur la protéine histone H2A.X avec les travaux de Rothkamm & Lobrich (2003) qui montrent la détection des cassures double brin après des doses aussi faibles que 1 mGy et l'induction des CDB dans les cellules MRC-5.

L'emploi des microfaisceaux a permis de s'affranchir des difficultés d'étude liées à l'emploi de méthodes d'irradiation non ciblée et sur des populations cellulaires entières (Folkard *et al.*, 2002 ; 2003).

Ces dispositifs ont permis l'étude de mécanismes plus fins, au niveau d'une cellule unique, comme la mise en évidence plus ou moins controversée de nouveaux paradigmes tels que la réponse adaptative ou l'effet de proximité, mécanismes mal connus ou artefacts expérimentaux. Il est maintenant admis que ce genre de dispositif a le potentiel pour contribuer de manière importante à la recherche en biologie, et pas seulement dans le domaine de la radiobiologie (Brenner & Hall, 2002). Néanmoins, il n'est pas judicieux d'opposer ces méthodologies qui paraissent plus complémentaires que concurrentes.

Jusqu'à présent, les études menées sur les effets induits après irradiation cellulaire par microfaisceaux de particules chargées peuvent être classées selon deux catégories : effets directs et indirects.

Dans un premier temps et dans un souci de validation de leur dispositif sur du matériel biologique, les équipes ont recherché les effets directs générés sur les cellules et plus particulièrement au niveau de l'ADN et des CDB. Pour être mesurables, ces effets nécessitent l'emploi de marqueurs tels que les protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des cassures de l'ADN, Rad51, 53BP1 et H2A.X, marqueurs localisés par immunocytofluorescence. La validation sur matériel biologique effectuée sur le dispositif SNAKE de Munich, a été réalisée via la protéine de réparation de l'ADN Rad51 et a démontré une accumulation de cette protéine aux points d'impact avec le noyau cellulaire de cellules HeLa irradiées par des ions lourds ^{16}O de 100 MeV (Hauptner *et al.*, 2004). Plus récemment, l'équipe de biophysique du GSI a montré l'accumulation de la protéine 53BP1, marqueur de dommages de l'ADN, aux sites de passage des ions carbone de 4,8 MeV sur des fibroblastes AG1522 (Heiß *et al.*, 2006). Ces approches permettent à la fois de valider la procédure d'irradiation grâce à la localisation des impacts dans la cellule et d'évaluer ainsi le pourcentage de cellules réellement irradiées. Elles amènent également à des études plus poussées sur les effets des irradiations sur le métabolisme de l'ADN avec la possibilité de travailler à l'échelle de la cellule unique et d'évaluer des cinétiques de réponse en fonction de la dose.

Il est également possible de profiter de la précision du point d'impact pour étudier la corrélation entre l'effet généré et la cible subcellulaire visée. Des recherches entreprises au RARAF sur des cellules AL hybrides homme-hamster ont montré, après irradiation du noyau, une augmentation des mutations après le passage de 4 à 16 particules α de 3.2 MeV, ainsi qu'une diminution de 80 % de la survie cellulaire (Hei *et al.*, 1997). Dans le même groupe, Miller *et al.* (1999) ont mesuré le potentiel oncogénique d'une particule α sur des cellules de fibroblastes de souris (C3HT10 $^{1/2}$) remettant ainsi en cause les lois de distribution statistique utilisée en radioprotection.

Par ailleurs, il ressort également d'irradiations cytoplasmiques par des particules α en microfaisceau une augmentation de la mutagenèse : le taux de mutations spontanées est doublé après le passage d'une particule unique, et celui-ci est multiplié par trois avec quatre particules par cytoplasme cellulaire. Il apparaît donc que des effets délétères des rayonnements ionisants peuvent être observés au niveau du génome, et ce même lorsque l'ADN n'est pas directement atteint (Wu *et al.*, 1999).

L'autre contribution des microfaisceaux d'ions concerne l'observation des effets indirects, que ce soit via la radiolyse de l'eau (Prise *et al.*, 2006) ou par des mécanismes de communication inter-cellulaires. C'est ainsi que l'effet bystander est devenu un axe phare de recherche dans la communauté utilisatrice de microfaisceaux (Prise *et al.*, 2006). Trois grands groupes internationaux se sont investis dans ces études : le RARAF, le Gray Cancer Institute avec un micro-faisceau α et une micro-sonde X, et le Dublin Institute of Technology avec des

irradiations γ . Ce phénomène a été observé, pour la première fois, par Nagasawa et Little (1992) grâce à la présence d'un pourcentage élevé d'échanges de chromatides sœurs (30% des cellules) après une irradiation de 1% de cellules CHO de hamster par des particules α à faible dose. Depuis cette première observation, les études entreprises ont montré que des cellules irradiées pouvaient induire un effet mutagène dans les cellules voisines non impactées, et que la complexité des communications intercellulaires jouait un rôle particulièrement critique dans la modulation du phénomène « bystander ». Ainsi, cet effet de proximité correspondrait à l'aptitude de cellules affectées par un agent physico-chimique (cellules émettrices) d'induire des modifications phénotypiques ou génétiques à d'autres cellules non directement affectées par cet agent (cellules réceptrices), ou même sensibles à cet agent. Au RARAF, après irradiation de 10% de cellules hybrides humaine-hamster, chacune avec 20 particules (dose induisant moins de 1% de survie), 20% de la population totale présentaient les caractéristiques de cellules impactées, et, un taux 4 fois supérieur au bruit de fond de mutation était observé, indiquant une induction par cet effet bystander (Hall & Hei, 2003).

Il ressort de ces études une propension pour les cellules irradiées à excréter des facteurs de transmission qui seront captés par des cellules non irradiées et qui répondront à ces signaux. Jusqu'à aujourd'hui, les composés induisant cet effet bystander n'ont pas été identifiés, mais plusieurs axes de recherche sont envisagés, notamment les communications cellulaires par gap junction ou le relargage de composés dans le milieu environnant.

Des expériences utilisant des cellules non confluentes et la ligne microfaisceau du Gray Cancer Institute, ont montré que lorsqu'une seule cellule sur 1200 était impactée, le taux de micro-noyaux observé augmentait d'environ 20%, comparé au nombre attendu lors d'un effet direct. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un « facteur » diffusible émis dans le milieu par la cellule irradiée, qui pourrait induire des modifications cellulaires à distance par un mécanisme indépendant des jonctions inter-cellulaires. (Prise *et al.*, 2003). En résumé, des « facteurs » diffusibles émis par des cellules irradiées dans le milieu de culture seraient capables d'induire des changements dans la survie, le métabolisme et la stabilité génétique de cellules non irradiées. Toutes les cellules n'émettraient pas de tels facteurs, de même que toutes les cellules n'y seraient pas sensibles. Ces effets semblent modulés par des radicaux libres et/ ou des cytokines non encore identifiés (Kaminsky *et al.*, 2005).

Afin d'étudier cet effet de proximité au sein d'un tissu, le groupe du RARAF a irradié un tissu reconstruit en 3 dimensions montrant l'effet de l'irradiation sur des cellules du tissu situées jusqu'à 1 mm des cellules ciblées. Il résulte de cette étude une augmentation de 1,7 fois du nombre de micronoyaux et un taux de cellules apoptotiques augmenté de 2,8 fois (Belyakov *et al.* 2005).

4. Les différents dispositifs en fonctionnement

La construction de dispositifs sophistiqués délivrant un faisceau permettant des irradiations contrôlées, ciblées et reproductibles a été initiée il y a maintenant quinze ans et les premiers dispositifs réellement opérationnels sont apparus à peu près en même temps : **(i)** au Gray Cancer Institute - Cell and Molecular Biophysics Group - Cancer Research Trust, Mount Vernon Hospital - Northwood (UK) (Folkard *et al.*, 1989, 1997a – 1997b), dispositif qui devrait être prochainement déplacé à Oxford ; **(ii)** à l'Université Columbia - New York (USA) (RARAF : Radiological Research Accelerator Facility) (Randers-Pehrson *et al.*, 2001) ; **(iii)** au Life Sciences Centre - Pacific Northwest Laboratory - Richland (USA), transféré ensuite à Texas A&M University - College Station (USA) (Nelson *et al.*, 1996 ; Braby *et al.*, 1997). Ces trois dispositifs permettent des irradiations par des microfaisceaux de particules légères, protons ou alphas de quelques MeV. Un autre dispositif est apparu quelques années plus tard au JAERI (Japan Atomic Energy Research Institute) – Takasaki (Japon) (Kamiya *et al.*, 1999 ; Kamiya *et al.*, 2004) avec la capacité de délivrer des ions lourds à des énergies supérieures à 10 MeV/nucléon (Kamiya *et al.*, 2001). Ces dispositifs ont une production scientifique avérée et sont basés sur une technologie qui consiste à définir la taille du faisceau en le collimatant, ce qui pose quelques contraintes techniques, comme la nécessité de positionner chaque cellule devant le faisceau, lui-même fixe, en déplaçant le puits de culture. La fréquence d'irradiation se trouve limitée par la durée des déplacements mécaniques.

Une deuxième génération de microfaisceaux est alors apparue afin de lever cette contrainte en employant une technique de focalisation par des optiques électromagnétiques (quadropoles magnétiques la plupart du temps). Il devenait alors possible de balayer le faisceau latéralement et ce de manière beaucoup plus rapide. Plusieurs de ces dispositifs sont, à ce jour, opérationnels ou à différentes phases de développement et de validation. On peut citer les facilités en ions lourds comme à GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH Institute, Darmstadt, Allemagne) (Heiß *et al.*, 2006) ou à Munich (Allemagne) (SNAKE : Superconducting Nanoscope for Applied Nuclear-Kern- physics Experiments) (Hauptner *et al.*, 2004). Le dispositif du GSI permet des irradiations avec différents ions lourds par exemple à 4,8 MeV/nucléon pour des ions carbone alors que le dispositif SNAKE délivre des ions à des énergies de 20 à 200 MeV. Parmi les dispositifs délivrant des particules légères, on peut noter le dispositif AIFIRA du CENBG (Barberet *et al.*, 2005), LIPSION à Leipzig (Allemagne) (Österreicher *et al.*, 2003b), à Legnaro (Italie) à l'INFN (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare) (Belli *et al.*, 1993), à Lund (Suède) ainsi qu'à Cracovie (Pologne). L'ensemble des microfaisceaux européens est regroupé dans un réseau RTN Marie-Curie (CELLION – 2004-2007).

Chacun de ces dispositifs présente donc des faisceaux d'ions de nature différente, des gammes d'énergies différentes, des techniques d'obtention de la taille micrométrique du faisceau plus ou moins évoluées, permettant d'obtenir un faisceau avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques μm , une fois extrait à l'air (Folkard *et al.*, 2001 ; Folkard *et al.*, 1997a ; Folkard *et al.*, 1997b ; Miller *et al.*, 1995 ; Nelson *et al.*, 1996). En France, un microfaisceau focalisé est en cours de construction au laboratoire Pierre Süe à Saclay.

En dehors des accélérateurs d'ions lourds, trois des dispositifs en particules légères (AIFIRA, RARAF, LIPSION) disposent maintenant d'accélérateurs électrostatiques de dernière génération (de type Singletron 3,5 ou 5 MV, HVEE, Pays-Bas), ultra-stables en énergie avec un potentiel très important en termes de résolution spatiale. Les autres groupes disposent de machines électrostatiques plus anciennes de type Van de Graaff (HVEE) ou Pelletron (NEC).

Pour le développement de ces dispositifs, une des difficultés techniques rencontrées est d'extraire le faisceau de sa ligne de transport (sous vide) à l'air afin d'irradier les cellules à pression atmosphérique. Cela se traduit en général par une augmentation de la dispersion angulaire du faisceau (« straggling » géométrique) par interaction avec le matériau de la fenêtre ainsi qu'avec les molécules d'air, même si le puits de culture contenant les cellules à irradier est placé à 200 ou 300 μm de la fenêtre de sortie. Les faisceaux d'ions lourds, de par l'énergie des ions, ont alors l'avantage d'une plus grande rigidité vis à vis de ce phénomène.

L'autre difficulté réside dans la détection des ions ayant réellement interagi avec les cellules. Les particules doivent être comptabilisées une par une avant de pénétrer dans le puits de culture afin de contrôler parfaitement la dose délivrée. Il est donc nécessaire de placer un détecteur en transmission en amont de ce puits. Le détecteur ne doit pas trop dégrader la résolution spatiale du faisceau en disposant un minimum de matière sur la trajectoire des ions. Des détecteurs de différentes natures peuvent être utilisés (compteur proportionnel à gaz ou détecteurs d'électrons secondaires de type Channeltron...). Là aussi, la détection des ions lourds est plus simple car induisant des produits d'interaction plus nombreux (électrons secondaires ou densité d'ionisation plus forte dans la trace de l'ion). Devant ces difficultés, certains groupes ont relâché la contrainte technique en ne détectant les ions qu'après la traversée des cellules. Le détecteur est alors placé en aval du puits de culture. Cette technique, beaucoup plus simple, permet, en outre, de conserver une meilleure résolution spatiale puisqu'il n'y a plus de détecteur pour dégrader le faisceau en amont. Cependant, elle ne permet pas d'irradier les cellules dans leur milieu de culture car le parcours des ions est trop court dans les liquides pour ressortir du puits. Les cellules sont donc irradiées à l'air et soumises à un stress oxydatif non négligeable...

Les deux approches sont donc employées avec soit la recherche d'une meilleure préservation de l'intégrité cellulaire pendant l'irradiation (surtout si les études concernent les effets des faibles doses) et avec un contrôle précis de la dose (Barberet *et al.*, 2005), (Folkard

et al., 1997a et 1997b) mais avec une certaine dégradation de la résolution spatiale, soit avec une méthode de détection après passage au travers des cellules (Randers-Pehrson et al., 2001) qui permet une résolution optimale.

5. Mise en évidence des dommages ADN par des marqueurs moléculaires

a. La protéine histone H2A.X

La molécule d'ADN, porteuse de l'information génétique, se trouve sous différentes formes de condensation au cours du cycle cellulaire et est susceptible d'être endommagée à la suite d'interactions avec des rayonnements ionisants. La structure même de l'ADN permet de comprendre ces interactions : ainsi, l'unité de base de la chromatine, appelée nucléosome, regroupe 146 paires de bases (pb) d'ADN enroulées autour d'un groupement de petites protéines basiques hautement conservées dans l'évolution. Il s'agit d'un octamère de protéines appelées histones. Cette structure nucléosomale est constituée de divers types de protéines histones : deux copies des histones H3 et H4, deux dimères des histones H2A-H2B. Une cinquième protéine histone appelée H1 a pour rôle d'assurer la compaction de l'ADN à un niveau supérieur. Dans les cellules vivantes, les protéines histones subissent en permanence des modifications covalentes affectant principalement leur partie N-terminale (acétylation, méthylation, polyribosylation, ubiquitinylation, phosphorylation) (Spencer & Davie, 1999 ; Fukada et al., 2006 ; Huang et al., 2006).

H2A.X et cassure ADN

Depuis quelques années, il a été démontré qu'une protéine histone, la protéine H2A.X, est phosphorylée dans les minutes suivant une irradiation. L'histone H2A.X, une isoforme de l'histone H2A, représente 2 à 25 % du taux d'expression relatif de la protéine H2A, en fonction du type cellulaire ou tissulaire étudié et est distribuée de façon homogène sur la chromatine (Rogakou et al., 1998). Cette protéine est impliquée dans la reconnaissance des cassures double brin ainsi générées et permet le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN aux sites des cassures double brin. Immédiatement après l'apparition d'une cassure double brin de l'ADN, la double hélice d'ADN se décondense sur une région de 2 MB encadrant la cassure (Rogakou et al., 1999). La protéine histone H2A.X devient alors accessible et la sérine 139 de cette protéine est phosphorylée de manière dose dépendante (Rogakou et al., 2000 ; Huang et al., 2006) par les kinases de la famille des PI3K (Phosphatidylinositol-3 related Kinase) reconnaissant spécifiquement un motif SQE (Burma et al., 2001 ; Ward et al., 2003 ; Foster & Downs, 2005 ; Mukherjee et al., 2006). Chez les mammifères, cette famille compte plusieurs protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin, dont ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (AT-Related) et DNA-PK (protéine kinase

dépendante de l'ADN). Pour chaque cassure double brin de l'ADN, 2000 molécules d'histone H2A.X sont phosphorylées (figure 6).

Bien que le rôle précis de la phosphorylation de l'histone H2A.X ne soit pas encore totalement élucidé, cette forme phosphorylée de la protéine H2A.X a été reconnue comme protéine clé dans le recrutement de plusieurs protéines de réparation aux sites de cassures de l'ADN (Rogakou *et al.*, 1999) telles que NSB1 (Tsuchi *et al.*, 2002), le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (Bekker-Jensen *et al.*, 2006 ; Barzilai & Yamamoto, 2004 ; Riballo *et al.*, 2004 ; Kobayashi, 2004) et la protéine Rad51 (Paull *et al.*, 2000), grâce au domaine BRCT (pour BRCA1 COOH Terminal) de ces facteurs de réparation (Thompson & Limoli, 2003) qui permet la liaison de ces facteurs de réparation à la forme phosphorylée de H2A.X (Kobayashi *et al.*, 2002). Cependant, une étude montre que les protéines Brca1 et Nbs1 continuent d'être recrutées au niveau des sites de cassure et ce, même en l'absence de H2A.X (Celeste *et al.*, 2003a), ce qui laisse une part d'incertitude quant à l'implication de la protéine γ -H2A.X dans le recrutement des facteurs de transcription. Néanmoins, la phosphorylation de H2A.X constitue un événement central de la réponse cellulaire suivant l'induction des cassures double brin de l'ADN. Cette modification peut être qualifiée de détecteur de cassures, puisqu'elle permet la formation des foyers de réparation.

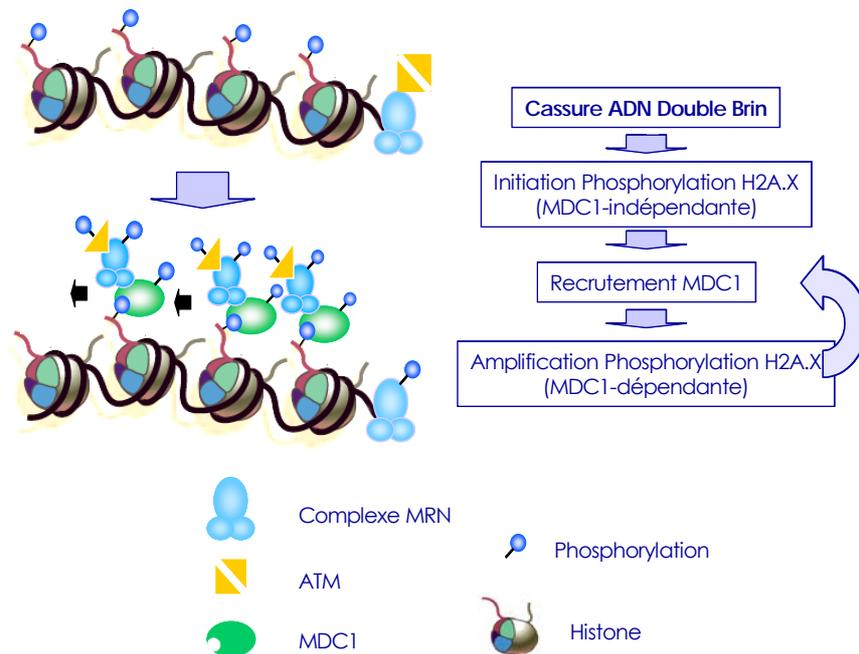


Figure 6 : **Propagation de la phosphorylation de l'histone H2A.X suite à une cassure double brin de l'ADN** (d'après Stucki & Jackson, 2006). Représentation schématique du mécanisme de phosphorylation de la protéine histone H2A.X par MDC1. Dès la cassure double brin de l'ADN, initiation du recrutement de complexes protéiques MRN et ATM aux extrémités libres de l'ADN. Suite à la fixation de MDC1, l'activation par phosphorylation des complexes MRN et de la protéine ATM activée qui se fixe sur la forme phosphorylée de la protéine histone H2A.X (γ -H2A.X). La protéine γ -H2A.X est alors protégée de l'action de PP2A et propagation de la phosphorylation de l'histone γ -H2A.X sur la chromatine. Une boucle de rétro-contrôle permettrait d'expliquer la propagation de la phosphorylation de l'histone H2A.X sur de larges domaines chromatiniens.

La modification de H2A.X n'est probablement pas le seul événement de détection, puisque dans le cas où H2A.X est déficient, un recrutement de facteurs de réparation est observé (Celeste *et al.*, 2003a). Outre ce rôle dans la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN, la protéine H2A.X présente joue également le rôle de suppresseur de tumeur : l'instabilité génétique induite par les rayonnements ionisants est une cause du développement de cancer comme l'ont démontré des études sur des rongeurs (Ullrich *et al.*, 1996 ; Ponnaiya *et al.*, 1997). Le recrutement de protéines de reconnaissance et de réparation des cassures double brin de l'ADN comme Brca1, 53BP1, MDC1, Nbs1 et Rad51 par la protéine H2A.X est altéré dans le cas de cellules de souris déficientes en H2A.X (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002 ; Bassing *et al.*, 2002) et un développement de tumeur a été observé dans le cas d'une combinaison à une déficience en p53 (Celeste *et al.*, 2003b). L'absence de H2A.X est donc associée à une déficience immunitaire, une instabilité génomique et à un phénomène de sensibilité accrue aux irradiations, démontrés sur des souris H2A.X-/- (Celeste *et al.*, 2002).

Ces défauts dans la signalisation ou la réparation des radiolésions sont souvent associés à une prédisposition aux cancers due aux gènes tels que pRB, p53, MEN1, APC, ATM, BRCA1 ou encore BRCA2. Ainsi, l'absence de H2A.X pour les formes familiales de cancer du sein (Monteiro *et al.*, 2003) pose le problème des expositions répétées à des doses non négligeables de rayonnements ionisants dans un contexte de diagnostic par radiographie. C'est également le cas avec un déficit en ATM, qui entraîne un accroissement de la radiosensibilité cellulaire (Kühne *et al.*, 2004).

Le recrutement de protéines de reconnaissance et de réparation des cassures double brin de l'ADN effectué, les foci ainsi formés, constituent un marqueur des cassures double brin de l'ADN et le point d'initiation de l'assemblage de complexes impliqués dans la signalisation des « checkpoints » et la réparation dans lequel γ -H2A.X joue le rôle de protéine de structure, de site d'appui ou d'ancrage, permettant l'assemblage et le maintien de la machinerie de réparation (Bassing & Alt, 2004).

Ce principe de reconnaissance des cassures double brin est résumé de manière simplifiée dans la figure 7 (d'après Downs & Jackson, 2003).

Lorsque les lésions sont réparées, la cellule doit éliminer la phosphorylation de H2A.X sur la chromatine non endommagée afin d'éviter le recrutement des facteurs de réparation (Foster & Downs, 2005). Pour cela, le mécanisme proposé repose sur l'action de phosphatases qui vont éliminer le groupement phosphate de la sérine 139 de la protéine histone. Cependant, ce mécanisme est encore inconnu et d'autres modèles ont été proposés, comme le remplacement de l'histone H2A par un complexe protéique SwrC. Ce complexe retire le dimère H2A-H2B du nucléosome pour le remplacer par un autre dimère (Downs *et al.*, 2005). Une autre possibilité reste la dégradation de la phosphorylation de

l'histone H2A.X, dégradation montrée sur des levures par la présence du protéasome aux sites de cassures de l'ADN (Krogan *et al.*, 2004). La persistance de la phosphorylation de l'histone H2A.X dépend de la capacité de la cellule à réparer les dommages touchant l'ADN. Cependant, il est possible d'observer des foci dits « tardifs » qui marquent des lésions non réparables ou des dommages pour lesquels la réparation est très lente (Paull *et al.*, 2000, Petrini & Stracker, 2003).

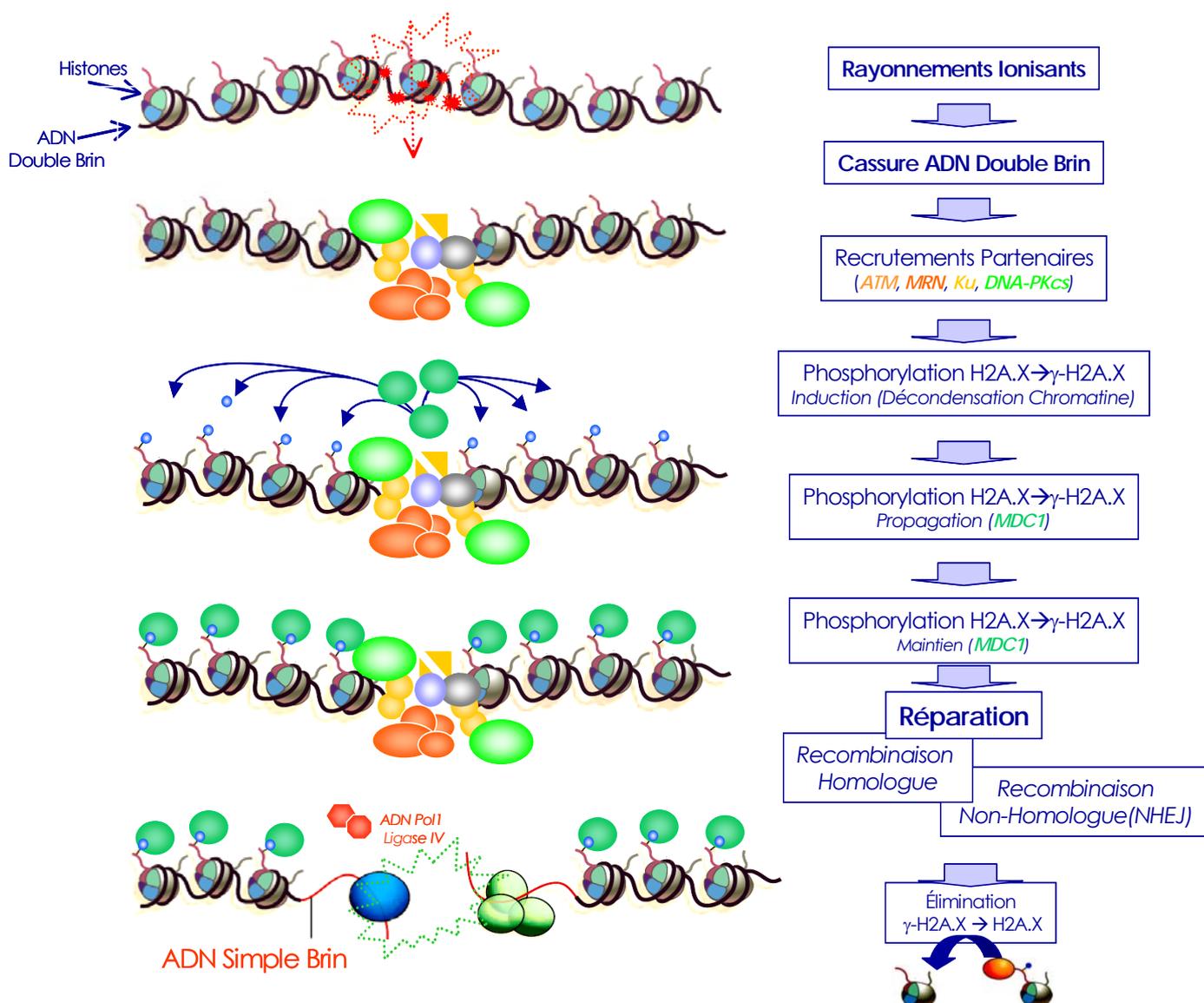


Figure 7 : Représentation schématique résumant les réponses moléculaires induites suite à une génération de cassures double brin de l'ADN (d'après Downs & Jackson, 2003). Les cassures double brin de l'ADN sont générées par des rayonnements ionisants. Les lésions détectées, un grand nombre de kinases sont activé (ATM, ATR et DNA-PK) et l'histone H2A.X est phosphorylée. Cette phosphorylation a pour effet le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation et la signalisation des dommages. Enfin, d'autres facteurs peuvent intervenir afin d'augmenter l'efficacité de réparation et de prévenir les réparations inefficaces.

Comparaison avec d'autres méthodologies

La découverte de la phosphorylation de la protéine H2A.X en réponse à des cassures double brin de l'ADN a permis de donner un nouveau marqueur d'étude des effets des rayonnements ionisants sur le vivant. Les études effectuées en radiobiologie reposent essentiellement sur l'observation de courbes de survie ou sur l'emploi de techniques traditionnelles de détection des cassures double brin de l'ADN (par méthode indirecte : analyse des comètes, électrophorèse PFGE, élution alcaline ou encore par méthode indirecte via un marquage *in situ* (Rapp & Greulich, 2004). Il résulte de ces observations que pour des doses de rayonnements ionisants comprises entre 0,001 et 3 Gy, 35 cassures double brin de l'ADN sont générées par Gy pour des cellules en phase G1, par extrapolation des résultats obtenus pour des doses supérieures à 20 Gy (Thompson & Limoli, 2003). La découverte de la forme phosphorylée γ -H2A.X, puis la production de l'anticorps spécifique dirigé contre la partie C-terminale de γ -H2A.X a permis de détecter de façon indirecte la localisation de ces cassures double brin de l'ADN par apparition de foci restreints dans le noyau. Ces résultats sont similaires aux études effectuées à plus forte dose par PFGE, mais permettent de conclure sur l'efficacité des études par immunocytofluorescence qui améliorent la détection à de faibles doses (Antonelli *et al.*, 2005 ; Lobrich *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des études effectuées en cytométrie en flux ont mis en évidence des cassures double brin de l'ADN générées par des irradiations à des doses de 10-20 cGy, améliorant d'un facteur 2 la sensibilité de détection des cassures double brin par rapport aux méthodes traditionnelles (Olive & Banath, 2004).

En microscopie, la sensibilité de reconnaissance est encore accrue et permet la détection de cassures double brin individuelles après des doses aussi faibles que 1 mGy dans les cellules MRC-5 (Rothkamm & Lobrich, 2003). Un des avantages de l'utilisation de la protéine γ -H2A.X réside dans la phosphorylation multiple de cette protéine, à proximité de la cassure double brin, ce qui permet de faciliter la détection de la réponse aux cassures, grâce à cette amplification biologique naturelle (Dynan *et al.*, 2005). L'emploi de la méthode en cytométrie en flux permet une quantification plus aisée de la phosphorylation de la protéine H2A.X sur un grand nombre de cellules, dans le cadre de radiodiagnostic ou de diagnostic suite à une exposition aux rayonnements ionisants. La quantification de la phosphorylation de la protéine H2A.X permet d'étudier les relations dose/effet sur des populations cellulaires plus restreintes.

Cette quantification peut être utilisée lors d'expériences d'immunocytofluorescence pour la reconnaissance de la protéine γ -H2A.X. Les premiers foci sont visibles 3 minutes après irradiation, et atteignent un maximum 30 minutes post irradiation. Ensuite, ce nombre de foci diminue au cours du temps, avec une demi vie de plusieurs heures (Sedelnikova *et al.*, 2003).

Dose effet – Corrélation

Dans le cas de l'irradiation de cellules par un faisceau de particules α , de nombreuses cassures double brin sont générées. Afin de valider l'efficacité de l'application du dispositif au niveau biologique, il est nécessaire de pouvoir observer les dommages induits par l'irradiation. Il est donc indispensable de répondre aux interrogations concernant, **(i)** la méthodologie utilisable afin d'observer les lésions induites par les interactions entre rayonnements ionisants et matière vivante ; **(ii)** notre capacité à détecter ces cassures ; **(iii)** la possibilité de les quantifier et d'observer une relation entre le nombre de ces cassures et la dose délivrée.

La découverte de protéines impliquées dans la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN, ainsi que dans le métabolisme de la réparation de ces lésions permet de repérer de façon indirecte ces cassures double brin. Afin de valider l'ensemble de la procédure expérimentale, de l'obtention d'un microfaisceau de particules α stable et contrôlé jusqu'à la mise en évidence d'altérations biologiques associées à une irradiation contrôlée et ciblée, nous avons tenu à identifier précisément les impacts des particules α sur nos cellules. Ces cassures double brin générées par les rayonnements ionisants peuvent être aisément identifiées au niveau moléculaire et cellulaire en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines de réparation de l'ADN. Comme pour les dispositifs « microfaisceau » de Munich (SNAKE) et de Darmstadt (GSI), et dans un souci de validation de notre dispositif sur du matériel biologique, nous avons recherché les effets directs générés sur les cellules par une irradiation sous microfaisceau d'ions et plus particulièrement au niveau de l'ADN et des cassures double brin. Le marqueur choisi est une protéine impliquée dans la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN : la protéine histone H2A.X.

La phosphorylation rapide et sensible couvre de larges régions de l'ADN adjacent à la cassure double brin et permet la visualisation en microscopie après marquage à l'aide d'un anticorps. L'utilisation de l'anticorps dirigé contre la forme γ -H2A.X permet de localiser une cassure double brin dans un noyau et a ouvert de nouvelles perspectives d'études des faibles doses (Banath *et al.*, 2004). Il est ainsi possible de mesurer un rapport dose-effet puisqu'une correspondance a été trouvée entre le nombre de foci γ -H2A.X et le nombre de cassures double brin (Sedelnikova *et al.*, 2003).

b. Quantification des foci γ -H2A.X

Au cours de l'année 2006, le nombre des études utilisant la reconnaissance de la protéine γ -H2A.X à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée sur la sérine 139 de l'histone H2A.X, pour la quantification des cassures double brin de l'ADN, n'a cessé de croître (190 publications – Medline). L'utilisation de la protéine H2A.X comme marqueur d'irradiation s'est généralisée et permet un comptage du nombre de foci afin de mesurer le nombre de cassures double brin générées en réponse à un stimulus donné (Olive & Banath, 2004). Ces analyses de dommages de l'ADN sont soit basées sur une mesure en cytométrie en flux, soit, plus récemment, sur la quantification du nombre de foci en microscopie confocale.

Parmi les études récemment publiées, certaines peuvent être soulignées, notamment, la quantification par cytométrie en flux des cassures double brin de l'ADN, *in vivo*, sur des lymphocytes de patients ayant subi un radiodiagnostic du thorax ou de l'abdomen. Une relation linéaire entre ce nombre et le temps d'exposition (et par extension la dose reçue) a été observée (Löbrich *et al.*, 2005).

Dans le domaine de l'amélioration de la radiothérapie, la protéine γ -H2A.X est également à la base d'études de molécules associées, prolongeant les effets des rayonnements ionisants par allongement du temps de vie des cassures double brin de l'ADN (Munshi *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006). Les méthodes de comptage visuelles ne permettent ni d'analyser des cellules présentant un nombre élevé de foci, ni de considérer l'intensité, la taille ou encore la distribution de ces foci.

Des logiciels de traitement commencent à apparaître. Les algorithmes ainsi élaborés sont à la base d'observations et d'évaluations automatiques évaluant non seulement le nombre de foci, mais également la distribution spatiale, la morphologie et leur intensité. Des études basées sur ces méthodes de comptage ont été publiées, et notamment, la phosphorylation de H2A.X comme marqueur des cassures double brin de l'ADN, sur des cellules V79-4 et xrs-5 de hamster chinois et sur des fibroblastes HF19 irradiées par des sources de rayonnements γ ou de particules α (Leatherbarrow *et al.*, 2006).

La méthodologie de comptage développée par Böcker et Illiakis (2006) semble la plus complète et démontre toute la puissance de ces outils, limitant au maximum l'introduction de biais dépendant de l'utilisateur.

6. La microdosimétrie pour l'irradiation cellulaire

S'intéresser aux effets des rayonnements ionisants sur la matière vivante nécessite de connaître de façon précise la quantité de rayonnement absorbée par le milieu : la détermination de la dose absorbée lors de l'irradiation cellulaire reste donc une étape essentielle pour laquelle une grande précision est requise, en particulier pour l'obtention des

relations dose-réponse aux faibles doses. Jusqu'à présent, peu de travaux ont été effectués, souvent faute d'outils travaillant à cette échelle, pour déterminer une dosimétrie réaliste dans des cellules individuelles.

a. La microdosimétrie à l'échelle cellulaire

Lorsqu'un rayonnement interagit avec la matière, celui-ci perd tout ou partie de son énergie en un temps très court, de l'ordre de quelques femtosecondes. Les calculs microdosimétriques permettent d'étudier la géométrie microscopique du dépôt d'énergie, de manière beaucoup plus significative qu'avec le concept de dose globale absorbée qui ne rend compte que d'effets macroscopiques induits. Par ailleurs, la microdosimétrie est née d'une volonté de tenir compte de la géométrie cellulaire et de la relation entre la trace des ions et les compartiments cellulaires pouvant être touchés lors des irradiations par particules chargées. A ce jour, quelques modèles sont utilisés pour prédire l'effet d'une irradiation sur la matière biologique, par adaptation de modèles de traces initialement prévus pour la matière inerte. Certains modèles analytiques basés sur des distributions de dose dans la trace des ions vont même jusqu'à la prédiction de probabilités d'inactivation cellulaire (Scholz & Kraft, 1994 ; 2004). Dans ce cas, l'inactivation sous irradiation en photons, par définition beaucoup plus homogène dans l'espace, est prise comme référence pour une même dose absorbée.

Au delà de la simple évaluation de la dose physique déposée, et en matière de prédiction de la réponse biologique aux rayonnements, il faut, en outre, garder à l'esprit que l'interaction d'un rayonnement avec la matière biologique initie une succession complexe de processus physiques, chimiques puis biologiques aboutissant à la réponse cellulaire. Or, si les processus physiques sont relativement bien connus dans l'eau liquide jusqu'à des énergies de quelques eV (pour les électrons) et les processus de réponses biologiques connus, la série de réactions reliant ces phénomènes aux deux bouts de la chaîne est encore aujourd'hui impossible à suivre pas à pas. Deux approches sont alors possibles : la première consiste à comparer les effets biologiques induits par des rayonnements de diverses qualités (par exemple l'induction de la mort cellulaire en évaluant la relation dose-effet à l'aide de courbes de survie cellulaire) ; la seconde cherche à évaluer, *in silico*, les dégâts induits sur la molécule d'ADN, ce qui à terme permettra de mieux cerner l'action des rayonnements sur la matière vivante.

Pour revenir plus simplement aux besoins liés aux activités d'irradiation de lignées cellulaires par des particules chargées en microfaisceau, c'est le nombre d'ions ayant interagi avec la cellule qui est initialement pris en compte. Il est alors important d'évaluer de manière précise la dose locale déposée dans chaque cellule. Actuellement, certaines études de

microdosimétrie prennent encore pour modèle cellulaire des parallélépipèdes de densité égale à l'unité, car les premiers codes permettant le calcul de la microdosimétrie ne pouvaient utiliser que des géométries mathématiques très simples (Bailly *et al.*, 2002). Aujourd'hui, nous disposons d'outils qui rendent possible l'utilisation de géométries cellulaires plus complexes. Il apparaît donc nécessaire d'affiner ces modèles afin de se rapprocher au mieux de la réalité biologique afin d'améliorer la précision des calculs des doses déposées. Cette démarche a, par ailleurs, été entreprise par différents groupes de recherche dans des domaines qui vont de la planimétrie pour la thérapie anti-cancéreuse jusqu'à de nouvelles méthodes de thérapies locales par des émetteurs α vectorisés.

b. La microdosimétrie Monte Carlo pour l'irradiation cellulaire

Couplé au dispositif d'irradiation ion par ion sur cellule unique, décrit dans ce mémoire, un code de simulation informatique basé sur l'outil Monte-Carlo Geant4 a été récemment développé dans l'équipe du CENBG (Incerti *et al.*, 2004). Celui-ci permet de prédire la dose délivrée dans les cellules après irradiation par des particules α en utilisant des géométries cellulaires réalistes. Ce programme permet de simuler la trajectoire des ions et les processus d'interaction physique associés le long de la ligne de faisceau et lors de la traversée de l'ensemble des composants de l'étage d'irradiation (gaz du détecteur, fenêtres d'extraction, air, support de culture) afin de déterminer exactement les énergies et la distribution spatiale des ions pénétrant dans la cellule (Incerti *et al.*, 2003). Sont ensuite pris en compte les paramètres du système biologique irradié : volumes géométriques, compositions chimiques élémentaires et masses volumiques associées.

Encore récemment, les géométries cellulaires introduites dans ce code de simulation restaient relativement simples, basées sur l'utilisation de volumes ellipsoïdaux imbriqués avec une masse volumique cellulaire de 1 g/cm^3 (Incerti *et al.*, 2006). La définition d'une microdosimétrie fine et précise associée aux conditions d'irradiations cellulaires a donc nécessité d'affiner les modèles cellulaires intégrés dans l'outil de simulation. Pour ce faire, nous avons établi des reconstructions réalistes en trois dimensions de géométries cellulaires des lignées utilisées dans nos différents protocoles d'irradiation. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire et cellulaire, de microscopie confocale, d'analyse sous faisceau d'ions et de traitement d'images numériques, a permis de définir les paramètres physiques, chimiques et biologiques de nos cellules dans différentes conditions expérimentales pour les implémenter directement dans les simulations. Ces données sont aujourd'hui implémentées dans le code de microdosimétrie (Incerti *et al.*, 2006).

Le code GEANT4

Le code de simulation Geant provient de programmes initialement développés pour la simulation de la plupart des expériences de physique des hautes énergies. Geant3, écrit en langage Fortran, a été remplacé en 1994 par un outil plus flexible adapté aux techniques de programmation de type orienté objet. C'est ainsi que le projet Geant4 a vu le jour en 1998 (Agostinelli *et al.*, 2003). Implémenté en C++, Geant4 pour « GEometry ANd Tracking » permet le suivi des particules pas à pas dans des géométries complexes en modélisant un grand nombre de processus physiques, électromagnétiques et hadroniques. Son architecture orientée objet lui confère de puissantes possibilités d'extension, mais aussi de développement, ce qui en fait aujourd'hui un code de référence pour la simulation en physique des hautes énergies. Depuis quelques années, le domaine d'application de Geant4 est en cours d'extension vers la simulation de phénomènes de basses énergies (jusqu'à quelques dizaines d'eV) et vers la simulation aux échelles inférieures au micromètre, ce qui en fait un outil adapté à nos simulations.

D'une manière plus générale, le projet Geant4-DNA a été mis en place en collaboration avec l'Agence Spatiale Européenne (ESA) pour élargir l'outil de simulation Geant4 afin de simuler les interactions des rayonnements avec la matière biologique et mieux définir les normes de radioprotection pour les personnels navigants et pour les astronautes impliqués dans les futurs programmes spatiaux habités. Ce projet international propose de modéliser les interactions entre rayonnements ionisants et système biologique à différents niveaux : à l'échelle de l'organe, à l'échelle cellulaire et à l'échelle moléculaire (molécule d'ADN) (Chauvière *et al.*, 2006). L'intérêt de cet outil ne se restreint pas aux activités spatiales ; les développements pourront également s'appliquer, à terme, à des domaines tels que la radiothérapie et la radiobiologie.

Chapitre III

Dispositif expérimental : le microfaisceau du CENBG

Sur le site du CENBG la plate-forme de faisceaux d'ions AIFIRA, équipée d'un accélérateur de dernière génération, a vu le jour mi-2005. La ligne microfaisceau implantée initialement auprès de l'ancien accélérateur Van de Graaff du centre a été transférée sur la nouvelle plate-forme en mars 2006. Le développement de l'étage d'irradiation a été lancé en 1998 tandis que les premières irradiations en conditions réelles ont débuté courant 2003 et ont coïncidé avec le début de cette thèse. Les travaux décrits dans ce mémoire ont, entre autre, permis de valider la ligne de faisceau sur matériel biologique.

A l'origine, la mise au point et la construction du dispositif d'irradiation par microfaisceau se sont appuyées sur une ligne existante, essentiellement dédiée à l'analyse chimique, l'imagerie et la caractérisation de matériaux sous vide. Ce type de ligne est généralement décrit par le terme de « microsonde nucléaire ». Seule la partie terminale de la ligne a été modifiée de manière à pouvoir en fonction des besoins, soit réaliser des irradiations locales sur cellules à pression atmosphérique, soit continuer l'analyse sous vide. Concilier ces deux types d'activités a posé un certain nombre de contraintes techniques lors de la mise au point, et, en particulier pour l'implantation d'un microscope d'épifluorescence dans un volume disponible limité. Aujourd'hui, en configuration irradiation, la ligne permet l'irradiation ciblée de cellules individuelles en monocouche adhérente avec une résolution spatiale de quelques micromètres. Le dispositif permet de délivrer un nombre prédéterminé de particules α ou de protons avec une énergie pouvant être ajustée entre 1 et 3 MeV à l'entrée dans la cellule.

1. La ligne microfaisceau du CENBG

a. Généralités

Le cahier des charges pour le développement de l'étage d'irradiation du microfaisceau était basé sur quelques principes simples. Le dispositif devait être capable de délivrer un nombre exact et prédéterminé d'ions (protons ou α) jusqu'à la dose ultime de un ion par cellule tout en ciblant des compartiments sub-cellulaires, au moins noyaux ou cytoplasmes. La maîtrise très poussée des conditions d'irradiation en termes de nombre d'ions, d'énergie et de site d'irradiation, devait permettre un contrôle très précis de la dose délivrée aux cellules et surtout une irradiation homogène d'une monocouche cellulaire en s'affranchissant de toute fluctuation statistique.

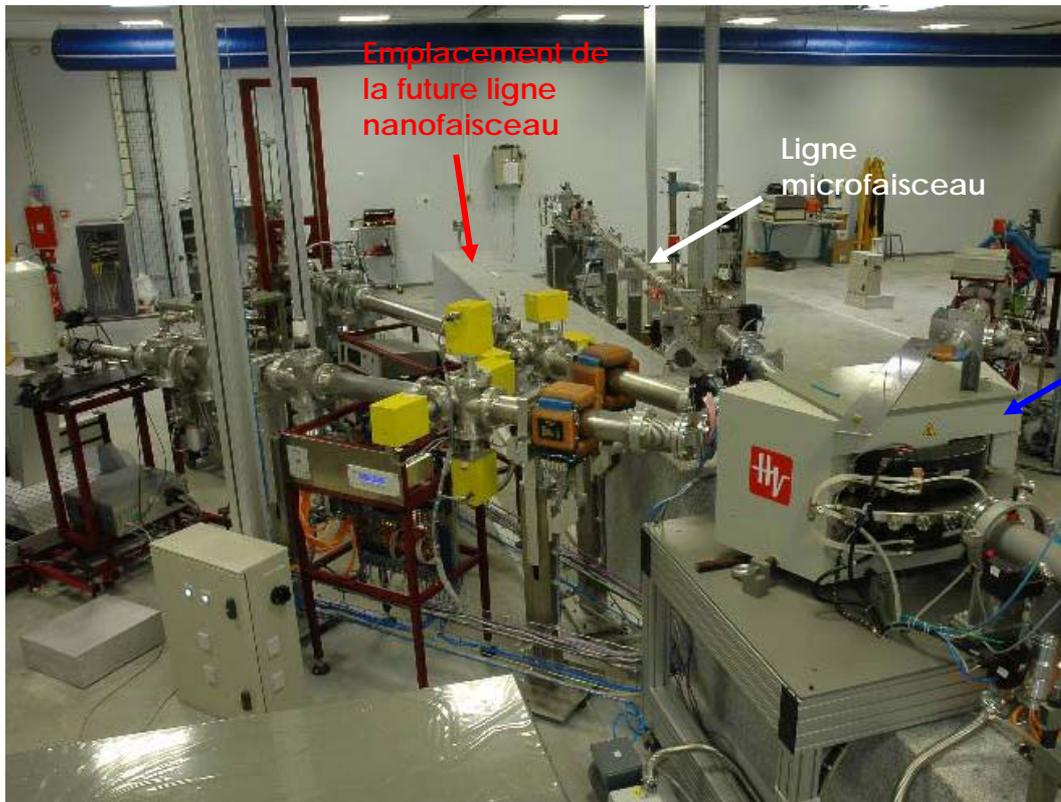
Par ailleurs, de ces contraintes drastiques sur les conditions d'irradiation, il ne devait pas résulter de stress trop important sur les populations cellulaires. Ces dernières devaient donc rester dans des conditions physiologiques satisfaisantes afin de ne pas introduire de biais dans les résultats obtenus. Les cellules devaient donc être irradiées immergées dans leur milieu et

A



Accélérateur de
la plateforme
AIFIRA

B



Emplacement de
la future ligne
nanofaisceau

Ligne
microfaisceau

Aimant de
commutation

Figure 8 : L'accélérateur de la plateforme AIFIRA (A) et les différentes lignes de faisceau (B). La ligne microfaisceau dans sa configuration analyse se situe à droite du bloc de granit qui supportera la future nanosonde. Au premier plan, on distingue l'aimant de commutation qui permet d'injecter le faisceau dans les différentes lignes.

cultivées sur leur support de culture dans un puits scellé avec une température se rapprochant le plus possible de 37°C. En outre, les cellules devaient pouvoir être irradiées en nombre suffisant, soit plusieurs milliers, dans un temps limité afin de ne pas trop prolonger le temps passé en dehors de l'incubateur. Ce cahier des charges a été respecté point par point.

b. Les accélérateurs

L'accélérateur Van de Graaff

La première partie de cette étude a été réalisée alors que la ligne microfaisceau était installée auprès de l'ancienne machine du CENBG, un accélérateur électrostatique simple étage de type Van de Graaff 4MV (KN4000) de la société HVEE (High Voltage Energy Engineering, Pays-Bas). Cette machine délivrait un faisceau vertical (H^+ , D^+ , He^+) avec des propriétés de stabilité en énergie correctes pour une machine classique ($\Delta E/E$ inférieur à 10^{-3}). Associée à cette stabilité en énergie, une bonne brillance de la source d'ions (de type RF) permettait de délivrer un faisceau primaire en mode continu, suffisamment stable pour permettre la mise en œuvre d'un microfaisceau. Les caractéristiques de ce dispositif sont exposées dans la publication de Llabador *et al.*, 1990.

Le faisceau vertical délivré à la sortie de l'accélérateur était ensuite défléchi par un dipôle magnétique vers la ligne d'intérêt. Lors du passage à travers un tel aimant « d'analyse », les ions sont triés selon leur rapport charge/masse. Le rayon de courbure de leur trajectoire circulaire dépend directement de leur énergie, ce qui permet, en outre, une régulation de la tension d'accélération.

L'accélérateur SINGLETRON de la plateforme AIFIRA

La fin de ce travail de thèse a été réalisée sur la plate-forme AIFIRA. Le nouvel accélérateur implanté est de type Singletron™ in-line 3,5 MV, une machine électrostatique simple étage fournie par le constructeur HVEE. Une vue est présentée sur la figure 8. Cette machine a été développée pour des applications nécessitant de très bonnes stabilités en énergie associées à des brillances de faisceau élevées. En particulier pour l'obtention de micro- et nano-faisceaux, les optiques de focalisation des ions voient leurs performances limitées par des aberrations au même titre que les systèmes centrés en optique dans le cas des faisceaux de photons. Afin de limiter les aberrations chromatiques, l'une des sources les plus pénalisantes, le faisceau doit être au plus près de la monochromaticité, ce que l'on peut traduire ici par une très bonne résolution en énergie.

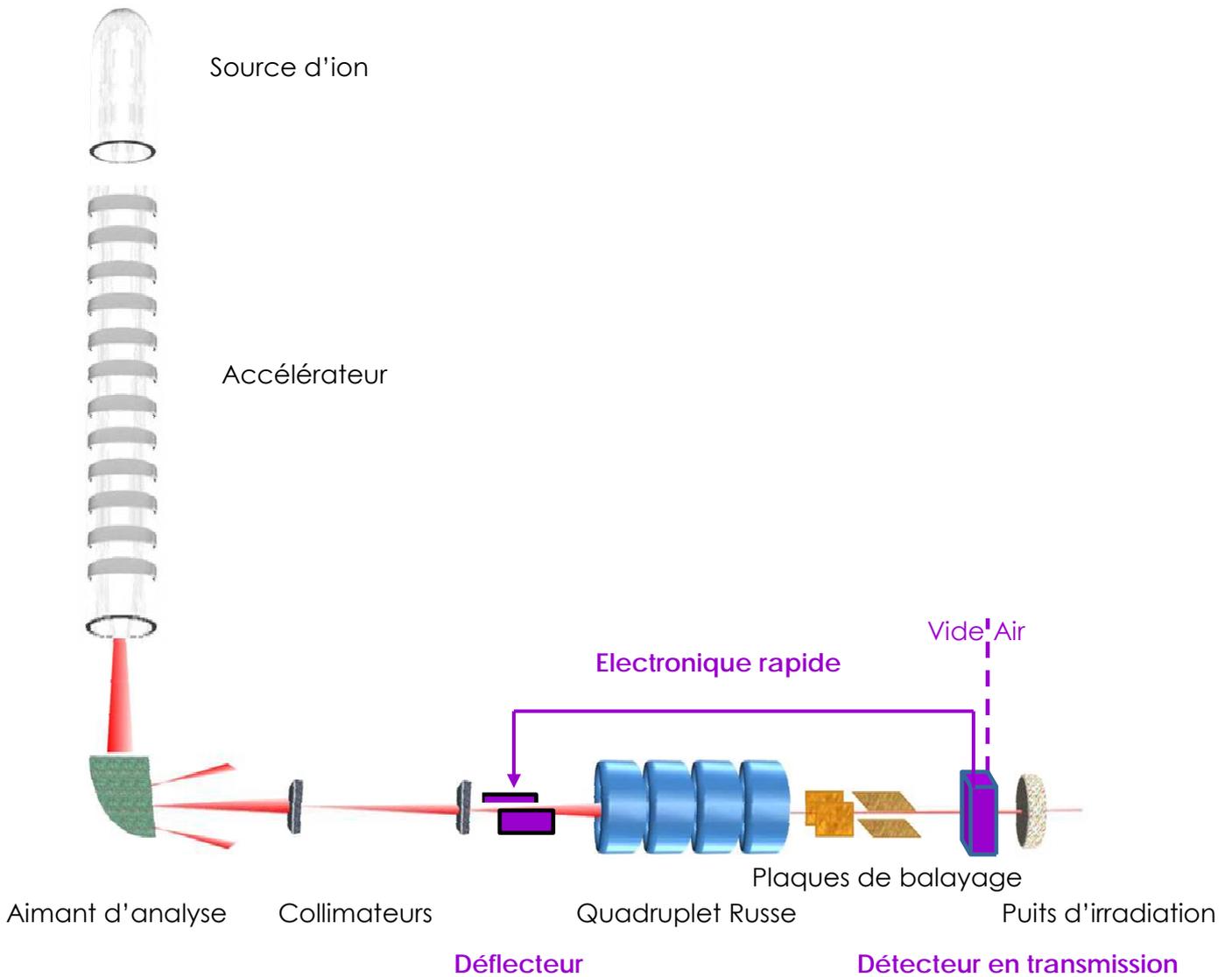


Figure 9 : *Schéma de principe de la microsonde du CENBG* de la source d'ions à la cible. Le faisceau délivré à la sortie de l'accélérateur est guidé vers la ligne microfaisceau à l'aide d'un aimant d'analyse permettant de sélectionner les ions d'intérêt. Un ensemble de collimateurs, de lentilles quadrupolaires magnétiques (organisées en quadruplet) permettent d'obtenir un faisceau micrométrique sous vide. Des plaques de balayage défléchissent le faisceau dans le plan transverse pour balayer l'échantillon. En configuration irradiation, la chambre d'analyse est complétée par l'étage d'irradiation contenant le puits à irradier, ainsi qu'un détecteur à gaz qui, tout en contrôlant le nombre de particules délivrées, permet d'extraire le faisceau à l'air. Dès que le nombre de particules désiré est atteint, le faisceau est défléchi par une électronique rapide couplée à des plaques électrostatiques de déviation, situées en amont.

L'accélérateur installé est équipé d'un générateur de tension purement électronique (de type Cockroft-Walton) qui permet d'atteindre une résolution $\Delta E/E$ de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$, ce qui se fait, actuellement, de mieux dans le domaine. Une source d'ions de type RF optimisée en terme de faisceologie produit les ions H^+ (protons), H^+ (deutons) et He^+ (α). Après accélération, la gamme des énergies accessibles s'étend de 0,3 à 3,5 MeV. La machine est horizontale et la ligne primaire, constituée par un aimant d'analyse ainsi que d'un aimant de commutation, permet d'injecter le faisceau de particules dans la ligne de faisceau d'intérêt.

c. La ligne microfaisceau

Dispositif de focalisation

A la sortie de l'aimant de commutation, sur la ligne microfaisceau, le faisceau d'ion est réduit à une taille micrométrique grâce à la combinaison de dispositifs de collimation et de focalisation. Par analogie avec un système centré en optique, une ligne de faisceau focalisé est composée d'optiques de focalisation organisée en multiplets, d'un objet brillant situé en amont et de collimateurs d'ouverture permettant de contrôler la divergence du faisceau dans l'espace objet. Les optiques donnent une image de ce point objet dans le plan de la cible avec un facteur de grandissement qui est de 1/10 sur la ligne du CENBG. En d'autres termes, si on définit un objet brillant en collimatant le faisceau primaire à l'aide d'un collimateur circulaire de 10 μm de diamètre, l'image au premier ordre (sans tenir compte des aberrations) a un diamètre de 1 μm qui correspond à la résolution du faisceau obtenu. Sur notre dispositif, l'optique est constituée de quatre lentilles quadrupolaires magnétiques. Les collimateurs ont eux un diamètre variant de 5 à 50 μm , ce qui permet aujourd'hui d'obtenir des tailles de faisceaux sous vide mesurées entre 0,7 et 5,5 μm dans le plan de la cible.

Depuis le transfert de l'activité sur la plateforme AIFIRA, les performances du dispositif ont été améliorées en termes de résolution spatiale, d'intensité de faisceau, de stabilité dans le temps et de fiabilité. Cela est non seulement dû à l'accélérateur lui-même, mais également à la structure du bâtiment spécialement étudiée pour éviter toute perturbation extérieure en termes de vibrations mécaniques ou de contrainte thermique. Les lignes de faisceau focalisées (la microsonde ainsi que la future nanosonde) sont en effet placées sur une dalle très rigide et massive de 200 tonnes montée sur des pieux ancrés à 18 mètres de profondeur sur le substratum : elles sont ainsi mécaniquement isolées du reste du bâtiment.

La chambre d'analyse sous vide

En configuration analyse et cartographie chimique, les échantillons à analyser (coupes de tissus ou cellules cultivées sur supports minces) sont placés dans une chambre d'analyse sous vide. Cette enceinte se situe dans la partie terminale de la ligne microfaisceau et est équipée de différents détecteurs (particules, photons X). Cette chambre initialement prévue

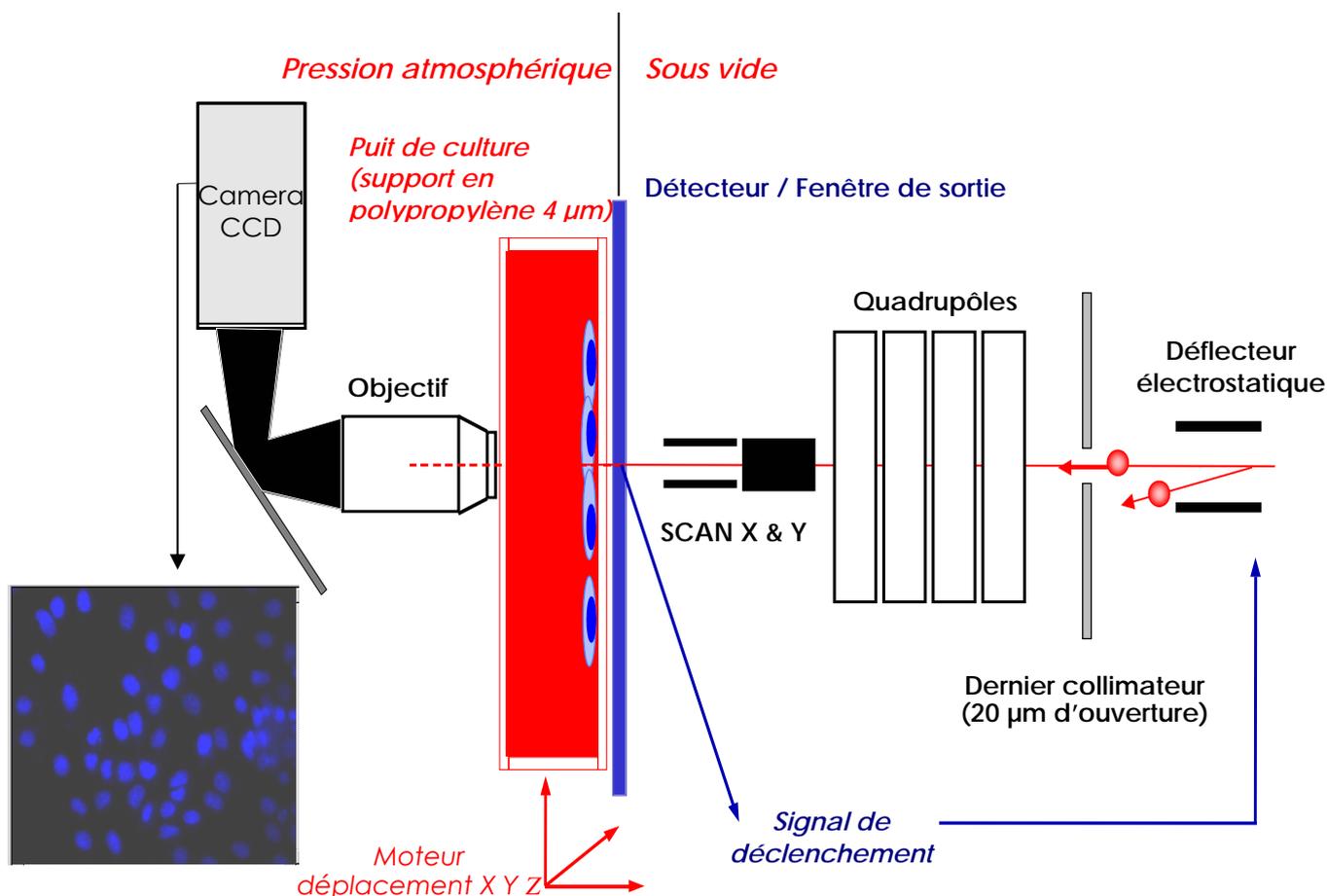


Figure 10 : **Principe de fonctionnement de l'étage d'irradiation.** La caméra CCD directement reliée à l'objectif du microscope permet d'acquérir l'image des cellules cultivées sur un film de polymère en polypropylène de 4 μm d'épaisseur. Les cellules sont repérées grâce à un marqueur spécifique (sur l'image, un marquage nucléaire au Hoechst³³³⁴²) puis le logiciel de contrôle calcule les coordonnées du barycentre de chaque noyau cellulaire afin de définir la cible. Chaque noyau est ensuite placé dans l'axe du faisceau en déplaçant latéralement le puits de culture. Dès le nombre pré-déterminé de particules incidentes atteint, une électronique rapide permet de défléchir le faisceau en amont des quadrupôles.

pour les analyses sous vide permet également une première phase de réglage fin du faisceau en début d'expérience d'irradiation cellulaire.

Deux microscopes optiques permettent de visualiser l'échantillon : l'un, en transmission, présente un fort grandissement ($X 100$) et est couplé à une caméra haute sensibilité ; l'autre en visualisant l'échantillon par l'avant, permet d'effectuer un positionnement précis. La position et la forme du faisceau peuvent être visualisées en temps réel en positionnant un quartz luminescent dans le plan de focalisation des lentilles magnétiques.

Selon la technique utilisée pour l'analyse, différentes configurations des détecteurs sont possibles. Ainsi, pour les analyses couplées PIXE (Particle Induced X-ray Emission) / RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry), deux détecteurs sont utilisés : une jonction Si(Li) pour détecter les photons X et un détecteur en Silicium implanté pour la détection des particules rétrodiffusées. Il est également possible d'effectuer des images en densité de coupes de tissus ou de cellules individuelles par microscopie ionique en transmission (STIM : Scanning Transmission Ion Microscopy) grâce à un détecteur en Silicium implanté, placé dans l'axe du faisceau, derrière l'échantillon (Moretto *et al.*, 1996).

d. La ligne microfaisceau en mode irradiation

Contrôle du faisceau en mode ion par ion

Une des parties les plus délicates du développement consistait à contrôler le faisceau particule par particule. Il fallait pour cela placer un détecteur en transmission avant le puits de culture sans trop dégrader la résolution spatiale (Moretto *et al.*, 2001; Barberet *et al.*, 2004 ; Barberet *et al.*, 2005). Après le passage du nombre prédéterminé de particules, une électronique rapide permet d'escamoter le faisceau grâce à une paire de plaques haute tension placée trois mètres en amont sur la ligne. Le temps de réponse du système est inférieur à la μs . Afin d'éviter tout risque d'impacts multiples et permettre d'isoler facilement chaque particule, la fluence du faisceau primaire est limitée jusqu'à environ 2 000 ions/sec en employant un collimateur d'ouverture de 10 μm de diamètre avant l'optique de focalisation.

Le détecteur est un détecteur à gaz de type compteur proportionnel travaillant sous une faible pression d'isobutane (10 mbar) et dans lequel les ions effectuent un parcours de 2,5 mm de long. La fenêtre de sortie du détecteur fait également office de fenêtre d'extraction à l'air de la ligne de faisceau. Un Si_3N_4 de 1 mm^2 de surface et de 150 nm d'épaisseur, sert de transition entre le gaz et l'air. Le principe de fonctionnement est résumé sur la figure 10.

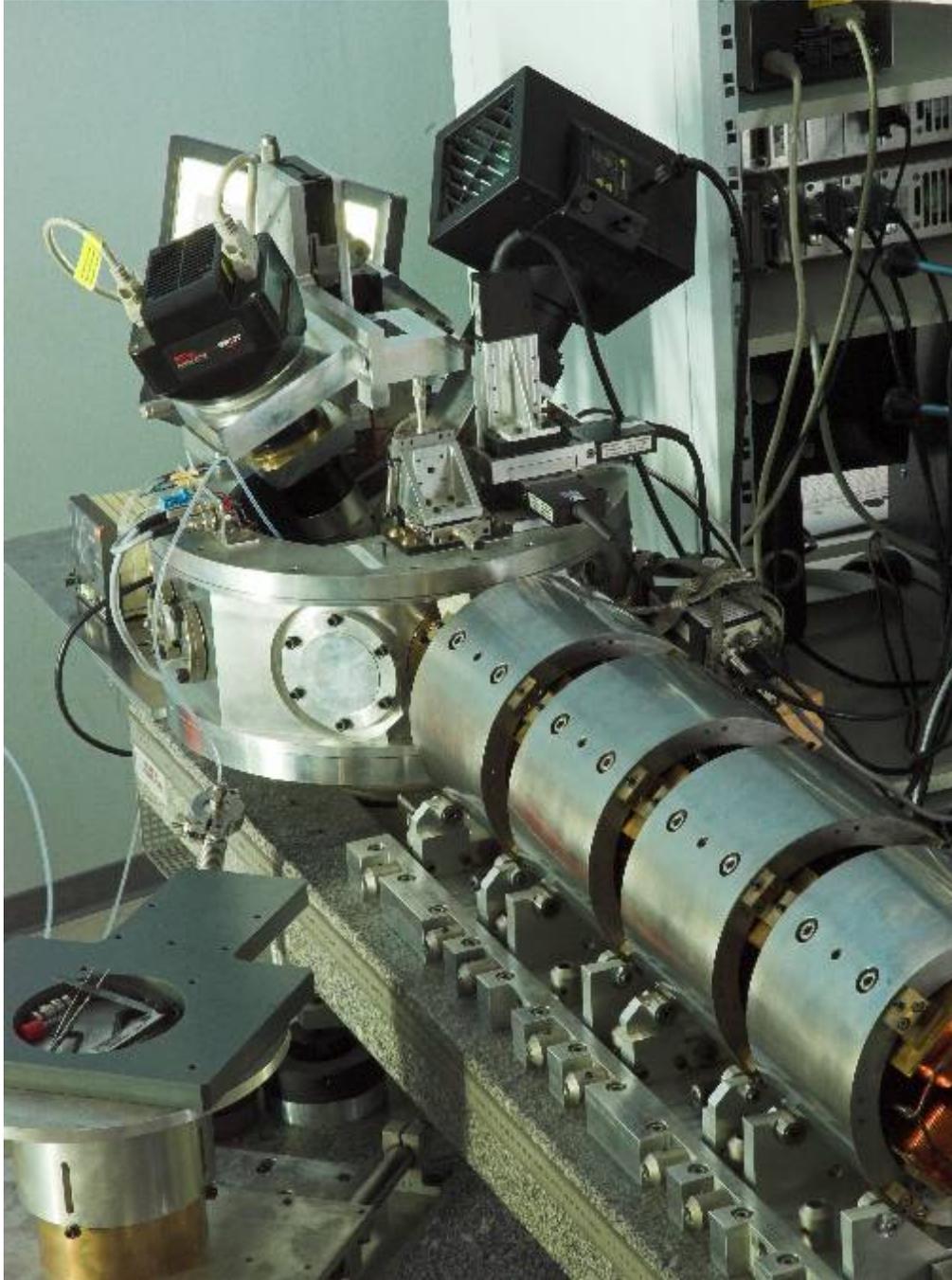


Figure 11 : *La ligne microfaisceau du CENBG.* Au premier plan, les quadrupôles permettent la focalisation du faisceau avant son arrivée dans la chambre d'irradiation située au second plan. La chambre est équipée d'une caméra CCD refroidie au second plan à gauche et d'une lampe UV à droite. Les platines de déplacement du puits de culture et de positionnement de l'étage d'extraction sont visibles. L'objectif du microscope en épifluorescence (non visible) est situé dans le fond de la chambre.

L'étage d'irradiation

En configuration d'irradiation cellulaire, la partie supérieure de la chambre d'analyse sous vide est remplacée par un étage d'irradiation qui vient s'insérer à l'intérieur de la chambre comme une chemise (figure 11). Le passage de la configuration chambre d'analyse sous vide à la configuration irradiation se réalise en une heure environ (Barberet, 2004).

Afin de repérer les cellules, l'étage d'irradiation est équipé d'un microscope d'épifluorescence couplé à un support motorisé qui permet une mise au point contrôlée à distance sous observation vidéo. Un objectif Olympus UPLFL 10X est généralement utilisé. L'acquisition vidéo des champs du microscope est réalisée par une caméra CCD refroidie par effet Pelletier (Spot RT, Diagnostic Instruments). En fonction du type de marquage utilisé pour le repérage des noyaux, protéine -GFP ou colorant vital Hoechst³³³⁴², des filtres permettent de sélectionner soit la partie visible, soit la partie UV du spectre d'une lampe à vapeur de mercure (Olympus U-ULH 100W) : filtre Olympus U-MWIBA2 (longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission à 509 nm) ou filtre Olympus U-MWNIB2 (excitation à 343 nm et émission à 483 nm).

Enfin, un support de puits de culture, motorisé selon les trois axes xyz (ESP300 Motion Controller, Newport), permet de positionner mécaniquement des cellules avec une précision de l'ordre du micromètre devant le faisceau. La figure 11 montre une photographie de cet étage d'irradiation.

A la sortie du détecteur, les ions ont un parcours dans l'air d'environ 200 μm avant d'entrer en contact avec la feuille de polypropylène de 4 μm d'épaisseur qui constitue le support de culture des cellules. Ce dispositif permet l'irradiation de près de 3 000 cellules en 1h30, avec une résolution spatiale qui permet de positionner 90% des cellules dans un cercle de diamètre inférieur à 10 μm , après extraction à l'air (sous vide, le diamètre du faisceau est de l'ordre du micromètre). Le principe de fonctionnement du microfaisceau est résumé sur la figure 9.

2. L'application μrad

La gestion des différents instruments et procédures a été centralisée dans un seul programme de contrôle commande (μrad) écrit en langage Visual Basic et développé sur la base du logiciel Image Pro Plus (Media Cybernetics) pour la partie reconnaissance de forme (Barberet *et al.*, 2005).

a. Acquisition de la mosaïque

Dans l'étude que nous avons menée, la monocouche cellulaire à irradier comportait en général plusieurs milliers de cellules réparties sur plusieurs champs de microscope. Pour avoir une vue générale du puits, la juxtaposition de l'ensemble des champs permet de former ce que nous avons appelé la « mosaïque ». En automatisant en grande partie l'irradiation, le programme *ulrad* permet l'acquisition de cette mosaïque. A l'intérieur de chaque champ, les noyaux des cellules marqués, soit par la protéine *-GFP*, soit par le colorant vital *Hoechst³³³⁴²*, forment une image monochrome qui est traitée ensuite par un programme de reconnaissance de forme.

b. Traitement des images et irradiation

Champ par champ, le système de reconnaissance extrait le bruit de fond parasite par des techniques de filtrage, optimise le contraste, et améliore la séparation des noyaux des cellules en contact. Le programme identifie ensuite chaque noyau cellulaire, calcule et mémorise les coordonnées de son barycentre. L'image de chaque champ peut être enregistrée pour pouvoir le revisiter lors de l'analyse de l'expérience après irradiation. Les cellules non reconnues automatiquement peuvent être marquées manuellement.

Après la phase de reconnaissance d'un champ, l'irradiation est réalisée en déplaçant chaque cellule dans l'axe du faisceau. Lorsque le nombre de particules prédéterminé est atteint, le faisceau est défléchi par les plaques de déflexion rapides et une nouvelle cellule est positionnée. Lorsque toutes les cellules d'un champ sont irradiées, un nouveau champ de la mosaïque est analysé (Barberet, 2004).

3. Les puits de culture

Le design des puits et la définition des conditions de culture associées ont certainement été l'un des points délicats de ce développement. Nous avons dû faire face à un certain nombre de contraintes posées d'une part par les conditions de culture et d'autre part par les techniques utilisées pour l'imagerie, le ciblage et la reconnaissance automatique des cellules :

(i) les cellules doivent adhérer sur un support pour éviter tout mouvement lors de la phase d'irradiation. En fonction du type cellulaire étudié, une bonne adhésion des cellules doit être obtenue, éventuellement avec l'aide d'un facteur d'adhésion.

(ii) le support doit être suffisamment mince afin de ne pas dégrader la résolution spatiale du faisceau, ni l'énergie des ions incidents. Pour le repérage des cellules cibles, il doit être transparent et permettre un éclairage en transmission en lumière visible.

(iii) le matériau employé comme support ne doit pas émettre de lumière de fluorescence sous illumination UV afin d'éviter tout bruit de fond lors du repérage des cellules marquées par le colorant vital Hoechst.

(iv) les matériaux employés pour le support de culture, la boîte elle-même et les joints d'étanchéité ne doivent pas être cytotoxiques.

(v) afin d'éviter tout stress supplémentaire pour les cellules dû à une possible déshydratation, la géométrie des puits doit être compatible avec une conservation du milieu lors de l'irradiation. Cependant, l'épaisseur de ce milieu doit rester assez faible pour permettre une bonne visualisation des cellules avec un objectif de distance frontale raisonnable et limiter la diffusion des photons de ce milieu. Pour la même raison, le puits doit être fermé par une lame transparente et mince.

(vi) pour des questions de mise au point du microscope sur la totalité du champ étudié, la pression dans le puits doit être ajustable afin d'éviter une courbure trop importante du support de culture. La lame de liquide formée par le puits de culture doit ainsi être la plus proche possible d'une lame à faces parallèles (entre le support de culture et la lame qui scelle le puits) afin d'éviter toute erreur de visée due à des problèmes de décalage optique.

En matière de support de culture, trois polymères disponibles en feuille de quelques micromètres d'épaisseur ont été testés, un film de Mylar de 2,5 μm d'épaisseur (ES301025, Goodfellow), un film de polypropylène de 4 μm d'épaisseur (PP301040, Goodfellow) et un film de polycarbonate de 2 μm d'épaisseur (CT301020, Goodfellow). Les essais basés sur l'observation de l'adhésion des cellules sur les différents supports présélectionnés, ainsi que sur l'émission de lumière parasite lors de l'éclairage UV, ont permis de choisir le polypropylène comme support de culture. Pour optimiser la phase de culture, nous avons dû choisir parmi différents facteurs d'adhésion : polylysine, gélatine de porc 2% (Sigma), sérum de veau fœtal (Pan Biotech) ou Cell-Tak (BD Biosciences). Nous avons finalement opté pour le traitement des puits de culture par une solution de Cell-Tak, un produit d'ailleurs utilisé par beaucoup d'équipes travaillant sur de tels dispositifs. Pour l'adhésion de nos types cellulaires sur film de polypropylène, une concentration de 2,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a donné les meilleurs résultats.

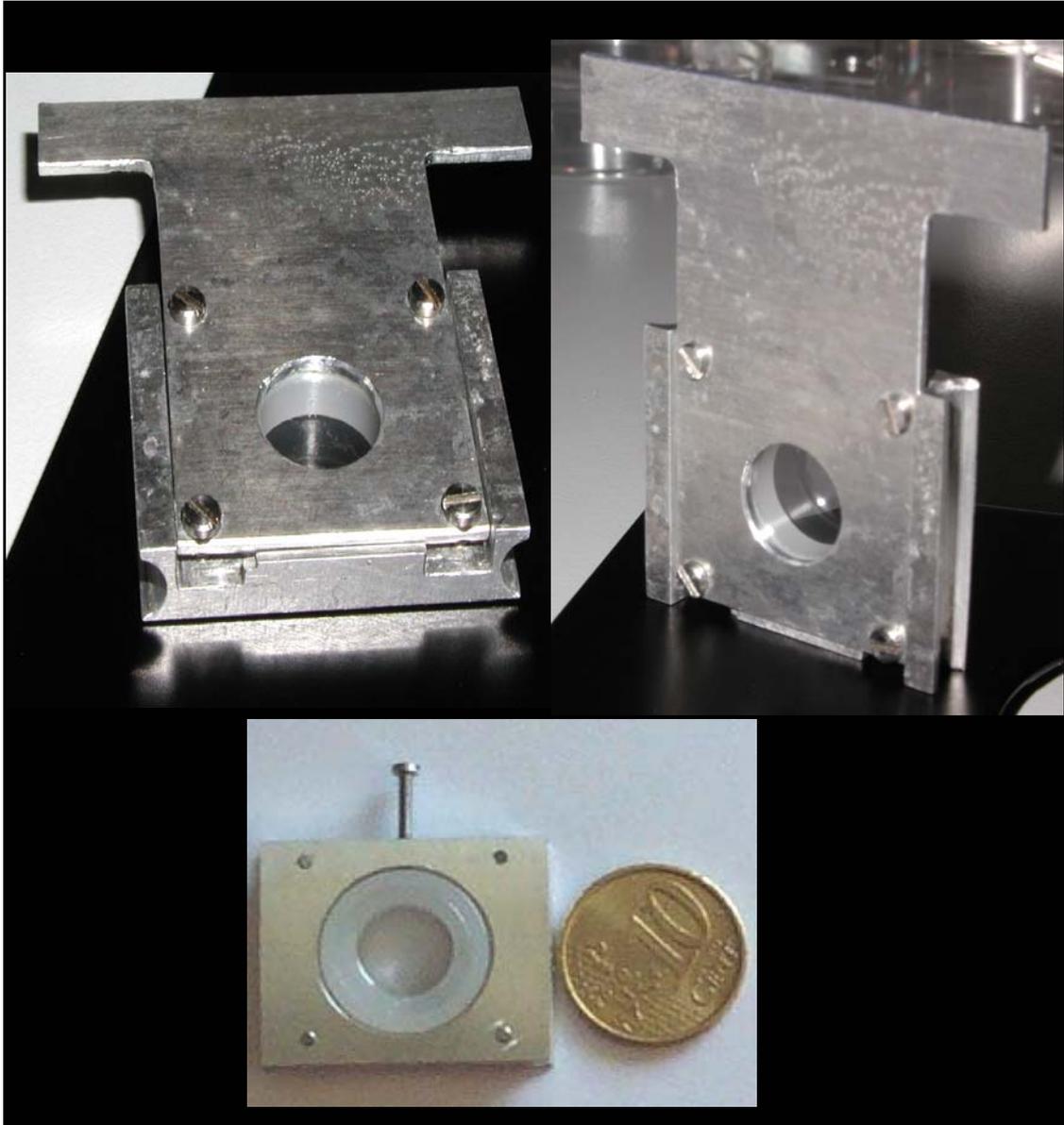


Figure 12 : *Puits de culture monté sur son support d'aluminium.* Il est conçu pour s'insérer sur le bras porte échantillon utilisé lors de la phase d'irradiation cellulaire : en haut, la face arrière du puits clos par une lamelle de verre ; en bas, la face avant du puits est fermée par une feuille de polymère mince affectant le moins possible le parcours des particules.

Le puits finalement retenu présente une surface de culture circulaire de 10 mm de diamètre et une profondeur de 3 mm. Il est fermé d'un côté par une feuille mince de polypropylène tendue à l'aide d'un anneau et sur laquelle adhèrent les cellules (figure 12). Au cours de la phase d'irradiation, les cellules sont maintenues dans un milieu de culture dans le même puits où elles ont été cultivées. Le puits scellé est inséré en position verticale sur le support motorisé et placé au plus près de la fenêtre d'extraction du faisceau à l'air.

Afin de s'assurer de la non toxicité des différents matériaux constituant des puits et de vérifier que ces derniers ne libèrent pas de substances cytotoxiques dans le milieu, des cellules ont été cultivées en conditions classiques, à 5 000 cellules/cm², en présence de chaque élément constitutif du puits préalablement lavé avec soin. Pour les matériaux choisis, aucun effet délétère, ni stress particulier n'a été constaté sur l'état sanitaire des cellules observées en microscopie. Le matériau utilisé pour l'usinage des puits est du polyéthylène haute densité livré en barreau de 1 cm de diamètre (Cestilène®, CAPLAST, France). Avant toute utilisation, les puits peuvent être stérilisés sans problème particulier aux ultra-violets pendant 30 minutes.

Chapitre IV

Matériels et méthodes

Notre projet de recherche visait à déterminer précisément les conséquences moléculaires et cellulaires induites lors d'une irradiation à faible dose de particules α . Une des principales difficultés lors de l'irradiation des cellules consistait à reconnaître les noyaux à irradier sans utiliser de méthode pouvant perturber les cellules. Des lignées cellulaires qui expriment une protéine nucléaire chimère fluorescente (H2B-GFP) ont donc été développées afin de permettre le repérage du noyau sous un éclairage dans les longueurs d'onde visible et de suivre ultérieurement leur comportement *in situ* et *in vivo* en réponse à une irradiation contrôlée et ciblée.

Le développement d'une telle lignée présente un triple intérêt puisqu'il autorise : **(i)** la reconnaissance spécifique de structures cellulaires d'intérêts (la chromatine pour la protéine H2B) lors de la phase d'irradiation, ce qui permet une irradiation spécifique de ces régions sub-cellulaires ; **(ii)** l'analyse des conséquences moléculaires et cellulaires causées par les rayonnements ionisants ; **(iii)** l'étude *in situ*, *in vivo* et dans le temps de la cellule.

Au cours de ces travaux, deux lignées ont été développées. Le choix de ce matériel biologique a été basé sur la géométrie cellulaire (large noyau, géométrie homogène), la disponibilité (prolifération « infinie » et monocouche), ainsi que sur l'origine tissulaire de ces cellules (probabilité d'être exposée à une irradiation naturelle).

1. Lignées cellulaires d'intérêt

a. Les lignées de kératinocytes humains

HaCaT

La lignée cellulaire HaCaT est une lignée de kératinocytes d'origine Humaine provenant de cellules d'un **A**dulte et dont la culture est sensible à la concentration en **C**alcium ainsi qu'à la **T**empérature. Etablie en 1988 par Boukamp *et al.*, elle est la première lignée cellulaire de kératinocytes humains obtenue par transformation spontanée à partir de cultures primaires. De nombreux travaux ont permis de caractériser cette lignée cellulaire et montré qu'elle a conservé ses caractéristiques de prolifération ainsi que ses propriétés « tissulaires » intrinsèques, comme la capacité de générer un épiderme de structure ordonnée *in vitro*.

Au cours de la caractérisation de cette lignée transformée spontanément, il a été montré que la lignée HaCaT développe une totale indépendance vis à vis de la concentration de calcium et de la température, que l'efficacité de clonage et le taux de croissance ne montrent pas d'altération significative au-delà des 140 passages et que, bien que transformée, elle ne présente pas de caractère tumorigène et invasif.

Le caryotype des cellules HaCaT a été déterminé très tôt dans la procédure de développement, mais également pendant la phase de propagation. Des altérations

numériques et structurales du caryotype ont été mises en évidence. La majorité des cellules est aneuploïde (44 chromosomes) avec des monosomies totales ou partielles de chromosomes. Toutes les métaphases étudiées montrent l'absence de chromosome Y (XO) avec des monosomies partielles pour le bras court des chromosomes 3, 9, et 4 et une trisomie du bras long du chromosome 9. Trois altérations chromosomiques majeures ont été également mises en évidence : t(3q4q) ; gain (9q) ; del(4q28)) dans 100% des métaphases, et permettent d'indiquer clairement l'origine clonale de la lignée HaCaT. D'autres altérations cytogénétiques impliquant les chromosomes 1, 4, 6, 15, 17, 18, 22 ont été décrites (Boukamp *et al.*, 1997). Associée à cette forte instabilité génétique, il a été démontré que la télomérase présente des taux d'expression et d'activité élevés. Outre le remaniement caryotypique et le fort taux d'activité de la télomérase, la lignée HaCaT se caractérise par des mutations ponctuelles des deux allèles du gène p53. Ces mutations correspondent à la transition d'un C ▶ T au codon 179 et aux modifications de base CC ▶ TT aux codons 281 et 282 (Lehman *et al.*, 1993). Ces deux mutations se situent dans des « hot spots » typiques associés aux expositions à des rayonnements ultra-violet. Il est intéressant de noter que la biopsie initiale qui a permis d'établir la lignée HaCaT a été réalisée sur une région de peau exposée au soleil. Il est donc possible de penser que ces mutations se sont produites avant la mise en culture et qu'elles ont participé au processus d'immortalisation, sans toutefois en être l'unique cause (la transfection de mutants p53 de lignées de kératinocytes humains ne suffit pas à leur immortalisation). Les auteurs ont donc avancé l'hypothèse que l'immortalisation de la lignée HaCaT est le résultat d'une combinaison de facteurs : mutations p53 (UV dépendantes), variations de concentration calcique, élévation de la température.

Enfin, cette lignée se prête aisément aux expériences de transfection, et ce, avec une grande reproductibilité et une grande efficacité.

Combinées à une géométrie cellulaire étalée et régulière, une prolifération infinie et monocouche ainsi qu'à une origine tissulaire de la peau, ces caractéristiques en ont fait un modèle d'étude de grand intérêt pour les recherches en dermatologie notamment (Boukamp, 1988 ; Harle-Bachor & Boukamp, 1996 ; Boukamp *et al.*, 1997 ; Fusenig & Boukamp, 1998).

Kératinocytes primaires humains

La lignée commerciale de kératinocytes primaires humains (Cat. No. 12332-011, Invitrogen) a été établie à partir de prépuces de nouveaux-nés selon une technique de séparation de la muqueuse, de l'hypoderme et d'une partie du derme. Les kératinocytes ont été « libérés » de l'épiderme par un traitement avec de la trypsine, et ensuite cultivés en milieu défini frais. Cette lignée a été établie et cultivée avec du milieu kératinocyte défini – SFM (« Serum-Free Keratinocyte Medium for the Culture of Human Keratinocytes », Cat. No. 10744-019, Invitrogen) supplémenté en Sérum de Veau Foetal (10 %, v/v) (lot 241111, PanBiotech

Dutscher) et de 100 µg/ml de streptomycine/pénicilline (Cat. No. 4333, Sigma), à 37°C, 5% de CO₂ et en atmosphère humide.

b. Les conditions de culture

Les milieux de culture

Les lignées cellulaires HaCaT sont généralement cultivées dans du milieu « DMEM » (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Cat. No. 10744, Invitrogen) additionné de 10 % (v/v) de Sérum de Veau Foetal (lot 241111, PanBiotech Dutscher), de 2,5 mM de L-Glutamine (Cat. No. 21051-040, Invitrogen), 10 mM Hépès (Cat. No. H0887, Sigma) et de 100 µg/ml de streptomycine/pénicilline, à 37°C, 5% de CO₂, en atmosphère humide.

La lignée de kératinocytes primaires humains est, en revanche, beaucoup plus exigeante vis à vis du milieu de culture et est cultivée dans du milieu kératinocyte-Défini dit « défini – SFM » (« Serum-Free Keratinocyte Medium for the Culture of Human Keratinocytes » Cat. No. 10744, Invitrogen), supplémenté de facteurs de croissance, additionné de 10 % de Sérum de Veau Foetal (PanBiotech, Dutscher), de 100 µg/ml de streptomycine/pénicilline (Cat. No. 4333, Sigma), à 37°C, 5% de CO₂, en atmosphère humide.

La culture de « routine »

Classiquement, les populations cellulaires sont maintenues en culture dans les conditions de culture établies selon Freshney (Freshney, 2000). Tous les 3 jours, le milieu de culture est éliminé, après un rinçage avec du milieu de culture défini dépourvu en sérum afin d'éliminer tous les « débris » et « déchets » cellulaires, 3 ml de milieu « défini » frais complet est ajouté pour une flasque de 25 cm².

Afin de maintenir les populations cellulaires en phase exponentielle de croissance, dès qu'elles approchent de l'état de confluence, elles subissent un passage après avoir été remises en suspension par simple traitement à la trypsine-EDTA (0,05% (v/v) et 0,5 mM respectivement - Cat. No. 25200072, Invitrogen) 12 minutes à 37°C. Après centrifugation 10 min à 1400 tours/minute à température ambiante, le culot cellulaire est repris dans du milieu défini complet correspondant et une dilution au 1/3 est ensuite étalée dans une nouvelle flasque de culture.

Au cours de notre étude, le nombre de passages des différentes lignées cellulaires est compris entre 8 et 20 pour les lignées HaCaT et les lignées transgéniques correspondantes, de 1 à 4 pour les kératinocytes primaires humains.

c. Transfection

Le vecteur d'expression pEGFPN1-H2B-GFP

L'irradiation des cellules par microfaisceau nécessite également l'utilisation de marqueurs afin de cibler les cellules. Dans un premier temps, l'organelle ciblée de façon privilégiée est le noyau : **(i)** l'effet direct le plus facilement identifiable est la génération de cassures double brin de l'ADN ; **(ii)** la résolution du microfaisceau inférieure à 10 µm est compatible avec la taille nucléaire ; **(iii)** la distinction des compartiments nucléaire et cytoplasmique est très aisée. Afin de repérer la structure de la chromatine, la méthode la plus simple est la microscopie en épifluorescence qui bénéficie de la découverte de nombreuses molécules fluorescentes pouvant se fixer à l'ADN avec une grande affinité. Au sein des différents groupes dotés de microfaisceaux, le marquage utilisé de manière courante pour cette reconnaissance est basé sur l'illumination aux ultra-violets et le Hoechst³³³⁴². Ce marqueur dit vital, est un intercalant à l'ADN du niveau du petit sillon avec une grande affinité pour les bases AT (Davis & Bardeen, 2003).

Cependant, cette fixation au niveau de la molécule d'ADN peut interférer avec l'action des protéines nucléaires liées à l'ADN, comme par exemple, la topoisomérase. Elle génère ainsi des lacunes dans la réparation des dommages de l'ADN par altération de la dynamique des protéines interagissant avec l'ADN (Smith *et al.*, 1990).

De plus, cette association présente l'inconvénient de générer des changements photosensibles dans les compartiments biologiques, et plus particulièrement des altérations génétiques telles que la production de dimères de thymine, ou encore de cassures simple brin/double brin par production de composés réactifs comme les radicaux libres (Moné *et al.*, 2001).

Par ailleurs, l'utilisation de Hoechst³³³⁴² à haute concentration et durant des temps d'expositions croissants, entraîne la formation de « cross-link » entre les protéines, et/ou l'ADN (Davis & Bardeen, 2003) générant ainsi des artefacts de réponses lors d'expériences *in vivo*.

L'objectif du microfaisceau réside dans l'étude des effets des faibles doses de rayonnements ionisants. Il est donc indispensable de restreindre l'utilisation simultanée d'un agent chimique et d'un agent physique dont les effets cumulés pourraient introduire un biais dans l'étude des effets d'irradiation, et ce, plus particulièrement à faible dose.

Le vecteur d'expression pEGFPN1-H2B-GFP, développé et caractérisé par Kanda *et al.* (1998), a été obtenu auprès de F. Ichas (IECB, Université Bordeaux II). La séquence nucléotidique codant pour la protéine humaine histone H2B (GenBank accession number X00088) a été fusionnée avec la séquence nucléotidique du gène GFP (« Green Fluorescent Protein »). (Zhong *et al.*, 1983).

Transformation et amplification de la construction plasmidique

200 µl de bactéries compétentes *E. coli* TOP 10 F' (Cat. No. C3030-06, Invitrogen) ont été transformés par choc thermique avec 5 µg du plasmide pEGFPN1-H2B-GFP puis cultivés dans 200 µl de milieu nutritif LB pendant 1 heure à 37°C sous agitation (320 tours/minute). L'amplification des populations bactériennes transformées se fait sur la nuit dans les mêmes conditions de culture dans un volume de 10 ml de milieu et sous pression de sélection avec de la kanamycine (30 µg/ml, Cat. No. K4000, Sigma).

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique sont réalisées selon le protocole « midi-prep » établi par les kits QIAfilter Plasmid Purification et QIAfilter Midi Kits (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique extrait est repris dans de l'eau et stocké à -20°C.

Un contrôle sur gel d'agarose (1% (w/v)) permet de vérifier l'intégrité et d'estimer le poids moléculaire de la construction plasmidique. La concentration en ADN plasmidique est déterminée par la mesure de la densité de optique d'après la loi de Beer-Lambert grâce à un analyseur photométrique Biophotomètre (Eppendorf) (mesure de l'absorbance à 260 nm).

Transfection

Les cellules HaCaT sont cultivées, en boîte de pétri (Ø 100 mm) dans le milieu de culture défini complet à 37°C, 5% de CO₂ et en atmosphère humide pendant 48 heures avant d'être transfectées. La confluence cellulaire est comprise entre 60-80%.

Avant la transfection, les cellules sont rincées puis incubées dans du milieu de culture (DMEM) sans sérum. L'agent transfectant (Exgen 500, Cat. No. ET0250, Euromedex) est dilué dans une solution de NaCl à 0,9% (w/v) avant d'être ajouté délicatement à la solution d'ADN contenant une quantité de 5 µg d'ADN plasmidique diluée dans une solution de 250 µl de NaCl 0.9 % (w/v). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est déposé sur les cellules pour une incubation de 2 heures à 37°C. 2 ml de milieu avec sérum sont ajoutés et les cellules sont mises en culture, à 37°C, 5% de CO₂, en atmosphère humide. Après 12 heures de culture, les cellules rincées au PBS 1X sont cultivées dans les conditions de culture de routine.

Sélection Clonale populations cellulaires transgéniques

Après 48 heures de culture en condition de routine, l'expression de la protéine a été contrôlée par analyse FACs. La sélection des cellules positives pour la GFP se fait grâce à l'addition de l'antibiotique G418 à 5 µg/ml (Cat. No. V7981, Promega) dans le milieu de culture. Afin de s'assurer de la parfaite sélection de la population transgénique et d'établir des populations clonales, un tri cellulaire est effectué.

7 jours après la transfection et sélection au G418, les cellules sont mises en suspension par traitement à la trypsine-EDTA (0,05% (v/v) et 0,5 mM respectivement - Cat. No. T3924, Sigma) 12 min à 37°C et sont resuspendues dans une solution de tampon PBS 1X (« Phosphate Buffer Saline »). Le tri cellulaire a été réalisé sur un cytomètre de flux FACSVantage SE (Becton Dickinson) selon la définition des critères : taille, granulométrie et fluorescence GFP. Ainsi, les cellules positives pour la GFP ont été sélectionnées et chaque cellule déposée dans un puits de plaque 96 puits.

Les cellules ont été cultivées dans les conditions de culture de sélection (+ G418). Le milieu est changé régulièrement. Après 15 jours de culture, des clones sont récupérés et amplifiés en flasques de 25 cm². Ainsi, 9 clones cellulaires appelés HaCaT/[H2B-GFP]Tg ont été établis.

Ces clones constituent désormais notre lignée cellulaire d'intérêt pour l'ensemble des expérimentations qui ont été réalisées au cours de cette thèse.

d. Caractérisation de la lignée HaCaT/[H2B-GFP]Tg

Expression et localisation subcellulaire de la protéine recombinante et homogénéité clonale

Les différentes populations clonales HaCaT/[H2B-GFP]Tg ont été caractérisées afin de vérifier que la présence du vecteur d'expression (site d'intégration, nombre de copie) et de la protéine recombinante (toxicité) n'induisent pas d'altérations métaboliques majeures. De plus, ces études ont permis de vérifier le niveau d'expression et la localisation sub-cellulaire de la protéine recombinante dans nos différentes populations clonales.

Ainsi, les cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg des différents clones ont été cultivées sur lamelles de verre pendant 24 heures au minimum. Après fixation des cellules à la paraformaldéhyde 1% (w/v) (Cat. No. P6148, Sigma), 15 min à température ambiante et 15 min de traitement au NH₄Cl (50 mM -Cat. No. A9434, Sigma), un marquage au Hoechst³³³⁴² (0,1 mg/ml) est réalisé (10 min). Les cellules sont montées entre lame et lamelle et observées sous microscope en épifluorescence (Leica DM R vidéo-microscope) à l'aide de filtres d'émission/excitation appropriés (GFP : $\lambda_{exc.}$:490 nm/ $\lambda_{em.}$: 510 nm) et d'un objectif Leica HCX PL APO CS 100X 1,4 oil -0,6 (Leica). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD haute définition (Coolsnap) contrôlée par le logiciel d'acquisition numérique MetaMorph (Molecular Devices Corp.).

Afin de vérifier que les populations clonales présentent un niveau d'expression homogène et de sélectionner les clones qui présentent le plus fort taux d'expression de cette protéine recombinante, une analyse par cytométrie en flux « Particle Analysing Systems » (Partec GmbH, Münster, Allemagne) équipé d'un laser monochromatique à argon ($\lambda = 488$ nm - Dako) associé au logiciel de traitement des données FloMax (Partec) a été réalisée.

Croissance cellulaire

Selon les bases expérimentales établies par Freshney (Freshney, 2000), 5 000 cellules de la lignée « parentale » de kératinocytes humains HaCaT et des clones HaCaT/[H2B-GFP]Tg ont été étalées en boîte 6 puits et cultivées dans les conditions classiques de culture afin de réaliser un comptage quotidien. Cet essai est mené pendant 15 jours consécutifs. Cette analyse a ainsi permis d'établir la courbe de prolifération cellulaire, d'obtenir le temps de division et le taux de prolifération pour les différentes lignées testées.

Réponse cellulaire vis-à-vis d'inducteurs apoptotiques

L'étude de la réponse cellulaire vis-à-vis d'inducteurs apoptotiques a été réalisée de manière indirecte, par l'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial (Δm). La chute du Δm est un évènement apoptotique précoce qui apparaît avant les modifications morphologiques nucléaires et précède la libération des molécules apoptogènes mitochondriales. Classiquement, les inducteurs apoptotiques induisent des altérations membranaires et donc la chute du potentiel transmembranaire (en nécrose ou apoptose secondaire ; Floryk & Houstek, 1999). L'utilisation de cations lipophiles, comme la Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester (TMRM, agent fluorescent) permet de « visualiser » ces altérations membranaires. En l'absence d'apoptose, les membranes mitochondriales des cellules sont indemnes et possèdent un potentiel élevé. Les molécules de TMRM peuvent pénétrer dans la mitochondrie. Par contre, lors d'une chute du potentiel mitochondrial membranaire, signe de l'altération de l'intégrité mitochondriale et de l'entrée de la cellule en apoptose, les molécules de TMRM ne peuvent pas pénétrer les mitochondries. Ainsi, l'analyse en cytométrie de ces populations cellulaires, et notamment la mesure de la fluorescence permet de définir la proportion de cellules TMRM positives versus négatives suite à différentes conditions proapoptotiques.

Deux types d'agents proapoptotiques ont été utilisés afin de tester la réponse des populations clonales HaCaT/[H2B-GFP]Tg : les ultra-violets (UV) et la staurosporine.

- Traitement « UV » : les lignées cellulaires ont subi un traitement aux ultra-violets à des doses bien définies et contrôlées comprises entre 0 à 1 000 mJ/cm² (UVCrossLinker, BioRad). 150 000 cellules sont étalées en boîte 6 puits et cultivées 48 heures dans les conditions de culture classiques. Les cellules sont rincées avec du PBS 1X, puis sont, en absence de milieu de culture, exposées aux UV ($\lambda = 254$ nm - UVCrossLinker, BioRad) à des doses comprises entre 0 et 1 000 mJ/cm². Après ce traitement, 1 ml de milieu de culture défini complet est rajouté et les cellules sont incubées 24 heures à 37°C, 5% de CO₂ et en atmosphère humide.

-Traitement « Staurosporine » : 150 000 cellules sont étalées en boîte 6 puits et cultivées pendant 48 heures dans les conditions de culture de routine. Puis, les cellules sont rincées (PBS

1X) avant addition de 1 ml de milieu de culture défini contenant de 0 à 10 μM de staurosporine pendant 24 heures. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% de CO_2 et en atmosphère humide.

Une fois les temps de traitement réalisés, les cellules sont alors rincées avec du PBS 1X avant d'être incubées pendant 30 minutes, à 37°C, 5% de CO_2 , en atmosphère humide avec 1 ml de solution saline extracellulaire (NaCl 130 mM, KCl 3.6 mM, Hépès 10 mM, NaHCO_3 2 mM, NaH_2PO_4 0.5 mM, MgCl_2 0.5 mM, CaCl_2 1.5 mM et Glucose 4.5 g/l) contenant 20 μM de verapamil et 200 nM de TMRM («*Tetramethyl rhodamine methyl ester*»). Les cellules sont ensuite rincées (PBS 1X) et reprises dans la solution saline extracellulaire additionnée de sérum 1 % (v/v) après un traitement de 3 minutes par 300 μl de trypsine à 37°C. Les cellules sont conservées à 4°C avant la mesure de la fluorescence à 488 nm par FACs (Dako). Les données en FACs (Dako) obtenues par le programme Flomax (Partec) permettent l'obtention des pourcentages de cellules TMRM positives (cellules vivantes) par rapport au nombre de cellules TMRM négatives (cellules mortes).

2. Les conditions d'irradiation

a. Préparation du puits d'irradiation et culture cellulaire

La feuille de polypropylène (Cat. No. PP301040, Goodfellow) est traitée par un facteur d'adhésion, le Cell-Tak (Cat. No. 354240, BD-Biosciences) à raison de 2.54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, pour permettre l'adhésion des cellules sur le support. En l'absence de traitement, la feuille de polypropylène ne permet pas d'obtenir une culture optimale pour notre étude.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont traitées à la trypsine et 3 spots indépendants de 1500 cellules contenues dans une goutte de 2 μl de milieu défini sont étalés dans le puits d'irradiation. Après deux heures d'incubation à 37°C, 5% de CO_2 et en atmosphère humide, les cellules adhèrent à la feuille de polypropylène traitée au Cell-Tak et sont alors maintenues en culture avec 300 μl de milieu défini complet. Les cellules sont ainsi maintenues dans ces conditions optimales de culture jusqu'à la phase d'irradiation. Après 24 heures de culture, les cellules sont adhérentes au support et présentent une forme étalée caractéristique des kératinocytes HaCaT. Les cellules sont regroupées et forment un amas cellulaire compact au niveau de chaque spot.

Quelques minutes avant l'irradiation, le milieu de culture est changé et remplacé par du milieu défini complet puis les puits sont fermés par ajout d'une lamelle de verre (un joint de silicone de 500 μm d'épaisseur assure l'étanchéité du dispositif lorsque le support est vissé). L'ensemble est monté sur le support et placé dans la chambre d'irradiation.

b. Conditions de culture sous microfaisceau

Au cours de la phase d'irradiation, les cellules sont maintenues dans leur milieu de culture (300 µl). Afin d'éviter toute modification extrême du milieu environnant (source de stress) et d'éviter tout artefact expérimental inhérent aux conditions expérimentales, il est nécessaire de minimiser les changements de composition du milieu. Pour cela, la décision a été prise d'utiliser du milieu de culture DMEM (*Dubbelco's Modified Eagle Medium*, Sigma) dépourvu en rouge de phénol car ce composé interfère notamment avec le système de reconnaissance de forme cellulaire (émission de fluorescence). De plus, l'utilisation de colorants vitaux (type Hoechst³³³⁴²) ou d'agents physiques (ultra-violet) a été éliminée ou minimisée.

Il est également important de souligner qu'outre le fait de respecter les conditions de culture et l'environnement cellulaire (pH, oxygénation), ce dispositif d'irradiation permet de maintenir les populations en conditions stériles tout au long de la procédure expérimentale.

c. Procédure d'irradiation cellule par cellule

Calibration du système

L'irradiation cellulaire sous microfaisceau d'ions nécessite une grande précision, de l'ordre du micromètre pour la localisation des cibles. Mais, l'utilisation de plusieurs repères (repère optique du microscope et de la caméra CCD, repère mécanique des moteurs déplaçant le support du puits) requiert un étalonnage très fin du dispositif puisque la cible est localisée après une acquisition effectuée par la caméra CCD. Il est donc nécessaire de connaître la position du faisceau dans le repère lié au champ de la caméra, d'étalonner ses déplacements, ceux du puits de culture et d'aligner l'ensemble du dispositif pour chaque irradiation. Une erreur de localisation du faisceau se répercute intégralement par un décalage systématique du faisceau par rapport aux cibles lors de l'irradiation.

Diverses procédures d'étalonnage permettent de réaliser cette opération de calibration du système. La procédure comporte trois opérations successives afin : **(i)** d'établir une corrélation entre les repères optique (caméra CCD) et mécanique (étage de déplacement du puits) à l'aide d'un objet de référence (un collimateur) fixé sur le manipulateur. Cet objet permet de définir l'origine du repère mécanique et, par déplacements successifs, permet de calculer la matrice de transformation des coordonnées d'un repère à l'autre ; **(ii)** de positionner le faisceau à l'entrée du détecteur à gaz grâce à une procédure automatique de recherche. Le faisceau est balayé sur le collimateur d'entrée du détecteur afin de réaliser une image en transmission de ce collimateur et de connaître son barycentre ; **(iii)** de déterminer la position du faisceau, dans le repère lié au support du puits de culture. Pour

cela, un collimateur d'étalonnage est placé à l'air à la place du puits de culture, puis est balayé jusqu'à ce que la transmission du faisceau soit optimisée.

Le coefficient de transmission à travers le collimateur de 10 μm de diamètre est ensuite évalué en comparant le nombre de particules transmises au nombre de particules incidentes comptabilisées par le détecteur à gaz situé en amont. Ce test est une vérification systématique et très robuste de la résolution du faisceau.

Vérification effectuée en début de chaque campagne d'irradiation

Afin de tester les conditions opérationnelles du dispositif expérimental (logiciel de contrôle, traitement d'image, performances intrinsèques du faisceau), une procédure d'irradiation est pratiquée sur des plaques de CR39, un polymère détecteur solide de traces. Ce polymère de formule $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_7)_n$, permet une détection *a posteriori* des impacts. L'énergie déposée par les particules chargées dans le CR39 casse les liaisons chimiques, engendrant ainsi des régions fragilisées. Les traces ainsi obtenues sont ensuite révélées par attaque chimique.

Des cercles de 16 μm de diamètre sont gravés sous vide par le faisceau d'ions puis sont révélés dans une solution de KOH 12 N chauffée à 80°C pendant 7 minutes. Les plaques de CR39, rincées à l'eau et séchées, sont ensuite utilisées pour vérifier la calibration du système à l'air. Les cercles simulant les noyaux cellulaires sont reconnus comme cible par le logiciel de contrôle de l'irradiation, et sont irradiés de la même manière que les cellules. L'irradiation est révélée par une seconde attaque chimique dans une solution de KOH 12 N, à 80°C, pendant 2 minutes. Les plaques de CR39 rincées et séchées sont observées au microscope (Olympus BX40) afin d'évaluer la précision du tir, la taille du faisceau à son arrivée sur la cible ainsi que du nombre de particules délivrées. Cette étape de vérification permet de valider ou non la partie physique de l'expérience.

La phase d'irradiation cellule par cellule

Au cours de l'irradiation cellule par cellule, l'utilisateur définit l'ensemble des paramètres : nombre de particules (1, 5, 10, 50), la cible sub-cellulaire (noyau). Une fois les paramètres définis, un champ optique est sélectionné, l'amélioration de l'image et la reconnaissance des cibles s'effectuent automatiquement. L'expérimentateur peut alors exécuter une irradiation automatique de toutes les cibles de ce champ. Un nombre prédéfini de particules est alors délivré sur chaque cible sélectionnée. Une fois terminé, un nouveau champ est exploré. L'expérimentateur a toujours la possibilité de contrôler « champ par champ » si la totalité des cibles est bien reconnue, de sélectionner les cibles « oubliées », de définir sélectivement et spécifiquement des zones d'intérêt à ne pas irradier.

d. Conditions de culture post-irradiation

Une fois la totalité des cellules irradiées, le puits de culture est retiré de la chambre d'irradiation, ouvert en conditions stériles, le milieu est changé et les cellules sont rincées avec du milieu défini complet avant d'être replacées dans l'incubateur pour être cultivées dans des conditions classiques de culture. Les cellules sont ainsi maintenues en culture afin de déterminer les réponses cellulaires précoces, de quelques minutes à plusieurs heures après exposition.

3. Imagerie et microscopie en épifluorescence

a. Définition des compartiments subcellulaires et identification des dommages cellulaires radio-induits

Définition des volumes cellulaires

Les cellules ont été initialement étalées sur un support de culture (lamelle de verre ou film de polypropylène/Cell-Tak) et incubées pendant 4 ou 24 heures dans des conditions de culture classique. Le milieu de culture est alors éliminé, les cellules sont rincées avec une solution de PBS 1X, puis sont incubées à température ambiante pendant 15 minutes en présence d'une solution de paraformaldéhyde 1% (w/v) (Cat. No. P6148, Sigma) avant d'être à nouveau incubées pendant 10 minutes dans une solution de NH₄Cl (50 mM), toujours à température ambiante et sous agitation. Une fois fixées, les cellules sont rincées au PBS 1X et peuvent être, soit conservées à -20°C dans une solution d'éthanol 70% (v/v) pendant plusieurs jours, soit utilisées pour réaliser les expériences de marquage cellulaire.

Afin de définir les différents compartiments cellulaires (noyau et cytoplasme) et d'estimer les volumes de ces différents compartiments, les cellules sont incubées en présence de différents marqueurs : iodure de propidium, Hoechst³³³⁴² (Cat. No. H3570, Molecular Probe). Ainsi, les cellules sont incubées 30 minutes, à température ambiante et sous agitation, dans un tampon de « perméabilisation » constitué de PBS 1X et de Triton-X100 (0,1 % (v/v), Cat. No. T9284, Sigma). Une fois la perméabilisation achevée, la totalité des acides nucléiques cellulaires est marquée grâce à une solution d'iodure de propidium à 2,5 mg/ml diluée dans le tampon de perméabilisation (15 minutes, sous agitation et à l'abri de la lumière).

Trois rinçages successifs pendant 10 minutes, à température ambiante sous agitation, par une solution de PBS 1X – Triton 0,1 % (v/v) permettent d'éliminer tout excès de colorant. L'incubation pendant 10 minutes des cellules en présence d'une solution de Hoechst³³³⁴² (0,01 mg/ml) permet de marquer spécifiquement les structures double brin des acides nucléiques et donc, de révéler plus spécifiquement l'ADN génomique nucléaire. L'iodure de propidium révèle de manière moins spécifique les structures simple et double brin des acides

nucléiques et ribonucléiques (marquage nucléaire et cytoplasmique (ARN)). Les supports de culture sont ensuite montés entre lame et lamelle avec une goutte de « *ProLong Gold Antifade Reagent* » (Cat. No. P36930, Molecular Probes). Les échantillons sont conservés à -20°C et à l'abri de la lumière jusqu'à observation en microscopie confocale.

Détection de dommages moléculaires spécifiques (cassures double brin de l'ADN) par immunocytofluorescence

Après irradiation et selon le temps post-irradiation défini, les échantillons sont fixés à la paraformaldéhyde 1% (w/v) (Cat. No. P6148, Sigma) pendant 15 minutes à température ambiante et sous agitation, puis « neutralisés » avec une solution de NH₄Cl (50 mM) 10 minutes, à température ambiante. Une fois fixées, les cellules sont rincées au PBS 1X et peuvent être soit conservées à -20°C dans une solution d'éthanol 70% (v/v) pendant plusieurs jours, soit utilisées pour réaliser les expériences de marquage cellulaire. Il est important de souligner que toutes les procédures expérimentales qui vont suivre se réalisent dans les puits d'irradiation.

Les cellules sont incubées 30 minutes, à température ambiante et sous agitation, dans un tampon de perméabilisation (PBS 1X, 4% (w/v) albumine (BSA - Cat. No. A4503, Sigma), 0,1 % (v/v) Triton-X100 (Cat. No. T9284, Sigma), avant d'être incubées pendant une heure à 37°C, puis une nuit à 4°C, en présence de la solution contenant l'anticorps primaire dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H2A.X (1/500^{ème}, « *Rabbit Polyclonal anti-phospho-H2A.X (ser¹³⁹)* », Cat. No. 07-164, Euromedex). Trois rinçages successifs à température ambiante et sous agitation pendant 10 minutes avec une solution de PBS 1X – Triton X100 (0,1 % (v/v)) permettent d'éliminer tout excès d'anticorps primaires. Les cellules sont alors incubées, à l'abri de la lumière, dans une solution contenant l'anticorps secondaire (1/200^{ème}, « *Goat Anti-Rabbit AlexaFluor®594* », Cat. No. A11012, Molecular Probes) pendant 4 heures à température ambiante et sous agitation.

Trois rinçages successifs à température ambiante et sous agitation pendant une heure avec une solution de PBS 1X – Triton X100 (0,1% (v/v)) permettent d'éliminer tout excès d'anticorps secondaire. Une incubation de 10 minutes à température et sous agitation en présence d'une solution de Hoechst³³³⁴² (0,01 mg/ml) permet de marquer sélectivement l'ADN des cellules. Les supports de culture sont ensuite montés entre lame et lamelle avec une goutte de « *ProLong Gold Antifade Reagent* » (Cat. No. P36930, Molecular Probes). Les échantillons sont conservés à -20°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à observation en microscopie confocale.

b. Microscopie confocale et imagerie cellulaire haute résolution en trois dimensions

L'ensemble des observations en microscopie a été effectué sur la Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'Institut des Neurosciences (PICIN, Université de Bordeaux II) grâce à l'utilisation d'un microscope confocal Leica DMR TCS SP2 AOBs. Un objectif à immersion à huile du type Leica HCX PL APO CS 63X 1,4 Oil – 0,6 est utilisé.

Ce dispositif propose les modes d'excitation suivants : **(i)** un laser argon qui permet une excitation à 488 nm de la protéine recombinante fluorescente H2B-GFP (vert) ; **(ii)** un laser He/Ne qui permet une excitation à 543 nm des fluorochromes AlexaFluor®594 et iodure de propidium (rouge) ; **(iii)** une diode à 405 nm pour l'excitation du fluorochrome Hoechst³³³⁴² (bleu)

Les acquisitions avec une résolution maximale de 160 nm en z et de 80 nm en xy aux différents formats : 64*64, 128*128, 256*256 et 512*512 pixels, 8 bits, sont transférées sur l'ordinateur d'analyse et sont reconstruites en 3 dimensions à l'aide du logiciel « *Leica Confocal Simulator Software* » (Leica). Pour les besoins de la microdosimétrie, les différents formats d'acquisition permettent d'obtenir les données nécessaires à l'élaboration d'un fantôme en trois dimensions grâce au programme de reconstruction numérique Amira (Mercury, France). Ce fantôme « cellulaire » en trois dimensions prend en compte les paramètres suivants : taille, volumes nucléaires et cytoplasmiques. Il peut alors être intégré dans le code de simulation Monte Carlo afin d'évaluer l'énergie déposée par les ions dans la cellule.

c. Microscopie confocale et analyse numérique qualitative des cassures double brin de l'ADN

Les observations ont été réalisées selon la même procédure et avec les mêmes dispositifs que précédemment. Les acquisitions haute résolution, suivant l'axe z, de coupes horizontales de noyaux en interphase sont obtenues pour les signaux correspondant **(i)** à la protéine H2B-GFP (vert, excitation par le laser Argon à 488 nm) ; **(ii)** au Hoechst³³³⁴² (bleu, excitation par une diode à 405 nm) ; **(iii)** à l'anticorps secondaire Alexa Fluor 594 (rouge, excitation par un laser He/Ne à 543 nm) en prenant soin de ne pas les saturer. Les données enregistrées pour les 3 couleurs acquises simultanément pour chaque plan de coupe en z (coupe de 122 nm en épaisseur) sont ensuite transférées sur l'ordinateur pour analyse. Deux méthodes d'analyse sont ensuite appliquées, l'une qualitative et l'autre quantitative.

Au cours de l'analyse qualitative, les noyaux cellulaires sont étudiés à l'aide d'un objectif à immersion à huile de grossissement 40X (Leica HCX PL APO CS 40X 1,4 Oil – 0,6) et du programme Leica Confocal Software (LCS). Chaque photomultiplicateur est réglé de façon à éviter toute saturation pour les canaux vert (GFP) et rouge (Alexa Fluor⁵⁹⁴). La profondeur

de champ est optimisée selon l'axe z afin d'obtenir une épaisseur de 160 nm par coupe. L'image obtenue représente un seul noyau cellulaire.

Les acquisitions de format 520*520 pixels, 8 bits sont transférées sur l'ordinateur d'analyse et sont reconstruites en 3 dimensions à l'aide du logiciel LCS Simulator. La reconstruction en trois dimensions ainsi obtenue est ensuite exportée en format vidéo compatible.

d. Microscopie confocale et analyse numérique quantitative des cassures double brin de l'ADN

Les observations ont été réalisées selon la même procédure et avec les mêmes dispositifs optiques que précédemment. Dans le cadre de cette analyse quantitative des dommages radio-induits à l'échelle de la cellule unique, il a cependant été nécessaire de : **(i)** travailler aux résolutions optiques maximales afin de discriminer les dommages moléculaires (cassures double brin de l'ADN) ; **(ii)** réaliser des observations « *in situ* » et simultanées de cellules « irradiées » et de cellules « contrôles » (mêmes conditions expérimentales et d'acquisition numérique).

Les acquisitions, effectuées plan par plan en mode « empilement », au format 1024*1024 pixels avec une dynamique de 12 bits, sont transférées et analysées à l'aide du logiciel Metamorph (Molecular Devices Corp.). La quantification automatique du nombre, de la taille et de l'intensité des foci γ -H2A.X pour chaque noyau cellulaire a nécessité le développement d'une macro. Cette application a été spécifiquement développée (Poujol, 2006) et présente l'architecture suivante : pour chaque acquisition, l'ensemble des plans de chaque couleur est normalisé par seuillage afin d'éliminer le bruit de fond parasite. Une projection en z de l'empilement acquis pour le canal du Hoechst³³³⁴² (bleu) permet de définir chaque noyau cellulaire comme région d'intérêt. Les régions ainsi définies sont examinées automatiquement sur la projection du canal GFP (vert) afin de vérifier si les cellules repérées sont GFP positives (GFP +) ou GFP négatives (GFP -). L'examen des mêmes régions sur la projection du canal AF594 (rouge) permet de répertorier les foci appartenant aux cellules GFP+ ou GFP-. La macro définit ensuite la taille de l'objet standard en nombre de pixels et intègre les aires de chaque foci en nombre de pixels, leur nombre d'objets et leur intensité. Les données sont transférées dans Excel (Microsoft) pour l'exploitation.

4. Imagerie cellulaire, microscopie ionique et cartographie chimique élémentaire

Afin d'affiner les calculs de microdosimétrie, nous avons entrepris la mesure de la composition chimique élémentaire et de la densité organique de nos cellules par microanalyse microfaisceau.

a. Préparation des échantillons

Montage des cibles

Une feuille de polycarbonate de 2 μm d'épaisseur (Cat. No. CT301020, Goodfellow) est collée à l'aide d'une solution de formvar 2% (w/v) (Cat. No. 12164, Merck) diluée dans du chloroforme sur des supports en aluminium spécialement fabriqués au laboratoire. Après stérilisation par traitement aux ultra-violets pendant une heure, les supports sont traités au Cell-Tak (BD-Biosciences) à raison de 2,54 g/cm² afin de permettre l'adhésion des cellules.

Préparation des cellules

Les cellules de la lignée HaCaT/[H2B-GFP]Tg en phase exponentielle de croissance sont resuspendues après 12 minutes à 37°C de dissociation enzymatique à la trypsine-EDTA (0,05% (v/v) et 0,5 mM respectivement - Sigma). 10 000 cellules sont reprises après centrifugation dans un volume de 10 μl de milieu de culture complet et sont déposées sur le film de polypropylène traité initialement aux UV et au Cell-Tak. Une heure d'incubation à 37°C, 5% de CO₂ et en atmosphère humide suffit aux cellules pour adhérer au support. 1 ml de milieu de culture complet est alors ajouté et les cellules sont ainsi maintenues en culture.

Après un temps d'étalement de 4 ou 24 heures, les cellules sont cryofixées. Les cellules sont rincées pendant 30 secondes dans un bain de PBS 1X puis très rapidement dans un bain d'eau ultra-pure. Le support est ensuite plongé pendant 30 secondes dans un bain d'isopentane refroidi à -160°C par de l'azote liquide. Les supports sont alors transférés dans une enceinte refroidie à -35°C pendant 24 heures afin d'être progressivement lyophilisés. Les cellules lyophilisées seront conservées par la suite dans un dessiccateur à température ambiante.

b. Analyses PIXE et RBS

Composition chimique élémentaire et densité organique cellulaire

L'analyse chimique d'éléments trace par microsonde nucléaire est basée sur l'interaction d'un faisceau de protons de quelques MeV avec la matière. Lorsqu'un microfaisceau est utilisé pour des analyses à l'échelle de la cellule, il peut être balayé à la manière d'un microscope électronique. Il permet alors d'analyser point par point des zones dont la dimension peut varier de 20x20 μm^2 à 2x2 mm² et donc fournir des cartographies chimiques élémentaires (Llabador & Moretto, 1998).

Dans l'analyse de tissus vivants, deux techniques sont employées simultanément :

(i) La fluorescence X (PIXE : « Particle Induced X-ray Emission ») qui permet de doser les minéraux et électrolytes (Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, Sr), les métaux trace (Al, V, Ti, Cr, Mn, Fe,

Cu, Zn, Br, Se...) ainsi que les éléments lourds ou toxiques (Pb, Cd, Hg...) avec une limite de détection variant de 1 à 10 µg/g (Johansson & Campbell, 1988).

(ii) La méthode de rétro-diffusion Rutherford (RBS : « *Rutherford Backscattering Spectrometry* ») qui permet de détecter les principaux constituants du milieu vivant : C, N, O et donner ainsi la masse organique de la coupe analysée. Il est ainsi possible d'obtenir des résultats quantitatifs en terme de concentration normalisée par la masse (sèche) du tissu analysé (en µg/g généralement) (Moretto & Razafindrabe, 1995).

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir analyser des coupes à congélation (épaisseur 10-20 µm) simplement lyophilisées, sans aucune inclusion préalable, ce qui permet d'éviter tout problème de contamination, ou des cellules entières, simplement cryofixées et lyophilisées. Elle est multi-élémentaire dans le sens où une douzaine d'éléments peut être analysée simultanément. Elle permet en outre d'obtenir des résultats quantitatifs absolus puisque les teneurs en élément trace peuvent être exprimées en termes de concentration (Moretto, 1996).

Conditions expérimentales

Pour les analyses PIXE et RBS, un faisceau de protons de 2 MeV est employé en mode balayage avec une résolution spatiale de 2 µm. Un détecteur X de type Si(Li) de 80 mm² de surface active est placé à un angle de 135° ainsi qu'un détecteur de particules silicium (50 mm²), lui aussi à 135°. Devant le détecteur X, un filtre en aluminium de 100 µm d'épaisseur, percé en son centre d'un trou de 500 µm de diamètre, permet de limiter l'intensité du rayonnement X de basse énergie tout en conservant une partie de ce signal. Le but est d'éviter la saturation du détecteur en coupant la composante de basse énergie qui est généralement émise avec un fort rendement. Afin d'éviter d'endommager les échantillons, la vitesse de balayage du faisceau sur la cible est fixée à 1 ms/pas. Des matrices de 128x128 pixels sont analysées.

Traitement des données

Grâce à la technique PIXE et RBS, les distributions spatiales des éléments organiques et des minéraux ont pu être déterminées. Les événements X et les particules diffusées sont à la fois répertoriés suivant leur énergie et suivant les coordonnées de leur point d'émission (point d'impact du faisceau). La cartographie de la répartition élémentaire sur l'échantillon peut ainsi être construite. Une échelle de couleurs est utilisée pour présenter le nombre d'évènements par pixel. Les programmes de traitements des données nous permettent également d'extraire des spectres d'émissions X et de particules diffusées pour chaque zone analysée de l'échantillon. Ceci nous permet ainsi de choisir des zones d'intérêt à l'intérieur d'un balayage par post-traitement. Une fois reconstruits, les spectres sont traités

individuellement. Pour cela, nous avons utilisé le programme GUPIX pour traiter les spectres PIXE (Campbell *et al.*, 2000), RUMPIN pour les spectres RBS (Moretto & Razafinbrade, 1995).

Le programme GUPIX permet de simuler le spectre X en prenant en compte l'ensemble des paramètres expérimentaux (particule incidente, énergie, éléments présents, géométrie de détection, paramètres du détecteur et filtres...). Un ajustement au spectre expérimental est ensuite réalisé dans un processus itératif qui converge progressivement vers la composition exacte de l'échantillon analysé. Le programme fournit la masse surfacique de tous les éléments chimiques détectés.

Les tissus biologiques étant composés à plus de 95% de carbone, d'oxygène et d'azote, la masse d'échantillon peut être déterminée en estimant la stœchiométrie de l'hydrogène à partir des données de la littérature. Dans chacune des zones d'intérêt, RUMPIN fournit la masse surfacique, le nombre de charges collectées et la composition en carbone, azote et oxygène. En normalisant les résultats quantitatifs fournis par GUPIX, RUMPIN permet le calcul de la concentration des éléments chimiques en masse organique sèche.

Chapitre V

Génération dose-dépendante de cassures double brin de l'ADN. Cinétique de phosphorylation de l'histone H2A.X

L'utilisation d'un dispositif d'irradiation cellulaire, en mode ion par ion et sur cellule individuelle, requiert des protocoles expérimentaux spécifiques dans le respect d'un grand nombre de contraintes d'ordre physique et biologique. En d'autres termes, il est absolument nécessaire de développer une approche expérimentale qui, d'une part, prenne en compte la complexité des phénomènes physiques, tels que l'optimisation du passage des particules chargées à travers le support de culture (le faible parcours des particules α dans la matière impose l'emploi d'un support de faible épaisseur) ou encore la compatibilité avec la microscopie en fluorescence (support transparent non fluorescent) et qui d'autre part, autorise l'application de protocoles de culture cellulaire de routine et l'absence de toute cytotoxicité des matériaux utilisés.

Chronologiquement, une des priorités de ce travail a donc été de valider un certain nombre de développements techniques et méthodologiques comme la géométrie des puits de culture, le type de support de culture ou encore les conditions de culture cellulaire.

1. Validation des puits de culture

La géométrie du puits étant déjà arrêtée, les tests ont été réalisés sur trois polymères disponibles en feuilles de quelques micromètres d'épaisseur :

- un film de Mylar de 2,5 μm d'épaisseur (Cat. No. ES301025, Goodfellow),
- un film de polycarbonate 2 μm d'épaisseur (Cat. No. CT301020, Goodfellow),
- un film de polypropylène 4 μm d'épaisseur (Cat. No. PP301040, Goodfellow).

Les paramètres suivants ont été pris en compte : **(i)** la souplesse d'utilisation ; **(ii)** l'adhésion cellulaire avec/sans facteur d'adhésion (gélatine de porc 2% (w/v) - Cat. No. G1393, Sigma), sérum de veau foetal (Pan Biotech), Cell-Tak 2.54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (BD Biosciences) ; **(iii)** l'absence de toute fluorescence parasite suite à des illuminations aux longueurs d'ondes suivantes 360-370 nm (filtre Olympus U-MNU) et 488 nm (filtre Olympus U-MWIBA2).

Les résultats des différentes observations sont résumés dans le tableau 3 (page 116).

Nous avons finalement retenu le film de polypropylène 4 μm d'épaisseur (Cat. No. PP301040, Goodfellow) traité au préalable par une solution de Cell-Tak (2.54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Les conditions de culture cellulaire ont été adaptées aux exigences dictées par l'irradiation en microfaisceau : trois spots indépendants de 1500 cellules permettent l'étude de plusieurs conditions expérimentales au sein d'un seul puits de culture : spot « contrôle » versus spots « irradiés » (figure 13). Ce protocole est aujourd'hui définitivement établi, validé et appliqué en routine pour l'ensemble des expériences d'irradiation cellulaire sous microfaisceau d'ions.

Type de Support	Epaisseur (µm)	Maniabilité / Rigidité	Adhésion cellulaire avec ou sans facteur d'attachement	Autofluorescence du support
Polypropylène Cat. No. PP301040, Goodfellow	4	++	Cell-Tak Cat. No. 354240, BD-Biosciences	0
Polycarbonate Cat. No. CT301020, Goodfellow	2	+	Cell-Tak Cat. No. 354240, BD-Biosciences	0
Mylar® Cat. No. ES301025, Goodfellow	2,5	+	0	importante

Tableau 3 : *Test des différents types de support de culture.* Différents supports ont été testés. Les résultats obtenus pour la souplesse d'utilisation, l'adhésion cellulaire avec/sans facteur d'adhésion et la fluorescence parasite à des illuminations aux longueurs d'onde λ : 360-370 nm et λ : 488 nm ont permis de mettre en évidence comme, meilleur compromis, le film de polypropylène comme support de culture, avec un traitement de surface au Cell-Tak.

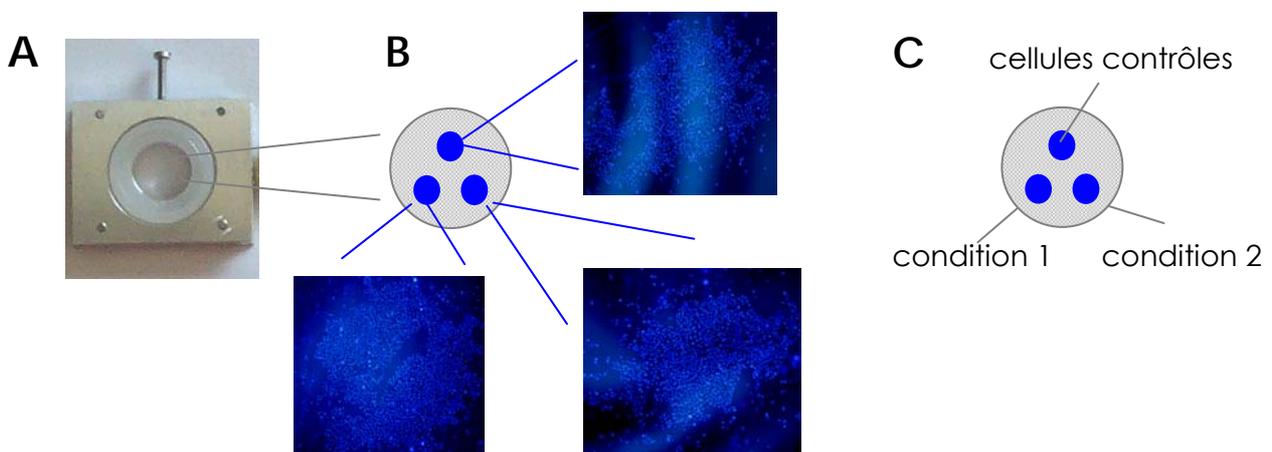


Figure 13 : *Conditions de culture dans le puits d'irradiation.* Trois spots indépendants de 1500 cellules sont étalés sur un film de polypropylène préalablement traité par une solution de Cell-Tak (A). Les cellules constituant les trois spots sont repérées par microscopie en épifluorescence, au grossissement 40X, après un traitement au Hoechst³³³⁴² (B) Les conditions de culture cellulaire retenues permettent l'étude de plusieurs conditions expérimentales au sein d'un seul puits de culture avec la présence d'un spot contrôle interne à chaque échantillon. Il est possible d'étudier, les effets induits sur les cellules de ce spot « contrôle » versus spots « irradiés » (C).

2. L'obtention et la caractérisation de la population de kératinocytes humains transgéniques HaCaT/[H2B-GFP]Tg

Afin d'appréhender l'étude des mécanismes moléculaires de réponses précoces à de faibles doses de rayonnements ionisants, nous avons décidé de développer un modèle biologique qui répond aux différentes exigences de la problématique expérimentale, exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants de type environnemental et compatibilité avec l'irradiation cellulaire sous microfaisceau d'ions. En effet, l'irradiation ion par ion et cellule par cellule repose sur la capacité de cibler spécifiquement des structures à l'échelle sub-cellulaire avec un nombre exact de particules. Ceci impose donc une reconnaissance automatique *in situ* et *in vivo* de ces structures sub-cellulaires. Enfin, la résolution spatiale de notre microfaisceau, de l'ordre de quelques micromètres, impose l'utilisation de cellules ou de structures sub-cellulaires dont les tailles sont de l'ordre d'une dizaine de micromètres.

Notre choix s'est donc porté sur la lignée de kératinocytes humains HaCaT (cellules de peau), un type cellulaire susceptible d'être exposé aux rayonnements ionisants. Cette lignée cellulaire humaine, établie en 1988 et obtenue par transformation spontanée, présente des caractéristiques compatibles avec la procédure d'irradiation **(i)** une géométrie cellulaire étalée adaptée : large noyau, géométrie régulière... ; **(ii)** une prolifération « infinie » et monocouche (disponibilité, reproductibilité...). Enfin, pour reconnaître et cibler spécifiquement en conditions *in situ* et *in vivo* des structures sub-cellulaires, nous avons décidé d'appliquer des techniques de génie génétique qui autorisent l'expression de protéines recombinantes chimères fusionnées à la protéine GFP (« *Green Fluorescent Protein* »). Outre cette capacité à visualiser spontanément des organelles cellulaires *in vivo* et dans le temps, cette technique permet d'obtenir un modèle biologique établi, reproductible et ne nécessitant aucune adjonction d'agents chimiques (type agent intercalant) ou physiques (ultra-violet). Une approche pour localiser les noyaux de cellules vivantes repose sur l'emploi de protéines fluorescentes afin de marquer les chromosomes. Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine est composé d'un octamère de protéines histones sur lequel se lient 146 paires de bases d'ADN.

Les histones, principales protéines structurales des chromosomes dans les cellules eucaryotes forment une cible intéressante pour un marquage fluorescent. Ces petites protéines basiques hautement conservées dans l'évolution sont de divers types : deux copies des histones H3 et H4, deux dimères des histones H2A-H2B. Une cinquième protéine histone appelée H1 a pour rôle d'assurer la compaction de l'ADN à un niveau supérieur (Luger *et al.*, 1997).

Malgré la taille importante de la protéine GFP (239 acides aminés), sa fusion à l'histone humain H2B permet de localiser la chromatine et par extension les noyaux cellulaires sans pour autant perturber la structure de la protéine H2B.

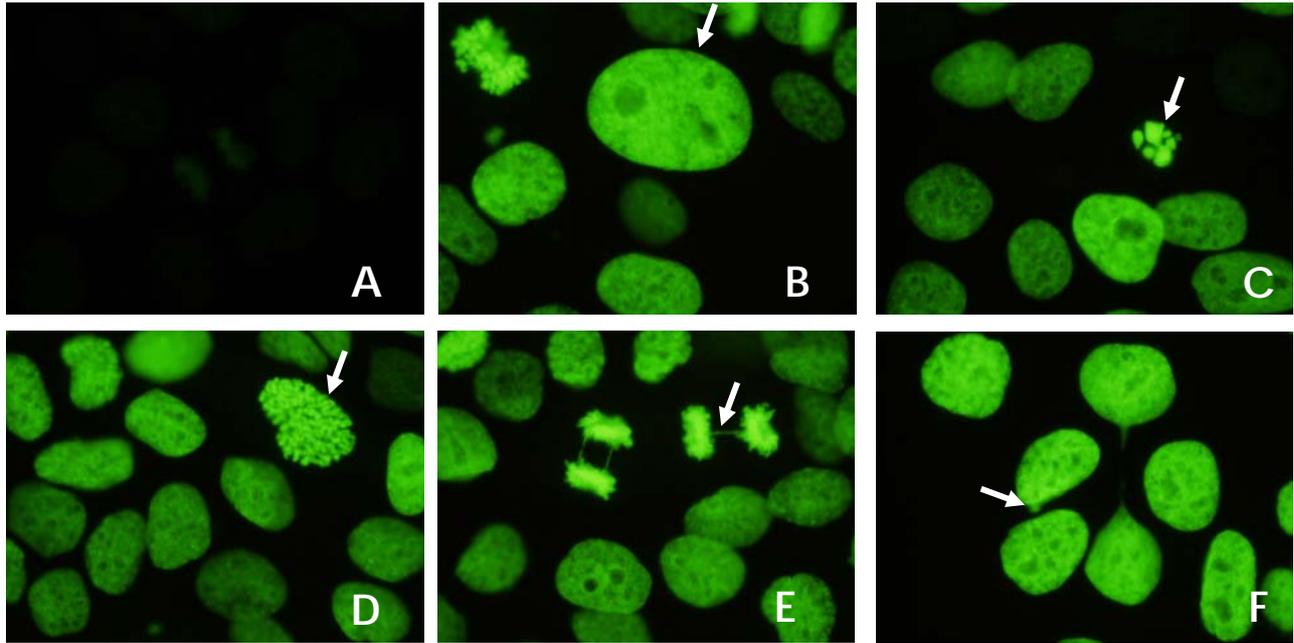


Figure 14 : **Localisation et expression de la protéine chimère H2B-GFP.** Observation en microscopie d'épifluorescence (X 100) de cellules HaCaT-H2B-GFP étalées sur lamelles. Une fois fixées à la paraformaldéhyde 1% les cellules sont traitées par du NH_4Cl , puis montées avec milieu antifading. Fluorescence témoin d'une cellule HaCaT parentale (A). Grâce à l'expression de la protéine chimère H2B-GFP, il est possible de déterminer différentes phases du cycle cellulaire : cellules en interphase (B) avec nucléole visible, cellules en apoptose (C), cellules avec chromosomes visibles (D). La protéine H2B-GFP permet également de distinguer des cellules présentant des anomalies génomiques, telles que la présence de ponts interchromosomiques (E) ou la présence de micronoyaux (F).

Ainsi, nous avons établi par transfection stable du vecteur d'expression pEGFPN1-H2B-GFP, plusieurs populations clonales de kératinocytes humains HaCaT, que nous avons tout naturellement nommées : HaCaT/[H2B-GFP]Tg.

La caractérisation de ces nouveaux clones a été réalisée à différents niveaux d'organisations moléculaires, sub-cellulaires et cellulaires. Ce travail nous a tout d'abord permis de vérifier la localisation exclusive de la protéine H2B-GFP dans le noyau cellulaire, et ce quels que soient les clones étudiés. Nous avons également mis en évidence, par de simples observations en microscopie en contraste de phase, que les clones transgéniques établis ne présentent pas d'altérations morphologiques majeures par comparaison à la lignée cellulaire originale HaCaT non transfectée et dans les mêmes conditions de culture.

L'observation de ces populations clonales *in vivo* en microscopie à épifluorescence (figure 14) permet, grâce à la présence de la protéine recombinante H2B-GFP de réaliser un suivi *in vivo* et *in situ* du métabolisme cellulaire et nucléaire en particulier. Il a en effet été démontré

que la protéine H2B-GFP est un puissant marqueur du métabolisme nucléaire car sa distribution est étroitement et exclusivement associée à l'ADN génomique et permet donc d'identifier **(i)** différentes positions dans le cycle cellulaire (cellule en interphase, différentes phases du processus mitotique (pré-prophase, prophase, métaphase)) ; **(ii)** les différents statuts de condensation de la chromatine (apoptose) ; **(iii)** des altérations génétiques (ponts interchromosomiques, micronoyaux).

Les différentes populations clonales ont été analysées en cytométrie de flux afin de déterminer l'homogénéité des populations cellulaires au regard du niveau d'expression de la protéine recombinante. Cette étude basée sur l'estimation du niveau de fluorescence intracellulaire, cellule par cellule, a permis d'isoler une population clonale en particulier. Cette population clonale présente une très grande homogénéité et le plus fort taux d'expression de fluorescence, ce qui suggère une population clonale établie homogène. Ce niveau d'« expression » a été régulièrement testé au cours des deux dernières années pour cette même population clonale et a permis d'estimer que le taux moyen de cellules positives pour la GFP est en moyenne de 75.88 % (+/- 4.92, pour n= 6093 cellules) avec une tendance à la diminution du nombre GFP positives. Afin de maintenir ce taux constant, la population clonale est régulièrement triée par cytométrie en flux.

Cette observation est en accord avec les données publiées dans la littérature et notamment les travaux de Jensen (Jensen *et al.*, 2000). Ces auteurs ont en effet mis en évidence que l'efficacité de transfection et la stabilité du transgène dans des lignées de kératinocytes varient énormément, avec une diminution progressive de l'expression de la protéine chimère selon un mécanisme encore inconnu. De plus, toujours selon le même auteur, les kératinocytes transfectés perdent leur pouvoir de clonogénicité de part une forte inhibition de la synthèse d'ADN suite à la transfection.

Cette population porte le nom HaCaT/[H2B-GFP]Tg et a été retenue pour l'ensemble des expérimentations qui ont été réalisées et qui vous sont présentées dans ce mémoire. L'étude comparée des proliférations cellulaires ainsi que des réponses à des stimuli apoptotiques, a permis de vérifier que l'introduction du vecteur d'expression pEGFPN1-H2B-GFP et que l'expression de la protéine recombinante correspondante n'altèrent pas de manière significative le métabolisme cellulaire vis-à-vis des capacités de croissance cellulaire et de l'apoptose. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans la figure 15.

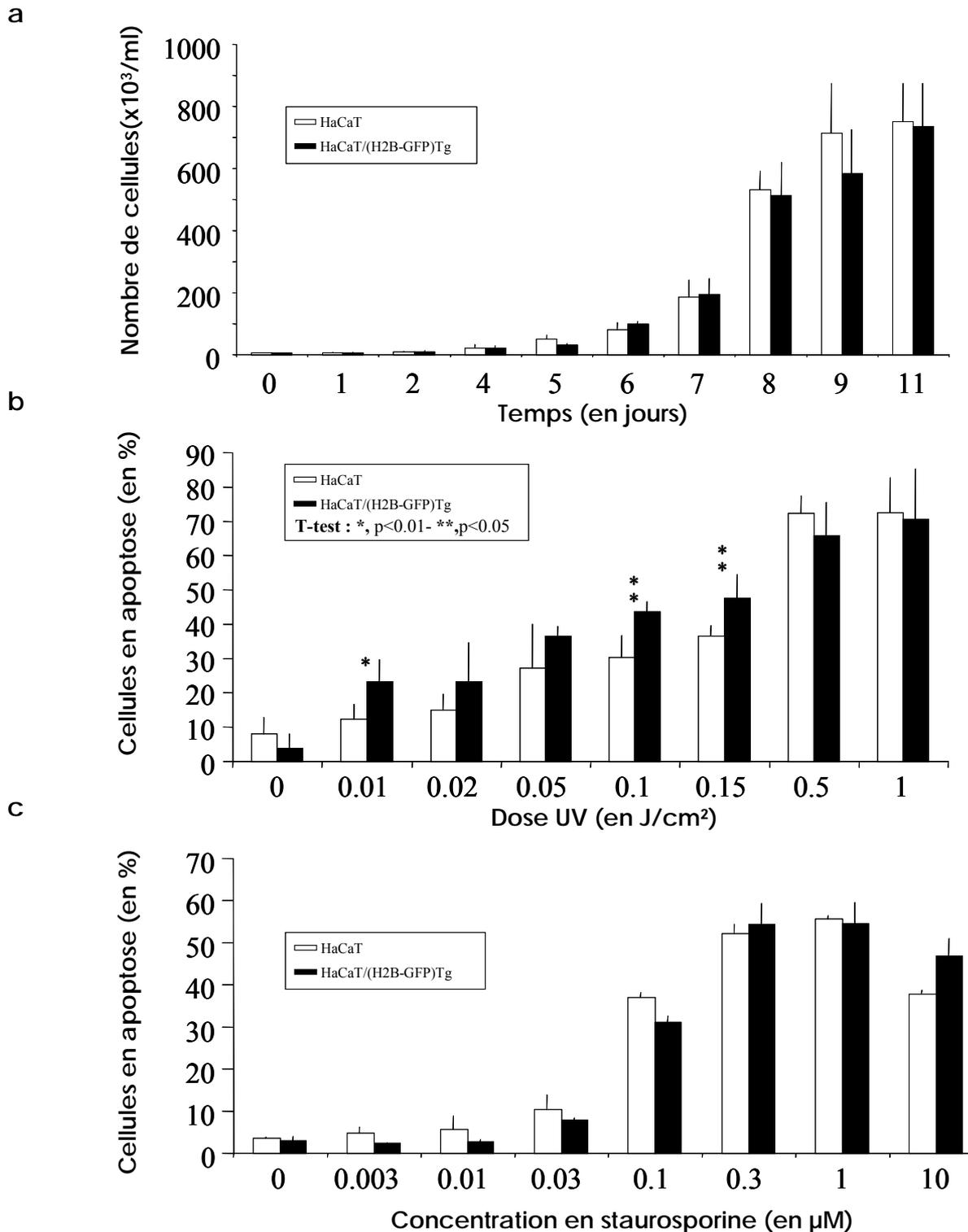


Figure 15 : Caractérisation du clone HaCaT/[H2B-GFP]Tg par comparaison avec la lignée parentale de kératinocytes humains HaCaT. Etude de la prolifération cellulaire (a) sur 5 000 cellules ensemencées par puits de culture pour un comptage journalier (répété 5 fois par puits) effectuée pour chaque type cellulaire. La courbe obtenue après quinze jours d'étude présente les mêmes taux de prolifération pour les deux lignées. Réponse cellulaire 24 heures après traitement par stimuli apoptotiques. La courbe obtenue après traitement aux ultraviolets présente le même profil de réponse pour 2 expériences effectuées en duplicat (b). La courbe obtenue présente le même profil de réponse après traitement à la staurosporine pour 2 expériences effectuées en duplicat (c).

Les courbes de prolifération cellulaire obtenues à différents temps ont permis de définir les temps de division et les taux de prolifération par comparaison à la lignée parentale HaCaT. Ces courbes présentent les mêmes profils de prolifération avec une progression similaire des deux populations cellulaires (étude réalisée sur 15 jours). Les temps de division estimés à 6 et 8 jours après étalement en phase exponentielle de croissance sont de 19 heures pour la population HaCaT et de 21 heures pour la population clonale transgénique HaCaT/[H2B-GFP]Tg et le taux de prolifération estimé est de 2,8 pour la lignée HaCaT et 2,6 pour la lignée HaCaT/[H2B-GFP]Tg.

Les réponses cellulaires de la lignée HaCaT et du clone HaCaT/[H2B-GFP]Tg vis-à-vis d'inducteurs apoptotiques comme les rayons ultra-violetes ou encore la staurosporine, ont été testées via l'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi$). Il est établi que les ultra-violetes génèrent de nombreuses altérations génétiques et notamment des cassures ADN simples et doubles brins, ce qui entraîne l'induction de l'apoptose selon des voies de signalisations métaboliques identiques à celles induites par des expositions à de fortes doses de rayonnements ionisants. Ces mécanismes d'activation apoptotique aboutissent à l'activation de la caspase 3 et, par voie de conséquence, à la chute du potentiel mitochondrial trans-membranaire, chute qui a été mesurée par FACs. Les lignées cellulaires HaCaT et HaCaT/[H2B-GFP]Tg exposées à des doses croissantes d'ultravioletes (de 0 à 1 J/cm²) ne montrent pas de différences significatives dans l'induction de la réponse apoptotique dose-dépendante 24 heures après exposition. La valeur CR50 pour les deux lignées est identique et correspond à la dose pour laquelle 50 % des cellules sont en apoptose et est de 0,2 J/cm².

L'apoptose peut être également induite de manière non spécifique en inhibant notamment l'activité de protéines kinases cellulaires à différents niveaux de la voie de signalisation apoptotique. Parmi ces inducteurs, nous trouvons la staurosporine, un analogue de l'ATP, qui par voie indirecte induit un stress cellulaire, une induction apoptotique par inhibition du fonctionnement de la chaîne respiratoire et finalement une dépolarisation de la mitochondrie (Kabir *et al.*, 2002 ; Bowen *et al.*, 2003 ; Charlot *et al.*, 2004).

Les courbes dose-réponse obtenues 24 heures après induction de l'apoptose avec différentes doses de staurosporine (de 0 à 10 μ M) ne montrent aucune différence significative. La valeur estimée du CR50 est de 280 nM pour les deux populations.

L'ensemble de ces observations suggère que la lignée de kératinocytes humains transformée spontanément et transgénique pour la protéine recombinante H2B-GFP est un modèle biologique d'intérêt qui répond aux exigences des conditions expérimentales de l'irradiation cellulaire sous microfaisceau d'ions. Cette lignée HaCaT/[H2B-GFP]Tg a été utilisée pour

l'ensemble des études qui ont été menées afin de caractériser les réponses moléculaires et cellulaires induites suite à des irradiations ciblées et contrôlées sous microfaisceau d'ions.

3. Définition des conditions optimales d'irradiation cellulaire sous microfaisceau

a. Microdosimétrie et comparaison des conditions d'étude 4-24h

Afin de mieux caractériser les irradiations réalisées, un code de simulation Monte Carlo nous permet d'estimer la dose délivrée dans les cellules par les particules α .

La réalisation de ces calculs requiert en particulier la connaissance des caractéristiques physiques des cellules. Pour ce faire, nous avons réalisé des reconstructions en trois dimensions des populations cellulaires utilisées dans nos différents protocoles d'irradiation. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire et cellulaire, de microscopie confocale, d'analyse sous faisceau d'ions et de traitement d'images numériques, nous a permis de définir les paramètres physiques, chimiques et biologiques de ces cellules dans différentes conditions expérimentales d'irradiation. Ces données ont été directement implémentées dans les simulations Geant4 et sont aujourd'hui les bases d'une microdosimétrie fine associée à nos conditions d'irradiation cellulaire sous microfaisceau.

Différents marqueurs ont été utilisés afin d'obtenir en microscopie confocale, les reconstructions en 3 dimensions des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg. Ainsi, le Hoechst³³³⁴², l'iodure de propidium et l'histone recombinée H2B-GFP ont permis d'obtenir les données nécessaires à l'élaboration d'un premier fantôme (taille, volumes nucléaire et cytoplasmique). L'histone H2B-GFP et le Hoechst³³³⁴² ont permis de visualiser le noyau, et l'iodure de propidium a permis de « marquer », par son affinité pour les acides nucléiques et ribonucléiques, le noyau, le nucléole et le cytoplasme. L'utilisation conjointe de l'histone H2B-GFP et du Hoechst³³³⁴² nous a permis de vérifier qu'il n'existe pas de différence significative de morphologie entre les cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg et HaCaT parentales.

Différentes conditions expérimentales ont été testées afin d'estimer leur influence potentielle sur la microdosimétrie finale. Des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg et HaCaT étalées 4 heures ou 24 heures avant irradiation ont donc été comparées. Les reconstructions en 3 dimensions à partir d'images confocales à haute résolution ont été obtenues puis transférées dans le logiciel de visualisation Amira 4.0™ (Mercury, France). Les fantômes correspondant ont été intégrés dans le code de simulation Geant4.

Une observation en microscopie optique permet de visualiser les modifications morphologiques en relation avec les conditions d'étalement (4 ou 24 heures). Cette différence de morphologie s'illustre essentiellement au travers de la modification de l'aspect extérieur, cellules rondes versus cellules à aspect pavimenteux, mais aussi par « l'épaisseur » des cellules qui varie de 10.70 μm (+/- 1.97 μm , n=12) pour les cellules à 4 heures à seulement

6.54 μm (+/- 1.20 μm , n=46) pour les cellules étalées 24 heures avant fixation. Ces informations sont regroupées dans les figures 16 et 17.

L'analyse des ces mêmes populations cellulaires en microscopie ionique sous microfaisceau nous a permis de définir les cartographies bi-dimensionnelles de la distribution des différents composants chimiques élémentaires (figure 19) ainsi que la densité cellulaire (figure 18).

Ces observations nous ont permis de définir différents paramètres physiques de ce matériel biologique, comme les masses organiques surfaciques grâce au logiciel d'analyse RUMPIN ou la densité des différents compartiments sub-cellulaires. Ainsi, la différence de morphologie cellulaire observée en microscopie confocale entre des cellules traitées 4 heures et 24 heures avant irradiation, est associée à une différence de composition chimique élémentaire (tableau 4). Outre la différence de morphologie (cellules rondes versus étalées), des déséquilibres ioniques majeurs sont observés dans les cellules étalées 4 heures avant fixation avec, notamment, des altérations des rapports : calcium/potassium/sodium (tableau 5 page 126). Une différence de masse est également observée entre les cellules cultivées à 4h et 24h ce qui peut s'expliquer par le fait que des cellules analysées seulement 4 heures après étalement, c'est-à-dire 4 heures après traitement à la trypsine-EDTA n'ont pas le temps ou la capacité de récupérer (désorganisation de la matrice extracellulaire, de la membrane, chélation du calcium, ...).

Composition chimique massique (%)					
	H	O	C	N	Autres minéraux
Noyau	10.64	74.5	9.04	3.21	2.61

Tableau 4 : Tableau des compositions chimiques pour le noyau utilisées lors des simulations Geant4

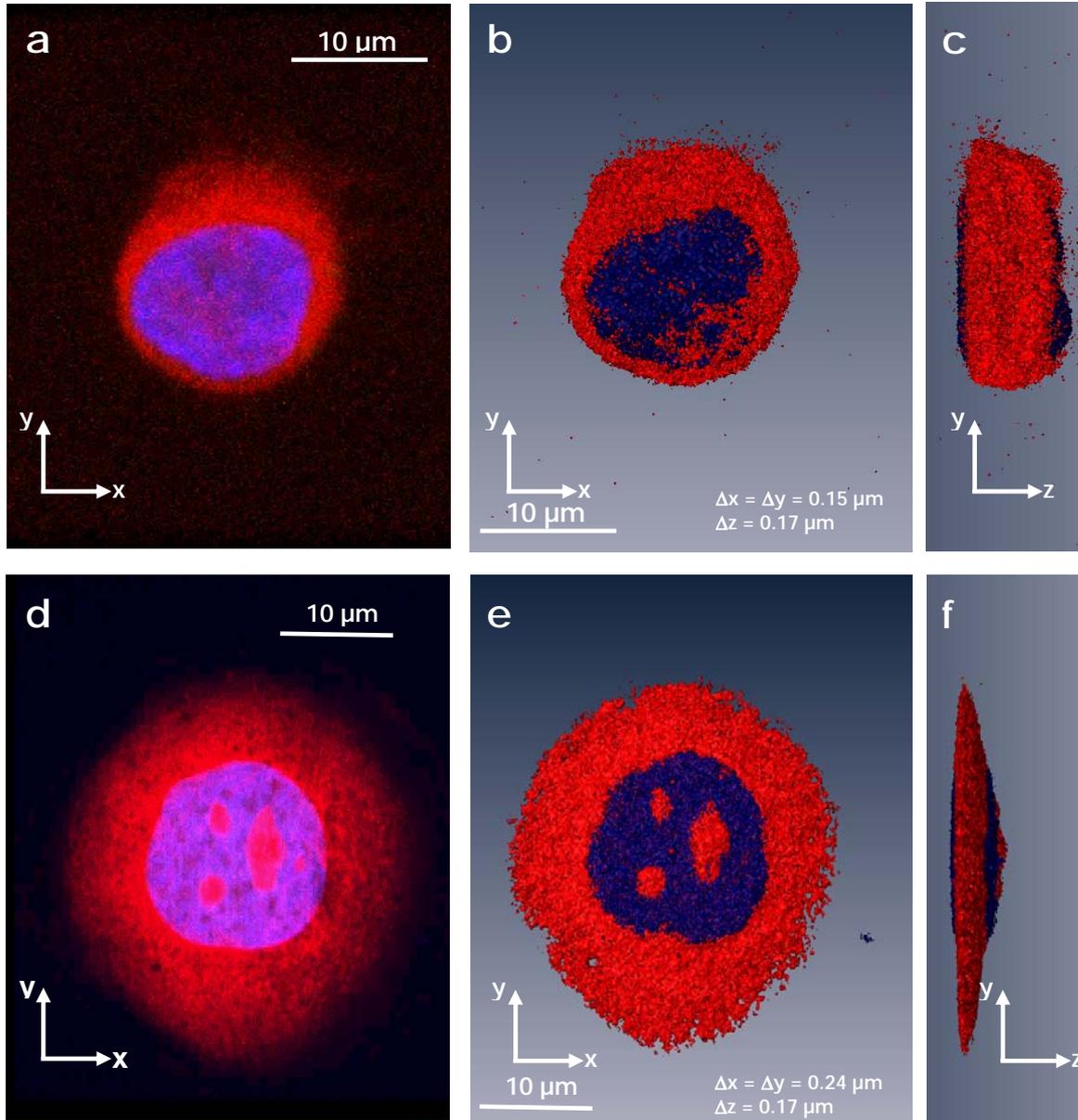


Figure 16 : **Morphologie cellulaire et microdosimétrie.** Observation en microscopie confocale après différents temps d'incubation, 4 h (a) et 24 h (d), de cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg étalées sur membrane de polypropylène/Cell-Tak. Une fois fixés à la paraformaldéhyde 1%, les différents compartiments cellulaires, noyau et cytoplasme sont visualisés grâce à l'utilisation d'agents chimiques spécifiques comme le Hoechst³³³⁴² (intercalant de l'ADN, bleu) ou l'iodure de propidium (grande affinité pour les acides nucléiques et ribonucléiques, rouge). La reconstruction 3D est réalisée par le logiciel Amira 4.0TM à partir d'acquisitions numériques haute résolution en microscopie confocale observées 4 (b, c) et 24 (d, e) heures après étalement. La taille des voxel est indiquée par Δx , Δy , Δz .

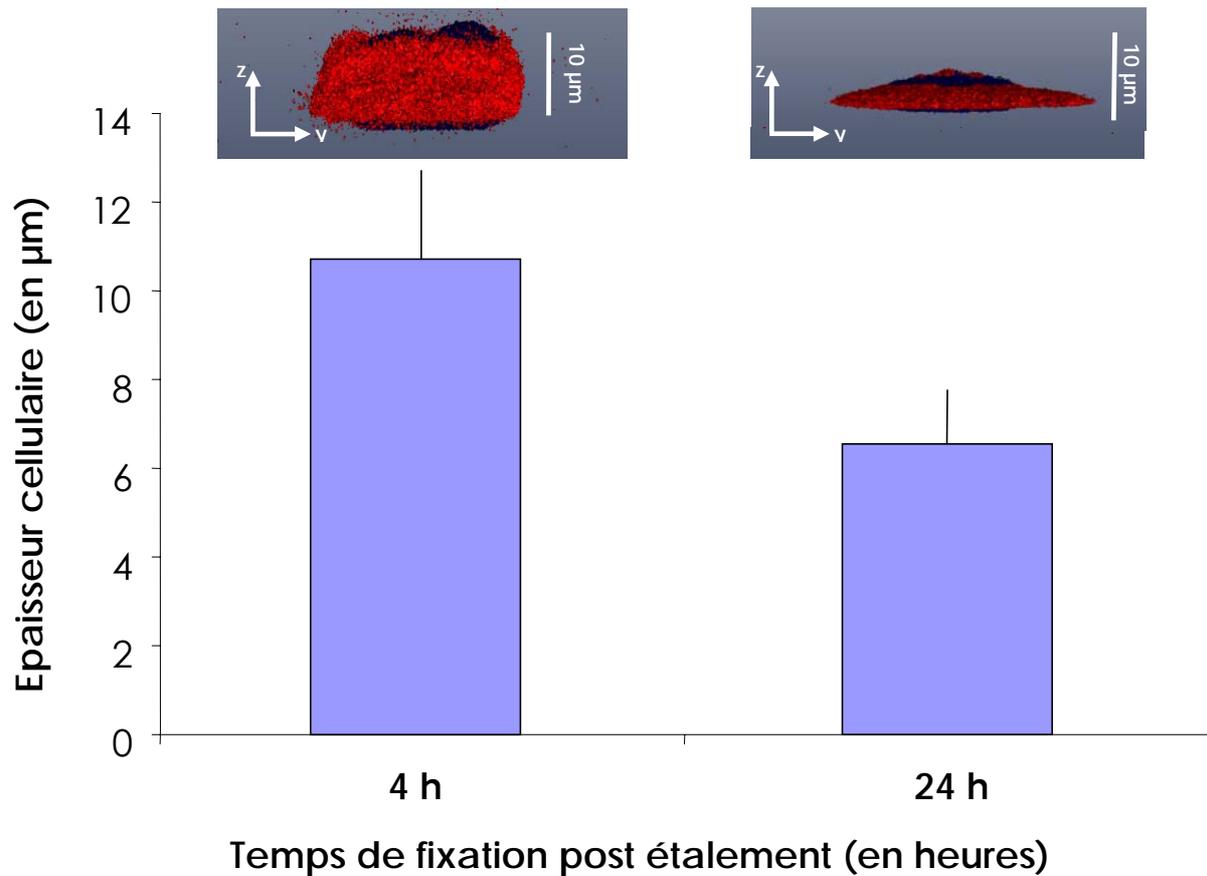


Figure 17 : **Epaisseur cellulaire moyenne.** Mesure de l'épaisseur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg étalées sur membrane de polypropylène/Cell-Tak sur des images de microscopie confocale. La mesure de l'épaisseur de chaque cellule est effectuée et montre une épaisseur de 10.70 μm (+/- 1.97 μm, n=12) pour les cellules étalées 4 heures et de 6.54 μm (+/- 1.20 μm, n=46) pour les cellules étalées 24 heures.

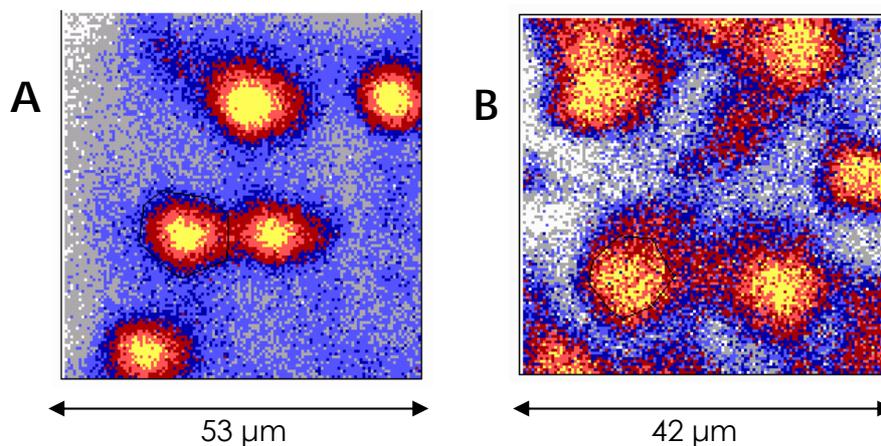


Figure 18 : **Microanalyse en microscopie ionique (RBS) de cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg.** Les cellules ont été cryofixées après 4h (A) et 24h (B) de culture sur membrane de polycarbonate/Cell-Tak. Représentation de la distribution en concentration du carbone. L'échelle de couleur est définie de manière à ce que la concentration augmente du blanc au jaune

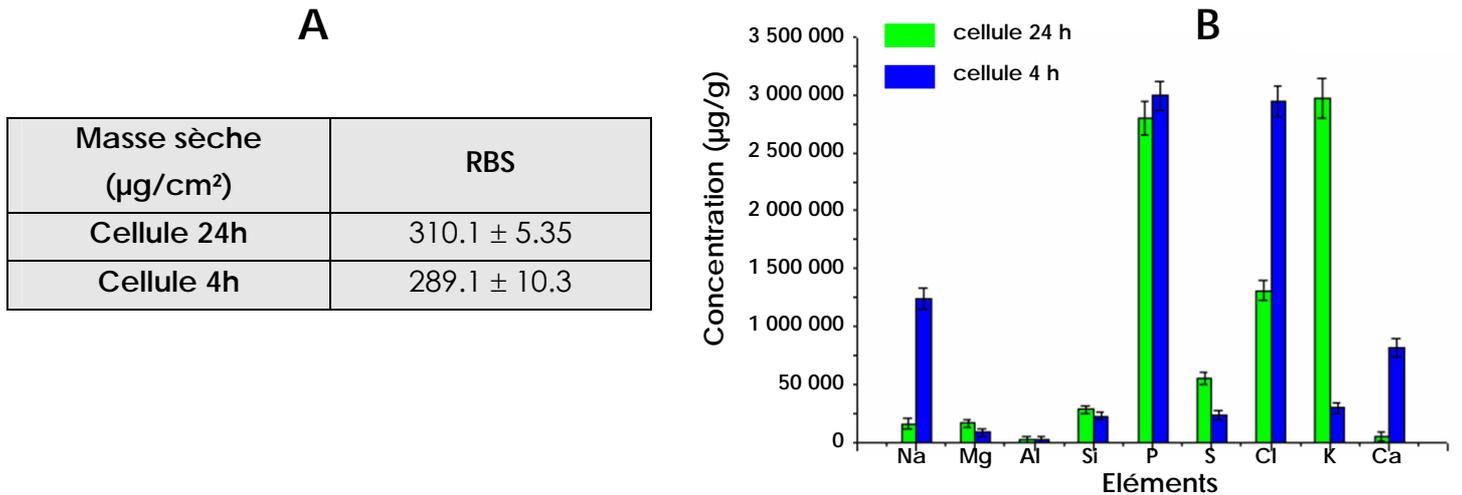


Tableau 5 : *Comparaison des masses organiques et inorganiques.* (A) Comparaison des masses organiques sèches en µg/cm² obtenues par RBS pour les cellules cryofixées 4 h et 24 h après étalement. (B) Concentration des ions inorganiques (en µg/g de masse sèche) dans les échantillons cellulaires cryofixés 4 h (n=4) et 24 h (n=3) après étalement.

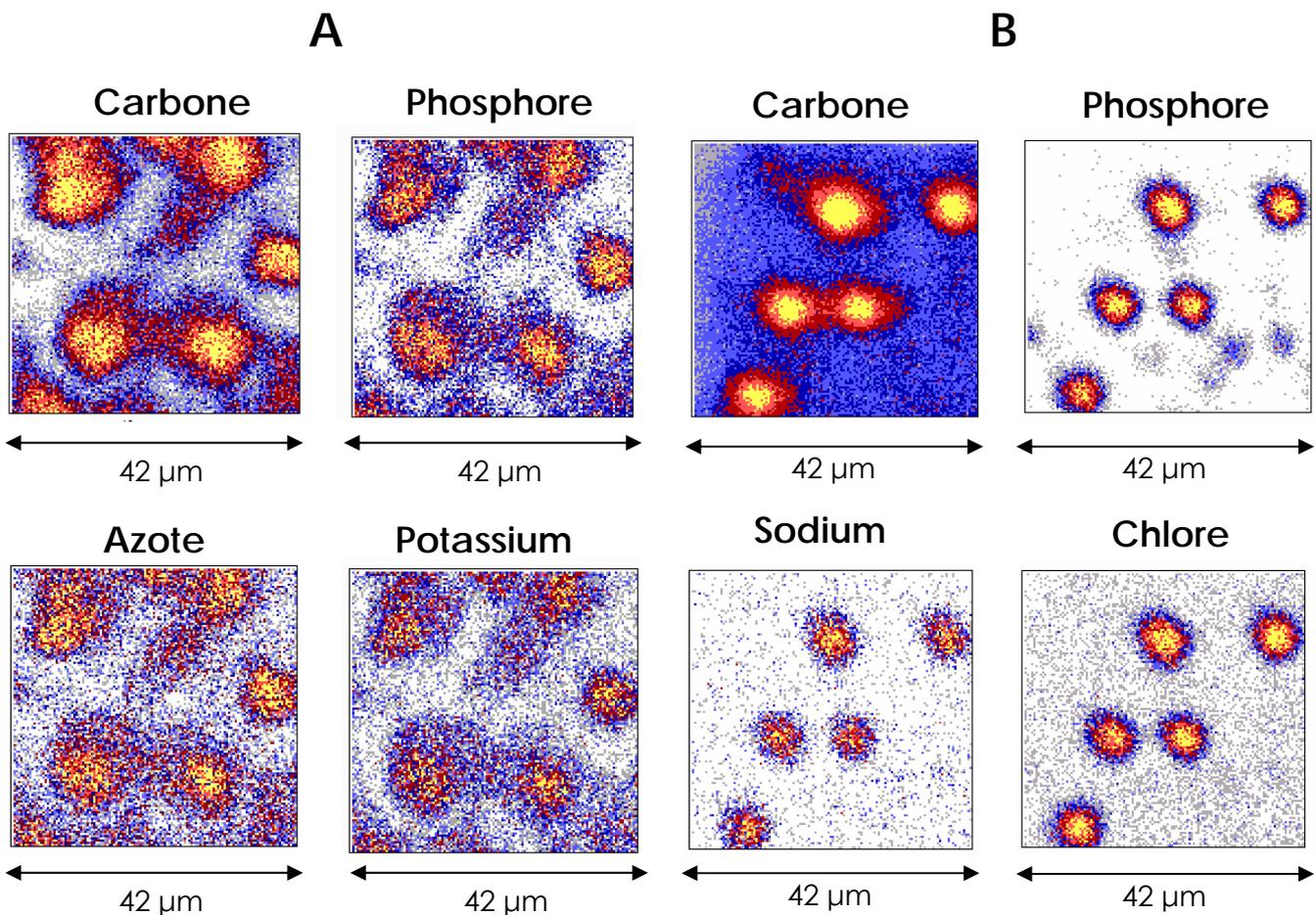


Figure 19 : *Microanalyse en microscopie ionique (PIXE, RBS) de cellules HaCat/[H2B-GFP]Tg.* Les cellules ont été cryofixées après 4h (A) et 24h (B) de culture sur membrane de polycarbonate/Cell-Tak. (A) Distribution des éléments carbone, azote (analyse RBS), phosphore, potassium (analyse PIXE) pour les cellules cryofixées après 4h. (B) Représentation de la distribution des éléments carbone (analyse RBS), sodium, phosphore, chlore (analyse PIXE) pour les cellules cryofixées après 24h. L'échelle de couleur est définie de manière à ce que la concentration augmente du blanc au jaune.

Enfin, grâce à ces différentes méthodologies, il a été possible d'attribuer la même composition chimique élémentaire pour le cytoplasme et le nucléole avec, cependant, une densité de 1 g/cm^3 pour le cytoplasme soit dix fois plus faible que celle observée pour le nucléole. Ces différentes analyses ont ainsi permis de définir les conditions de culture standard, et les compositions chimiques déterminées pourront, une fois intégrées au code, affiner la microdosimétrie associée.

b. Simulation - microdosimétrie cellulaire

Le code de simulation a permis de générer « *in silico* » 10^4 particules α de 3 MeV et de simuler : **(i)** leur parcours tout au long de notre dispositif d'irradiation ; **(ii)** leur interaction sur les fantômes définis précédemment ; **(iii)** le dépôt d'énergie à l'échelle de la cellule unique. Ces études nous ont permis de montrer que le mode de préparation des échantillons avant irradiation a une influence directe sur le dépôt de dose lors de l'interaction des particules avec les cibles biologiques. Ainsi, au niveau du noyau des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg et en considérant que le contenu cellulaire se résume à de l'eau, le dépôt de dose moyen est de l'ordre de 0,3 Gy sur des cellules étalées 4 heures avant irradiation et de de l'ordre de 0,07 Gy pour des cellules étalées 24 heures avant. De la même manière, la dose moyenne absorbée par le cytoplasme est respectivement de 0,1 Gy et de 0,04 Gy pour les cellules étalées 4 heures et 24 heures avant irradiation (figure 20).

A

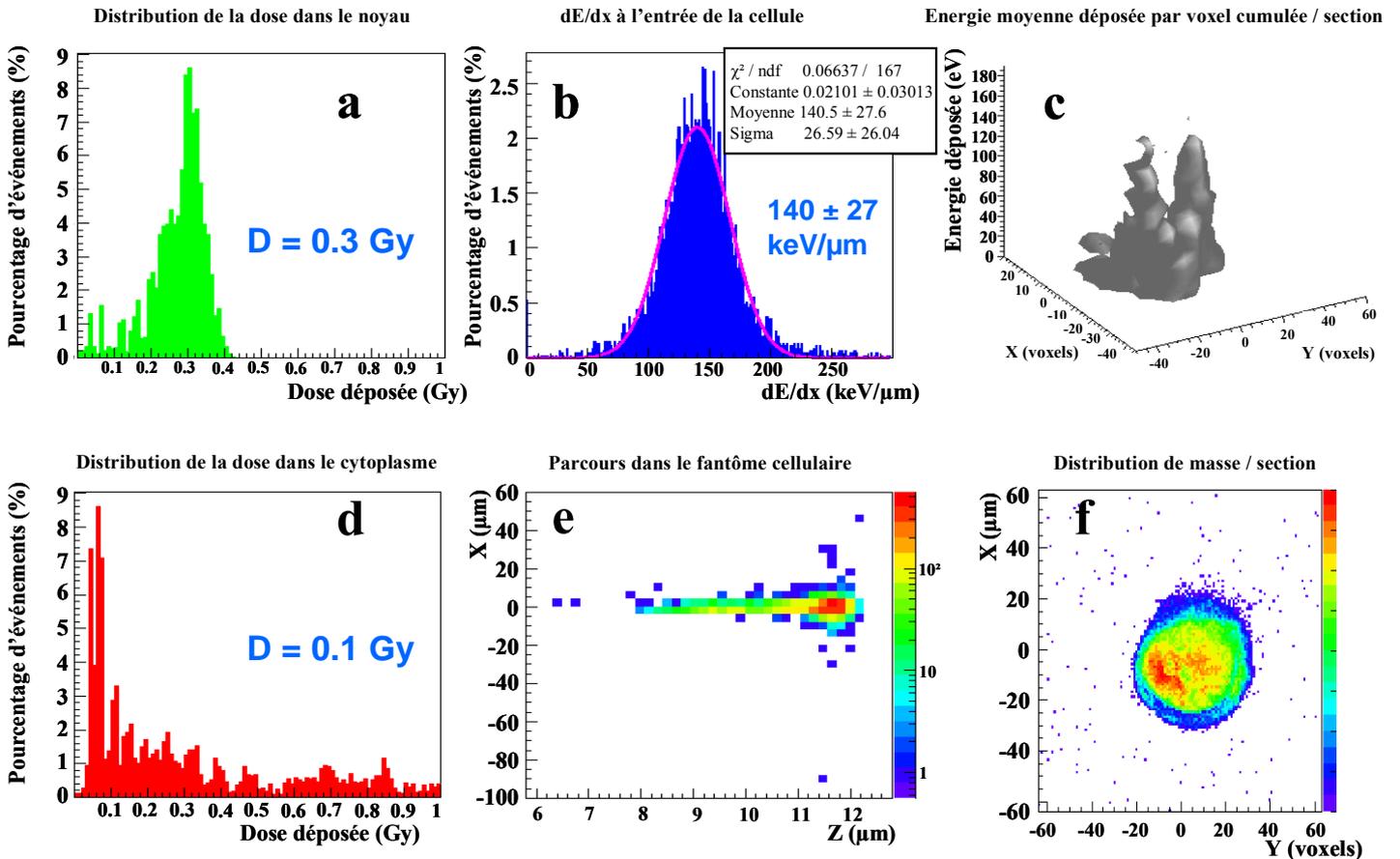


Figure 20 A : *Microdosimétrie et simulation Monte Carlo*. Résultats des simulations pour des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg étalées 4 heures avant irradiation. Le graphique (a) représente la distribution de dose absorbée dans le noyau, (b) la distribution du pouvoir d'arrêt à l'entrée de la cellule. (c) L'énergie moyenne déposée par voxel sur une section transverse de la cellule. (d) La distribution de dose absorbée dans le cytoplasme. (e) La distribution dans le plan horizontal des parcours dans la cellule irradiée obtenus pour une densité de 1 g/cm^3 par voxel avec comme composition chimique de l'eau ; le faisceau arrive de la gauche et l'origine de l'axe des abscisses se situe à l'entrée du puits de culture. (f) La densité cellulaire projetée dans le plan transverse.

B

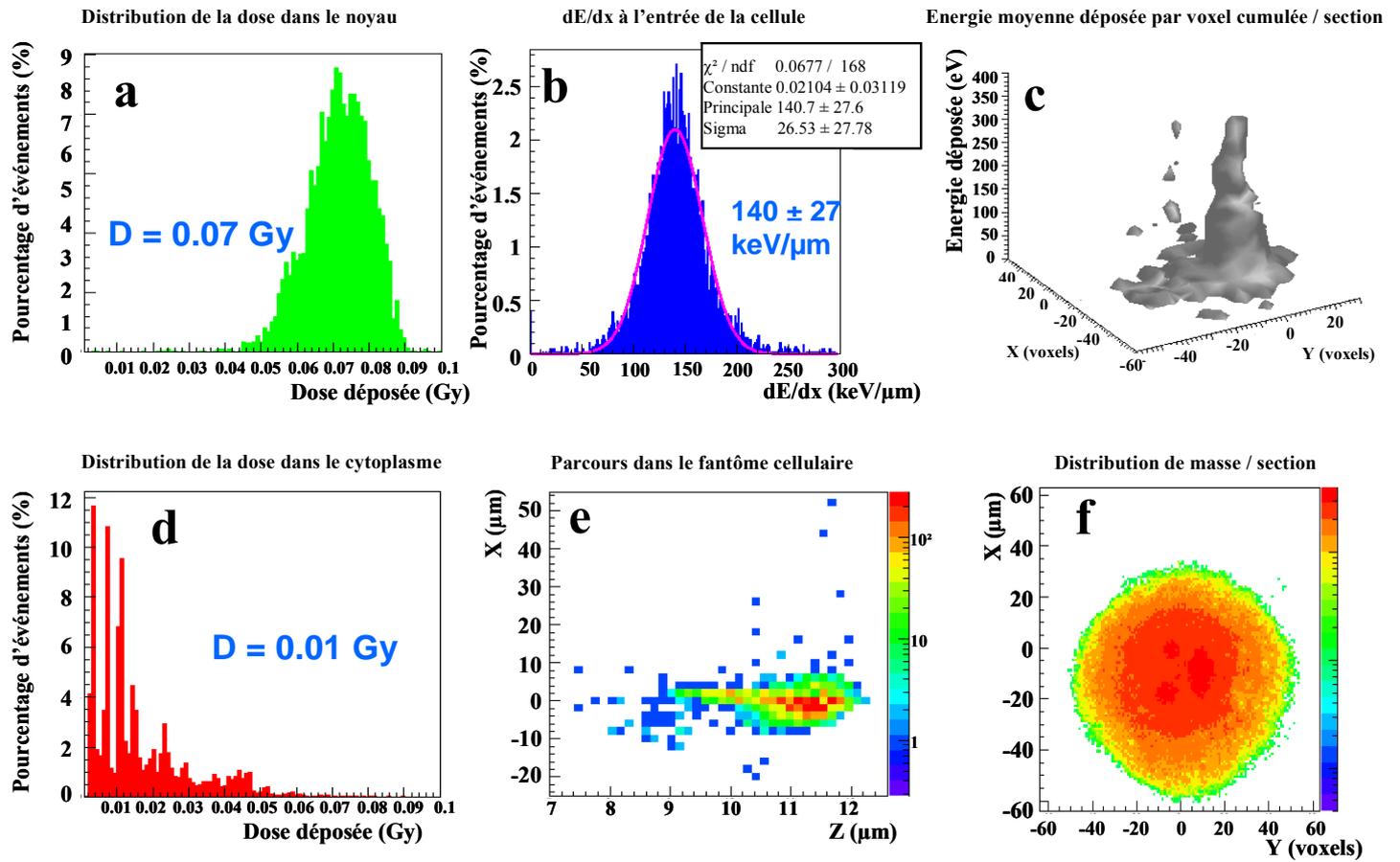


Figure 20 B : *Microdosimétrie et simulation Monte Carlo*. Résultats des simulations pour des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg étalées 24 heures avant irradiation. Le graphique (a) représente la distribution de dose absorbée dans le noyau, (b) la distribution du pouvoir d'arrêt à l'entrée de la cellule. (c) L'énergie moyenne déposée par voxel sur une section transverse de la cellule. (d) La distribution de dose absorbée dans le cytoplasme. (e) La distribution dans le plan horizontal des parcours dans la cellule irradiée obtenus pour une densité de 1 g/cm^3 par voxel avec comme composition chimique de l'eau ; le faisceau arrive de la gauche et l'origine de l'axe des abscisses se situe à l'entrée du puits de culture. (f) La densité cellulaire projetée dans le plan transverse.

En revanche, dans les deux cas de figure étudiés, le faisceau incident traverse les cellules irradiées avec un trajet total estimé à environ 12 μm . Les particules α s'arrêtent donc dans le milieu de culture après avoir traversé les cellules. Enfin, le pouvoir d'arrêt moyen a été estimé et est de l'ordre de $140 \pm 27 \text{ keV}/\mu\text{m}$ à l'entrée des cellules.

4. Validation expérimentale sur matériel biologique de la ligne d'irradiation du CENBG.

Dans le cas de l'irradiation de cellules par un faisceau de particules α , de nombreuses cassures double brin sont générées. Afin de valider l'efficacité du dispositif dans les conditions réelles d'expériences, il est nécessaire de pouvoir observer les dommages induits par l'irradiation. Il est donc indispensable de répondre aux interrogations concernant, **(i)** la méthodologie utilisable afin d'observer les lésions induites par les interactions entre rayonnement ionisant et matière vivante ; **(ii)** notre capacité à détecter ces cassures ; **(iii)** la possibilité de les quantifier et d'observer une relation entre le nombre de ces cassures et la dose délivrée.

Il a été clairement établi dans la littérature que les rayonnements ionisants induisent des « cassures » de l'ADN (simple et double brin). Les cassures double brin peuvent être aisément identifiées au niveau moléculaire et cellulaire en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines de réparation de l'ADN. Parmi ces protéines, il a été montré que l'histone H2A.X subit une modification post-traductionnelle (phosphorylation de la sérine 139) initiée par la présence des cassures double brin de l'ADN. Ainsi, dans les 3 minutes qui suivent une lésion double brin de l'ADN, la phosphorylation de sérine 139 en position C-terminale de la protéine H2A.X (appelée γ -H2A.X) est induite. De plus, il existe une association entre le nombre de protéines H2A.X phosphorylées et le nombre de cassures double brin présentes. Cette réponse de la cellule est immédiate et maintenue au cours du temps et ce, jusqu'à la réparation ou non de la molécule d'ADN.

Afin de valider l'ensemble de la procédure expérimentale, de l'obtention d'un microfaisceau de particules α stable et contrôlé jusqu'à la mise en évidence d'altérations biologiques associées à une irradiation contrôlée et ciblée, nous avons tenu à identifier précisément les impacts des particules α sur nos cellules. Ces cassures double brin générées par les rayonnements ionisants peuvent être aisément identifiées au niveau moléculaire et cellulaire en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines de réparation de l'ADN. Comme pour les dispositifs microfaisceau de Munich (SNAKE) et de Darmstadt (GSI), et dans un souci de validation de notre dispositif sur du matériel biologique, nous avons recherché les effets directs générés sur les cellules par une irradiation sous microfaisceau d'ions et plus particulièrement au niveau de l'ADN et des cassures double brin.

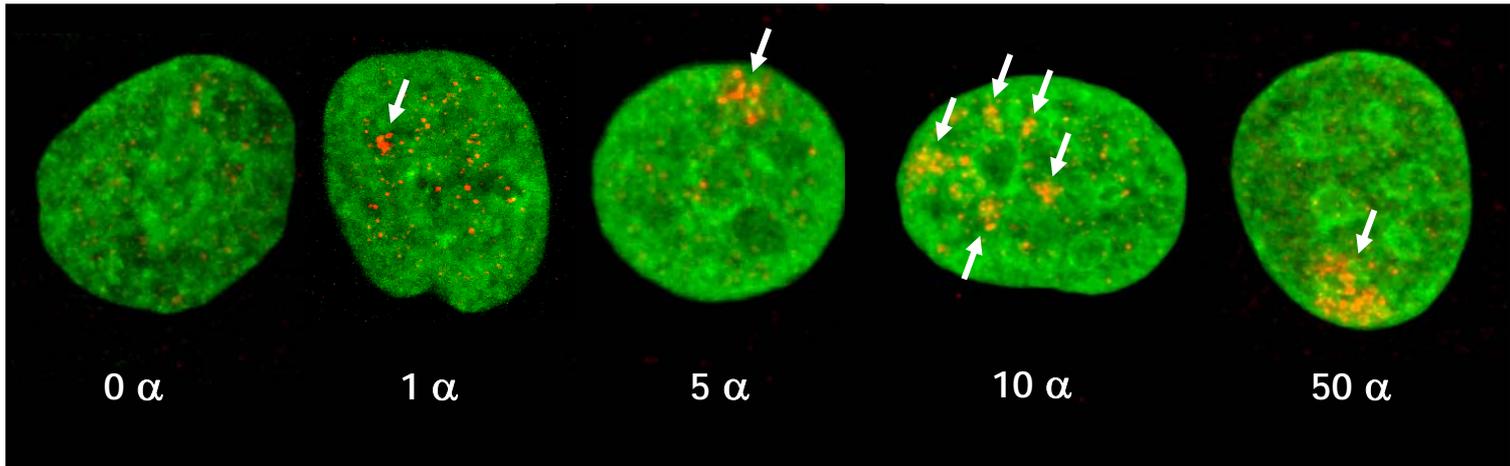


Figure 21 : *Distribution des foci γ -H2A.X sur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg.* Observation en microscopie confocale de cellules irradiées par 1, 5, 10 et 50 particules α (énergie de 2,34 MeV à l'entrée de la cellule), fixées 8 heures post irradiation. Le profil de distribution varie selon le nombre de particules incidentes, avec, dans les cellules impactées, l'apparition de foci γ -H2A.X de tailles hétérogènes, très brillants et surtout essentiellement localisés à une région très restreinte du noyau cellulaire.

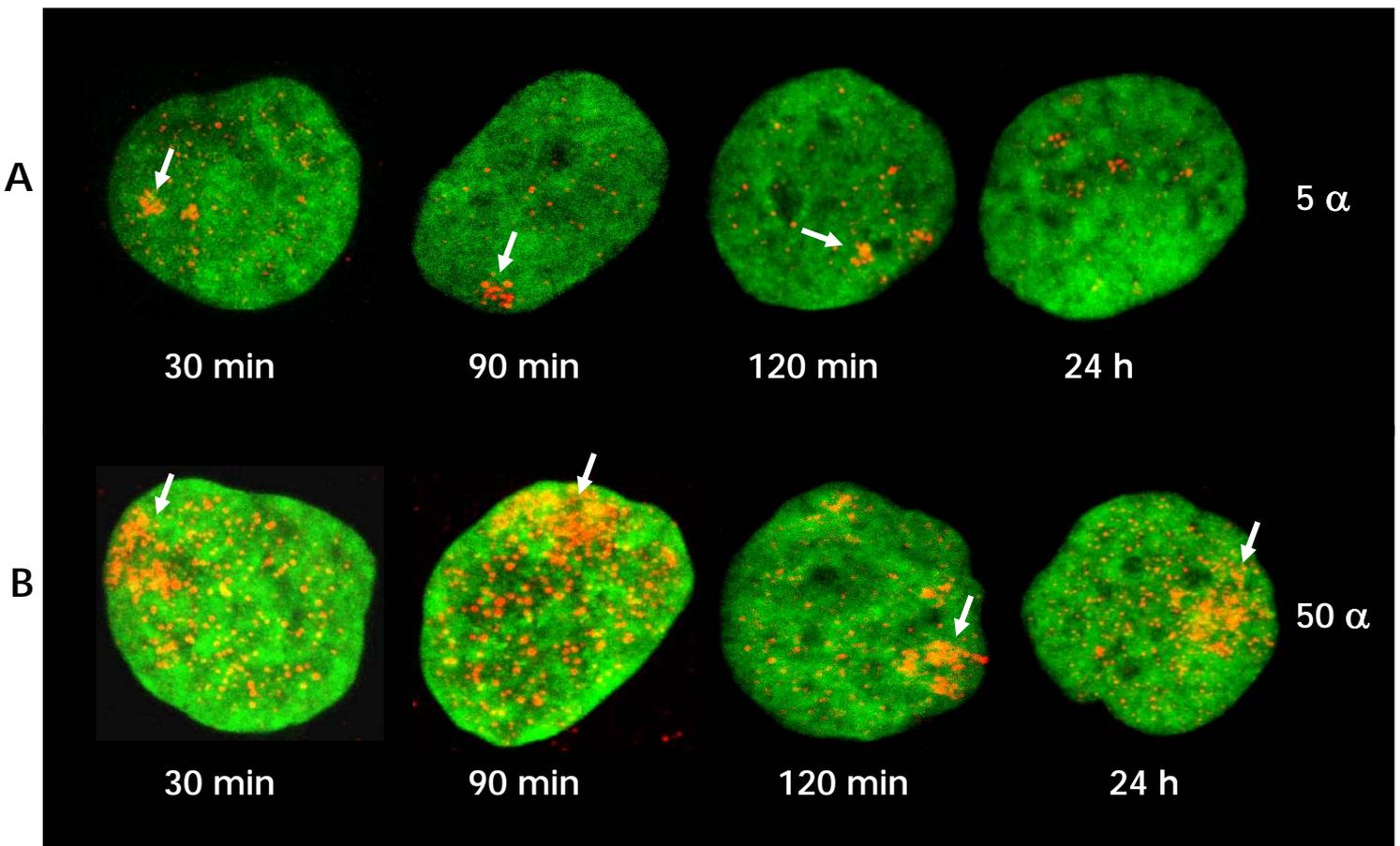


Figure 22 : *Observation qualitative des foci γ -H2A.X sur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg en microscopie confocale.* Les cellules sont irradiées par 5 ou 50 particules α , de 2,34 MeV à l'entrée de la cellule, avant d'être fixées aux temps de 30, 90, 120 minutes et 24 heures post irradiation. Pour les cellules irradiées par 5 particules (A), les foci sont visibles à partir de 30 minutes post irradiation et sont en nombre maximum pour 90 et 120 minutes. Après 24 heures, il n'est pas possible de distinguer de foci « radio-induits ». Pour les cellules irradiées par 50 particules (B), les foci, visibles dès 30 minutes persistent jusqu'à 24 heures.

Nous avons donc décidé d'utiliser cette protéine et notamment la modification post-traductionnelle associée aux cassures double brin pour mettre en évidence l'impact des particules α générées par notre procédure d'irradiation sous microfaisceau d'ions, cellule à cellule, ion par ion.

Nous rappelons brièvement que 3 spots de 1500-2000 cellules sont étalés dans le puits d'irradiation 24 heures avant exposition sous microfaisceau. La présence de 3 spots cellulaires indépendants, séparés par un centaine de micromètres, nous permet : **(i)** d'optimiser le temps de faisceau en testant 3 conditions expérimentales par puits ; **(ii)** d'obtenir des contrôles internes (cellules exposées aux mêmes conditions expérimentales mais non irradiées). Les particules α de 3MeV sont ciblées sur les noyaux cellulaires, identifiés grâce à la présence de l'histone H2B-GFP. Les cellules sont ensuite replacées dans les conditions de culture de routine. A différents temps post-irradiation (de 30 minutes à 24 heures), les différentes populations cellulaires sont fixées pour être analysées en microscopie confocale afin de déterminer plusieurs paramètres : **(i)** l'efficacité de ciblage (pourcentage de cellules impactées, distribution spatiale des dommages à l'échelle sub-cellulaire) ; **(ii)** l'efficacité du dépôt de dose cellule à cellule (estimation du taux de dommages cellulaires en fonction du nombre de particules défini au préalable).

a. Mise en évidence des cassures double brin de l'ADN induites sous microfaisceau d'alpha

Ainsi, après une irradiation ciblée et contrôlée sous microfaisceau d'ions, le profil (taille, intensité), le nombre et de la distribution spatiale des foci γ -H2A.X observés dans les noyaux de cellules irradiées diffèrent très nettement de ce qui peut être observé dans les noyaux de cellules contrôle (non exposées, non irradiées) ou de cellules exposées aux mêmes conditions expérimentales mais non impactées. Ceci est d'autant plus remarquable que le nombre de foci γ -H2A.X présents dans les cellules contrôles est très important (> 100 en moyenne par noyau cellulaire). Cependant, ces foci γ -H2A.X, que nous appellerons « spontanés », sont de faible intensité, de taille homogène et de distribution uniforme au niveau nucléaire. En revanche, dans les cellules impactées, les foci γ -H2A.X « radio-induits » sont de taille hétérogène, très brillants et surtout essentiellement localisés à une région très restreinte du noyau cellulaire (< 2-2.5 μ m de diamètre - figure 21). On peut également remarquer que d'un simple point de vue qualitatif, il est possible de mettre en évidence une relation entre le nombre de foci γ -H2A.X « radio-induits » observés dans les noyaux cellulaires impactés et le nombre de particules α incidentes (5 et 50 particules), et ce, à différents temps post-irradiation (30 min, 2 heures, 24 heures), comme représenté dans la figure 22.

L'analyse de plusieurs échantillons indépendants a permis de déterminer le pourcentage de cellules présentant une réponse γ -H2A.X radio-induites 2 heures et 24 heures après irradiation avec 5 ou 50 particules α . Ainsi, ce pourcentage, 2 heures après irradiation, est de 59.51% (+/- 4.25, n =403) et de 62.07% (+/- 1.41, n =322) avec 5 et 50 particules, respectivement. 24 heures après irradiation par 50 particules α , 55.05% (+/- 1.45, n =1002) des cellules présentent encore des foci γ -H2A.X « radio-induits » typiques. De manière très intéressante, après un temps de 24 heures après irradiation, il n'est pas possible de distinguer précisément le nombre de cellules impactées avec 5 particules α . Ces différentes observations suggèrent donc une réponse cellulaire différente dans la prise en charge des cassures double brin de l'ADN foci γ -H2A.X « radio-induits » au cours du temps et surtout en fonction du nombre de particules incidentes. Les foci γ -H2A.X « radio-induits » par 5 particules α après 2 heures d'irradiation ont disparu à 24 heures ce qui suggèrent une capacité de réparation de la cellule, fait impossible ou retardé, semble-t-il pour des foci γ -H2A.X « radio-induits » par 50 particules α .

Ces observations nous permettent de conclure que le pourcentage de cellules présentant des foci γ -H2A.X « radio-induits » après irradiation par notre dispositif expérimental en mode microfaisceau ion par ion, cellule par cellule, est de l'ordre de 60.78 % (+/- 1.28, n= 725) 2 heures après irradiation et de 55.05 % (+/- 1.45, n =1002) 24 heures post-irradiation.

b. Distribution nucléaire périphérique des cassures double brin de l'ADN « radio-induites »

Un des points remarquables des toutes premières observations faites sur les premiers échantillons irradiés a été la mise en évidence quasi systématique de la distribution des foci γ -H2A.X « radio-induits » en périphérie du noyau et ce, malgré le fait que notre dispositif « cible » le barycentre géométrique de ces mêmes noyaux cellulaires. Cette observation peut en partie expliquer pourquoi une partie des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg ciblées ne présentent pas de foci γ -H2A.X « radio-induits ».

Dans le souci d'optimiser notre procédure expérimentale, nous nous sommes attachés à déterminer l'origine de cette distribution périphérique des foci γ -H2A.X « radio-induits ». Ainsi, nous avons pu mettre en évidence, qu'en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales d'irradiation mais en ciblant cette fois-ci des motifs définis préalablement gravés sous vide sur des plaques de CR39, il existe un décalage souvent aléatoire entre les impacts réels des particules et la position de la cible (figure 23). Parmi les explications d'ordre technique possibles, on peut mettre en cause un décalage optique lié aux phénomènes de faces « non parallèles » provenant du puits de culture que l'on a du mal à corriger.

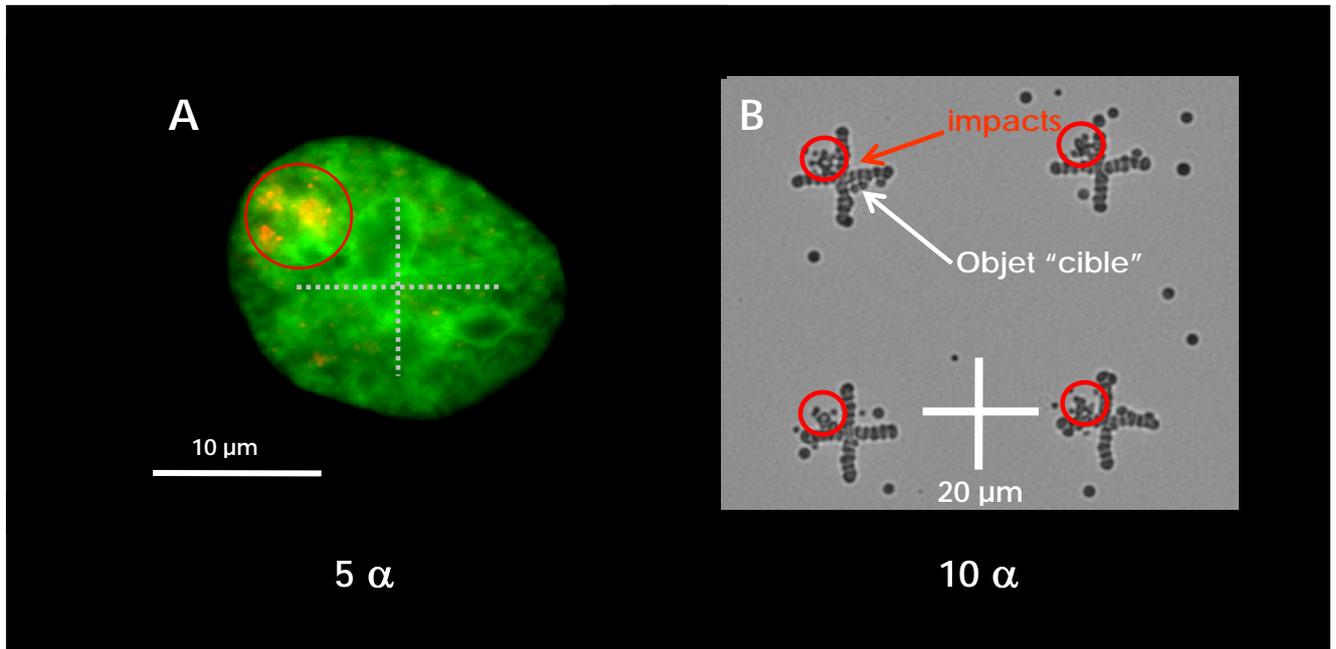


Figure 23 : Localisation périphérique des foci γ -H2A.X. Observation des foci γ -H2A.X sur une cellule HaCaT/[H2B-GFP]Tg (A) en microscopie confocale après une irradiation par 5 particules α de 2.34 MeV. Pour vérifier l'origine de la distribution périphérique du dépôt de particules, 10 particules α sont déposées sur une feuille de CR39 (B) dans les conditions d'irradiation cellulaire en prenant le centre de la croix comme cible. La surface du dépôt des particules est restreinte sur le CR39 et dans le noyau cellulaire ($<10 \mu\text{m}$) mais présente un décalage.

On peut également suspecter la procédure d'étalonnage au cours de laquelle les repérages optiques pourraient être entachés d'erreurs. Enfin, une incertitude non négligeable dans la reconnaissance des noyaux cellulaires pourrait se cumuler avec les sources précédentes.

c. Distribution des cassures double brin de l'ADN « radio-induites » sous forme de « clusters »

L'analyse des dommages cellulaires en imagerie confocale et, plus précisément, des cassures double brin de l'ADN à l'aide de la cinétique et de la distribution spatiale de la phosphorylation de la protéine H2A.X (γ -H2A.X), nous a permis de mieux définir la nature de ces dommages. L'obtention d'images hautement résolutive avec des résolutions en xy de l'ordre de 140 nm et en z de l'ordre de 240 nm, permet de disséquer la répartition des cassures double brin de l'ADN dans ce volume nucléaire. Ces observations nous ont permis de montrer qu'un noyau cellulaire a une épaisseur moyenne de $6.54 \mu\text{m}$ ($\pm 1.20 \mu\text{m}$) pour un diamètre de $10 \mu\text{m}$ et que les foci γ -H2A.X « radio-induits » observés se répartissent dans

une zone très limitée de 2.5 μm de diamètre et sur la totalité de l'épaisseur du noyau irradié. Ces données expérimentales semblent être en accord avec les prédictions des simulations Monte Carlo qui montrent que les particules traversent complètement la cellule et s'arrêtent quelques micromètres après dans le milieu de culture. Il est important de souligner, à ce stade de l'expérimentation, que les résolutions et les modes de reconstruction en 3D des images numériques et confocales acquises ne permettent pas de définir de « traces de dommages cellulaires » associées à une seule particule, mais semblent plutôt suggérer une répartition complexe et aléatoire des dommages sous forme de « clusters ». Ces « clusters » illustrent la complexité des interactions de particules de haute énergie avec le vivant et notamment la molécule d'ADN. Les « clusters » sont la combinaison de multiples cassures double brin de l'ADN (franches ou décalées) sur des motifs plus ou moins longs de l'ADN. Ces clusters sont, de ce fait, beaucoup plus hétérogènes, difficiles à définir et donc à réparer par des mécanismes appropriés du type recombinaison homologue, MMR pour « Mismatch excision repair » et par conséquent très dangereux pour la cellule (figure 24).

d. Analyse quantitative des cassures double brin de l'ADN « radio-induites » – Vers la définition d'une relation dose-effet en fonction du temps.

A la suite de ces observations qualitatives, il est très vite apparu nécessaire de développer et de valider une méthode d'analyse numérique afin de quantifier de manière exhaustive et reproductible les foci $\gamma\text{-H2A.X}$ (cassures double brin de l'ADN).

Ainsi, nous avons utilisé le logiciel de traitement d'images et d'analyses numériques Metamorph. Ce logiciel autorise le développement de Macros qui appliquent et contrôlent automatiquement un nombre défini de séquences de traitement comme la définition de seuils, la projection en z de pixels, la détermination et le transfert de zones d'intérêt pour un fluorophore donné et enfin, la quantification de pixels en fonction de paramètres de sélection pré-établis. L'avantage de ce type d'outil est d'être en mesure de traiter de grandes séries d'images sans intervention spécifique de l'expérimentateur. Outre le gain de temps dans le traitement des données, cet outil permet également de s'affranchir de tout biais subjectif lié à « l'œil » de l'expérimentateur.

La macro METAMORPH développée nous permet donc de quantifier les dommages cellulaires spécifiques (cassures ADN double brin, cellules apoptotiques, micronoyaux, ...) induits par les particules α . Les analyses ont été appliquées à différents temps post-irradiation de 30 minutes à plusieurs heures (2 et 24 heures), pour différentes doses de particules α (5 et 50).

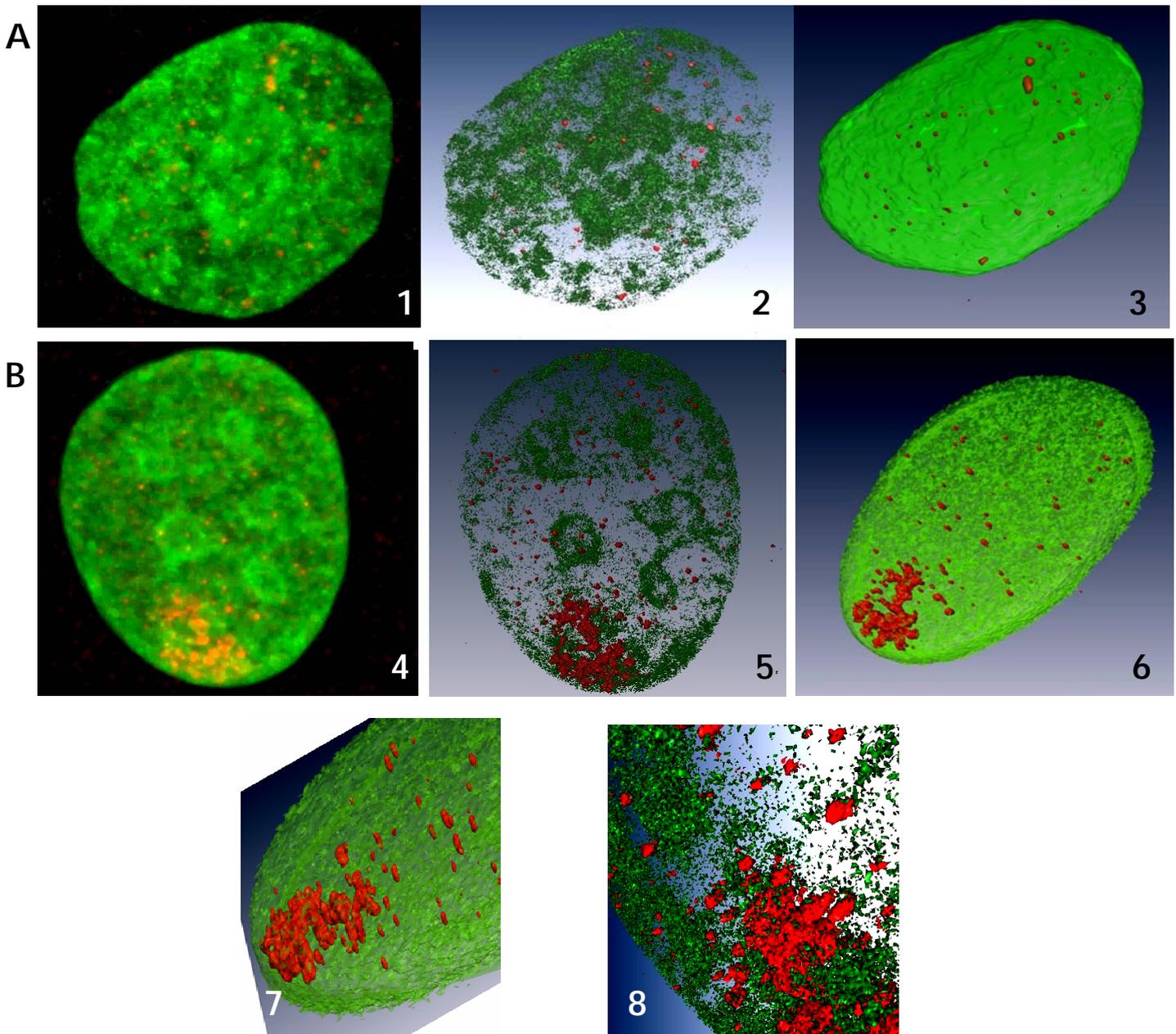
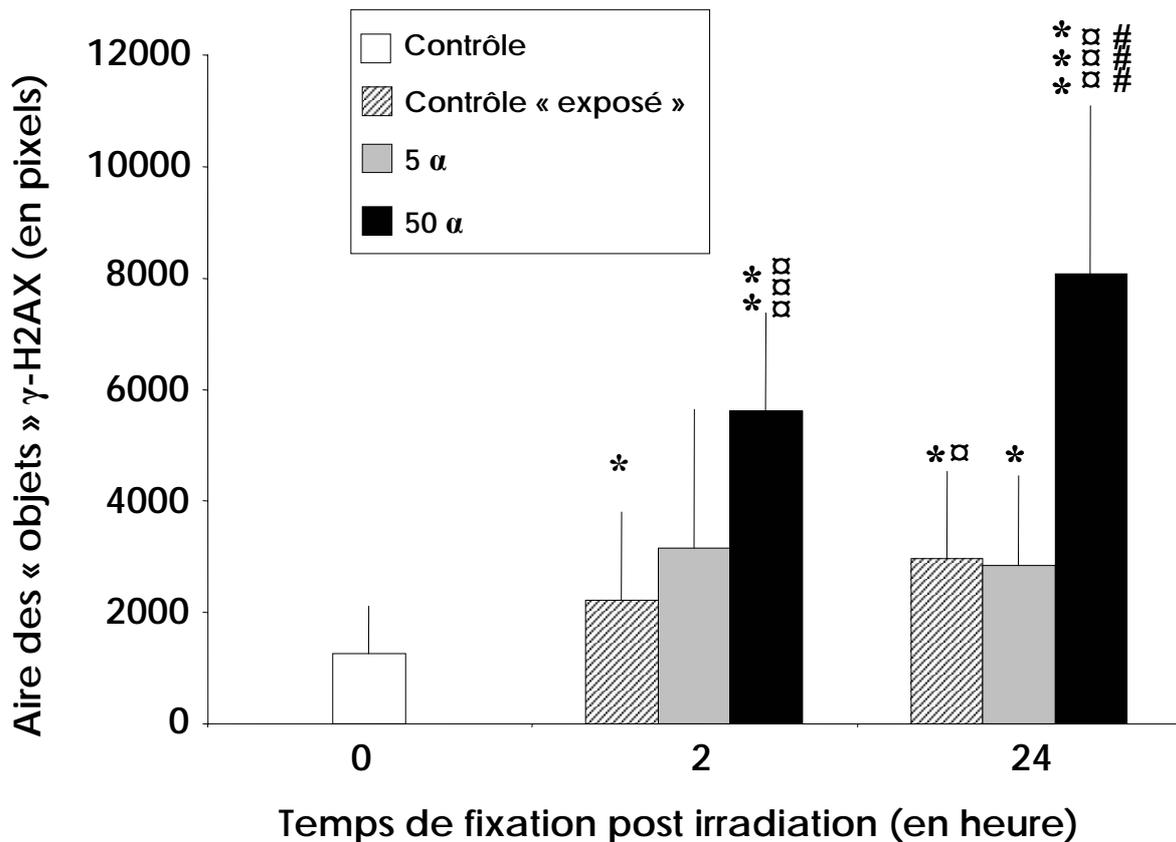


Figure 24 : « Cluster » de foci γ -H2A.X dans le noyau de cellule HaCaT/[H2B-GFP]Tg. Observation en microscopie confocale de noyaux de cellules contrôles (A) et irradiées par 50 particules de 2,34 MeV (B), fixées 8 heures post irradiation. La reconstruction en trois dimensions (1 et 4) seuillée pour le canal de la GFP dans le logiciel AMIRA (2 et 5) est ensuite reconstruite (3 et 6). La GFP (vert) permet de repérer dans le noyau cellulaire la position des foci γ -H2A.X (rouge) dans le noyau. Les agrandissements obtenus pour la cellule irradiée par 50 particules (7 et 8) suggèrent une répartition complexe et aléatoire des dommages sous forme de « clusters » avec une répartition et une taille différentes des foci de la cellule contrôlée.

Différents paramètres ont donc été quantifiés : le nombre, la taille (en pixels) et l'intensité de chaque « objet » γ -H2A.X, « l'aire » couverte par les foci γ -H2A.X pour chaque noyau (« aire » H2B-GFP) en fonction du nombre de particules α incidentes et du temps de culture post-irradiation. Ces données expérimentales quantitatives nous ont permis de confirmer les observations qualitatives faites initialement. En effet, la quantification des « aires » correspondant au signal « γ -H2A.X » (rouge) et au signal « H2B-GFP » (vert) permet de mettre en évidence une corrélation entre le nombre de particules incidentes et les dommages à l'ADN générés 2 heures après irradiation, le signal « γ -H2A.X » par rapport au signal « H2B-GFP », par comparaison aux cellules contrôles non irradiées (aire de 2218 +/- 1589 pixels, n=27) montre une très nette augmentation du signal « γ -H2A.X » dans des cellules irradiées avec 5 particules (aire de 3256 +/- 2491 pixels, n=7) et encore plus avec 50 particules (aire de 5617 +/- 1760 pixels, n=6). A 24 heures, le signal « γ -H2A.X » pour les cellules contrôles non irradiées augmente (aire de 2967 +/- 1557 pixels, n=9), alors que le signal « γ -H2A.X » reste constant pour des cellules irradiées avec 5 particules (aire de 2845 +/- 1605 pixels, n=15). Ce signal augmente encore pour les cellules irradiées avec 50 particules (aire de 8074 +/- 3018 pixels, n=10). Ces données (figure 25) confirment donc la corrélation entre le nombre de particules et les effets biologiques observés et montrent également une différence de réponse au cours du temps entre les cellules irradiées avec 5 et 50 particules. Par ailleurs, dans le cas de cellules non irradiées et non exposées aux illuminations pour le repérage des cellules, l'aire du signal « γ -H2A.X » est de 1251 +/- 857 pixels, n=39.

Cette observation est d'autant plus intéressante et surprenante dès lors que l'on considère les cellules contrôles (non exposées, non irradiées) et les cellules contrôles internes (exposées aux conditions d'irradiation mais non irradiées). L'analyse des signaux obtenus pour les foci « γ -H2A.X » dans ces différentes cellules montre de manière tout à fait inattendue une augmentation du nombre de foci γ -H2A.X avec un ratio $R=1.77$ et $R=2.73$ respectivement à 2 et 24 heures. D'après ces données, il devient alors difficile de distinguer la différence entre des cellules irradiées avec 5 particules et des cellules contrôles exposées mais non irradiées, ce qui confirme les observations qualitatives. Ceci suggère donc de façon très préliminaire, qu'après 24 heures, des cellules irradiées avec 5 particules sont capables de « réparer » les dommages générés sur l'ADN alors que des cellules irradiées par 50 particules ne semblent pas « réagir ».



T-test : *, p<0.01 (vs Ctrl-0) - □, p<0.01(vs Ctrl-2h)
 **, p<0.005 (vs Ctrl-0)
 ***, p<0.001 (vs Ctrl-0) - □□□, p<0.001 (vs Ctrl-2h) - ###, p<0.001 (vs Ctrl-24h)

Figure 25 : **Analyse quantitative de l'aire des objets γ -H2A.X** sur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg acquises en microscopie confocale. Ce graphe présente les résultats des aires des objets γ -H2A.X selon les traitements des cellules vis-à-vis de cellules de puits non irradiés, obtenus pour des cellules contrôles, non illuminées (□) ou exposées (▨), des cellules ayant subi une irradiation par 5 particules α (■) ou par 50 particules α (■), avant d'être fixées à la paraformaldéhyde 1%, traitées au NH_4Cl (50 mM) et être traitées selon les protocoles classiques employés pour l'immunocytofluorescence. L'analyse des données effectuée avec la macro Metamorph confirme la corrélation entre le nombre de particules et les effets biologiques observés mais montre également une différence de réponse au cours du temps entre les cellules irradiées avec 5 et 50 particules. Il est difficile de distinguer des cellules irradiées avec 5 particules des cellules contrôles exposées mais non irradiées. Les résultats obtenus pour un test t sont indiqués avec l'intervalle de confiance correspondant.

Et de manière très surprenante, il existe également une induction de taux de phosphorylation de la protéine H2A.X dans des cellules dites « contrôles » non irradiées mais exposées aux mêmes conditions expérimentales. Sans pour autant être en mesure d'expliquer ce

phénomène, ces données tendent à suggérer la présence d'un effet de proximité dont l'origine reste indéterminée : artefact expérimental ? Communication intercellulaire ?

L'utilisation de la Macro Metamorph permet non seulement d'étudier et de comparer les aires relatives associées aux différents marqueurs d'intérêts mais également d'étudier d'un point de vue quantitatif la distribution du nombre de foci γ -H2A.X en prenant en compte leur taille et leur intensité. Cette étude a notamment permis de montrer que l'interaction de 5 et de 50 particules avec le noyau cellulaire provoque une augmentation du nombre total de foci γ -H2A.X dans les cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg impactées. Il est également important de souligner que la distribution en fonction de la taille permet de mettre en évidence une hétérogénéité des foci γ -H2A.X corrélée avec le nombre de particules incidentes. En d'autres termes, plus le nombre de particules est important, plus le nombre et la taille des foci γ -H2A.X augmentent (figure 26). Cette analyse permet enfin de confirmer d'une autre façon, les observations précédemment réalisées concernant : **(i)** la différence entre cellules contrôles non exposées, non irradiées et les cellules contrôles exposées mais non irradiées. Ces dernières montrent un plus grand nombre de foci γ -H2A.X et de plus grande taille (en pixels) ; **(ii)** la différence des réponses cellulaires au cours du temps et notamment 24 heures après irradiation avec 5 et 50 particules α . Les cellules irradiées avec 5 particules ne se différencient pas des cellules contrôles exposées, non irradiées à 24 heures post-irradiation.

e. Apoptose et Micronoyaux

Dans un souci d'optimiser les informations obtenues à l'échelle de la cellule unique, l'utilisation conjointe de la méthode de quantification numérique et de marqueurs tels que la protéine histone recombinée H2B-GFP, a permis de mesurer d'autres réponses cellulaires aux rayonnements ionisants comme l'induction de l'apoptose, la présence d'instabilité génomique. Ainsi, l'observation des modifications de la structure chromatinienne (condensation, fragmentation) au travers de la distribution de la protéine fluorescente H2B-GFP, n'a pas permis de mettre en évidence de modifications significatives de la structure de la chromatine (en relation avec l'apoptose) dans le noyau de cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg irradiées avec 5 ou 50 particules, et ce pour les différents temps post-irradiation. De même, aucune différence significative du nombre d'altérations de type micronoyau n'a pu être montrée.

Des protocoles plus spécifiques et adaptés à la définition de ces différents critères sont cependant nécessaires avant de conclure de manière définitive.

Conclusion générale - Discussion

Les effets d'expositions à de faibles doses et faibles débits de doses de rayonnements ionisants au niveau cellulaire et les risques potentiels de ces expositions sur la santé humaine ne sont pas encore suffisamment bien connus et soulèvent des questions au regard des normes de radioprotection pour l'homme et pour l'environnement. L'évaluation de ces risques constitue donc un vrai défi scientifique (Masse & Pasquier, 1997).

De nombreuses études épidémiologiques estiment les risques cancérigènes d'une exposition aux rayonnements ionisants entre 0,2 et 5 Sv. Cependant, les doses, auxquelles est soumis le public, sont généralement beaucoup plus faibles : les doses délivrées par la plupart des examens radiologiques sont inférieures à une dizaine de mSv. Les irradiations auxquelles sont exposés les travailleurs ou les personnes habitant dans des régions dans lesquelles la radioactivité naturelle est élevée, sont également de cet ordre ou légèrement supérieures. Or, les études épidémiologiques disponibles ne décèlent aucun effet pour des doses inférieures à 100-200 mSv. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : soit il n'existe aucun effet pour les doses inférieures à 100-200 mSv, soit la statistique des enquêtes était insuffisante pour les détecter. Cependant, les résultats obtenus au cours de certaines enquêtes réalisées sur un grand nombre de sujets, montrent que le risque, s'il existe, devrait être très faible. Il est peu vraisemblable que, dans un avenir proche, de nouvelles enquêtes parviennent à estimer ces risques éventuels et encore moins à les exclure. En effet, le suivi de cohortes, même de plusieurs centaines de milliers de sujets, ne pourra pas mettre en évidence un faible excès d'incidence ou de mortalité venant s'ajouter à une incidence de cancer qui est déjà très élevée dans les populations non irradiées et qui fluctue en fonction des conditions de vie. Seules des comparaisons entre des régions géographiques à haute et faible irradiation naturelle, et dans lesquelles les conditions de vie sont semblables pourraient apporter des informations pour cette gamme de dose et de débit de dose. Il est donc nécessaire de suivre attentivement les résultats des enquêtes en cours au Kerala (Inde) et en Chine (AIEA, 1986 ; voir pour revue Masse, 2001).

L'utilisation de méthodes d'évaluation directe étant difficile, nous sommes contraints, pour estimer les risques éventuels des faibles doses (< 100 mSv), d'extrapoler à partir des effets cancérigènes observés entre 0,2 et 5 Sv. Une relation linéaire décrit convenablement la relation entre la dose et l'effet cancérigène pour les doses supérieures à 200 mSv pour lesquelles des données expérimentales sont disponibles. Ces résultats ont paru justifier l'utilisation d'une relation linéaire sans seuil (RLSS) afin d'estimer le risque aux faibles doses. Cependant dans le domaine des doses inférieures à quelques dizaines de mSv, les données radiobiologiques récentes ont mis en doute la validité de cette procédure (Tubiana *et al.*, 2006). En effet, ces données sont en désaccord avec les deux hypothèses sur lesquelles la relation linéaire sans seuil est implicitement fondée, à savoir : **(i)** la constance de la probabilité de mutation (par unité de dose) quels que soient la dose et le débit de dose ;

(ii) le processus de cancérogenèse, après avoir été initié dans une cellule, évolue indépendamment des lésions éventuellement présentes dans les cellules environnantes.

En effet, les données récentes mettent en évidence l'existence de mécanismes de défense contre les altérations du génome à l'échelle de la cellule, du tissu et de l'organisme qui limitent la prolifération d'une cellule « initiée » dans un tissu ou un organisme multicellulaire :

1. Il a été montré que la cellule ne subit pas passivement l'accumulation des lésions causées par les rayonnements. Elle se défend et réagit par au moins trois mécanismes : (i) en mettant en oeuvre des systèmes enzymatiques de détoxification dirigés contre les espèces actives de l'oxygène, apparues à la suite du stress oxydatif ; (ii) en éliminant les cellules lésées (mutées ou instables), grâce à deux mécanismes : l'apoptose (qui peut être déclenchée par des doses de l'ordre de quelques mSv afin de tuer les cellules dont le génome a été altéré ou présente des dysfonctionnements) et la mort au moment de la mitose des cellules dont les lésions n'ont pas été réparées ; (iii) en mettant en oeuvre des systèmes de réparation de l'ADN qui sont stimulés ou activés par des doses de l'ordre d'une dizaine de mSv.

Il existerait, de plus, des systèmes de signalisation intercellulaire qui informent chaque cellule sur le statut de cellules environnantes ayant été lésées.

Cette modulation des réactions de défense de la cellule en fonction de la dose, du débit de dose, de la nature et du nombre de lésions, des conditions physiologiques de la cellule et du nombre de cellules atteintes explique les fortes variations de radiosensibilité (mortalité cellulaire ou probabilité de mutation, par unité de dose) qui sont observées : hypersensibilité cellulaire initiale au cours d'une irradiation quand la dose est faible, puis au delà de 200 mSv apparition d'une radiorésistance induite avec diminution de la mortalité cellulaire (par unité de dose), variations brutales de la radiosensibilité après une irradiation intense et brève, radio-adaptation c'est-à-dire diminution temporaire de la radiosensibilité dans les heures ou les jours qui suivent une première irradiation à faible dose, etc... (Bonner, 2004).

2. D'autre part, il était admis que la radiocancérogenèse était initiée par une lésion du génome atteignant de façon aléatoire quelques cibles spécifiques (proto-oncogènes, gènes suppresseurs, etc.). Or, la radiocancérogenèse semble, aujourd'hui, relever d'un processus complexe au sein duquel peuvent s'associer lésions génétiques et épigénétiques et surtout dans lequel les relations entre la cellule initiée et les cellules environnantes jouent un rôle essentiel. Ce processus de cancérogenèse se heurte à des mécanismes efficaces de défense à l'échelle du tissu et de l'organisme.

Ces observations suggèrent donc une moindre efficacité des faibles doses, voire l'existence d'un seuil qui pourrait être lié soit à l'absence de mise en oeuvre des mécanismes de signalisation et de réparation pour les très faibles doses, soit à l'association apoptose + réparation non fautive + immunosurveillance, sans qu'il soit possible, en l'état actuel de nos connaissances, de fixer le niveau de ce seuil (entre 5 et 50 mSv ?) ou d'en démontrer

l'existence. Ces réactions peuvent aussi expliquer l'existence d'un phénomène d'hormesis dû à la stimulation des mécanismes de défense, notamment à la lutte contre les formes actives de l'oxygène.

Globalement, ces résultats montrent qu'il n'est pas justifié d'utiliser une relation linéaire sans seuil (RLSS) pour estimer le risque cancérigène des faibles doses à partir des observations effectuées pour des doses allant de 0,2 à 5 Sv, puisqu'un même incrément de dose a une efficacité variable en fonction des conditions d'irradiation et notamment de la dose totale et du débit de dose.

En conclusion, la RLSS peut être considérée comme un outil pragmatique très utile pour fixer les règles de radioprotection pour des doses supérieures à une dizaine de mSv. Cependant, n'ayant pas complètement intégré les concepts biologiques correspondant à nos connaissances actuelles, elle doit être utilisée avec précaution pour estimer par extrapolation l'effet des faibles et surtout des très faibles doses (< 10 mSv).

Face à ce constat et bien conscients que les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés, nous avons développé une approche expérimentale afin d'appréhender le rôle des processus moléculaires et cellulaires de reconnaissance et de réparation des lésions radio-induites par de faibles doses de rayonnements ionisants. Il semble que, parmi les différentes lésions radio-induites de l'ADN, les plus accessibles aux systèmes de réparation soient également celles qui sont les plus rapidement et les mieux réparées après une exposition aux rayonnements ionisants.

Généralement, les cassures double brin et les dommages multiples localisés sont considérés comme les lésions radio-induites les plus délétères pour les cellules en terme de létalité et d'effets génotoxiques à long terme. Nous nous sommes donc appliqués, dans un premier temps, à définir la nature des lésions radio-induites générées par un faisceau de particules alpha mono-énergétique de 3 MeV contrôlé en termes de dose et de résolution spatiale.

Le microfaisceau d'ions développé au Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan, nous a permis de réaliser des irradiations de populations cellulaires de kératinocytes humains avec un contrôle précis du nombre de particules délivrées (- de 2.3% de particules non délivrées), une efficacité de ciblage sur cellule de l'ordre de 60% et une résolution spatiale de +/- 5 μm (faisceau de particules extrait à l'air).

Ces données sont compatibles avec l'irradiation de structures sub-cellulaires comme le noyau et nous avons mis en place une étude basée sur l'utilisation conjointe des méthodes d'immunofluorescence et d'imagerie confocale ainsi que sur des méthodes de quantification numérique. Ainsi, nous avons pu : **(i)** identifier en partie la nature des lésions générées sur l'ADN de kératinocytes humains après exposition à de faibles doses de particules α ; **(ii)** réaliser les premières quantifications de ces dommages à l'échelle de la

cellule unique ; **(iii)** suivre le devenir de ces lésions, étape préalable à la définition des voies moléculaires induites lors des phases précoces de la reconnaissance et de la réparation de ces dommages.

Au cours de cette étude, nous avons dû faire face aux interrogations suivantes : **(i)** la définition de la dose à l'échelle cellulaire, et notamment, le passage du nombre de particules par cellule à l'expression de cette dose physique en unité conventionnelle (Gray,...) utilisée en radiobiologie et en radiothérapie ; **(ii)** l'innocuité des méthodes utilisées afin de marquer précisément des structures sub-cellulaires spécifiques et les conséquences inhérentes, notamment lors de faibles doses d'exposition ; **(iii)** la définition de « marqueurs » biologiques d'intérêts et spécifiques aux expositions de faibles doses de rayonnements ionisants (nature, cinétique de réponse) ; **(iv)** l'identification et la quantification des ces « bio-marqueurs » radio-induits à l'échelle de la cellule unique ; **(v)** l'influence du fond génétique sur les réponses moléculaires et cellulaires associées.

Notion de dose et apport de la microdosimétrie

L'une des questions importante pour évaluer la pertinence des études microfaisceau par rapport à la problématique des faibles doses d'exposition sur le vivant concerne la définition de la dose délivrée à l'échelle de la cellule. La définition la « plus simple » consiste à considérer un nombre de particules par cellule. Cependant, il est alors très difficile de relier cette donnée aux doses conventionnellement utilisées à l'échelle du tissu dans le cadre clinique (radio-diagnostic, radiothérapie) et exprimées en Gray.

Pour cela, nous avons mis en place des codes de simulation Monte-Carlo qui permettent d'estimer et de définir la dose délivrée dans les cellules au cours de l'irradiation par des particules α , de la manière la plus réaliste possible. Outre l'évaluation d'une dose pour nos expériences en microfaisceau, ces simulations nous ont permis une comparaison objective inter et intra-expérience. Ces calculs simulent les trajectoires des ions en prenant en compte les interactions avec la matière (ligne, air, cellule...) ainsi que les pertes d'énergie associés pour l'ensemble du dispositif. Ils prennent en compte : **(i)** les caractéristiques physiques de la ligne microfaisceau ; **(ii)** l'environnement immédiat des cellules (puits et support de culture) ; **(iii)** les modèles biologiques irradiés.

Il est intéressant de noter que jusqu'à ce jour, les divers modèles utilisés reposaient essentiellement sur des géométries cellulaires très schématiques (parallélépipèdes, ellipsoïdes de révolution). En dehors des composants de la ligne de faisceau, il était donc nécessaire d'implémenter dans ces outils de simulation les caractéristiques physiques réalistes des systèmes biologiques étudiés comme le volume et la géométrie cellulaire, la masse volumique, la densité ou encore la composition chimique élémentaire. Ainsi, en implémentant l'ensemble de ces caractéristiques, nous avons établi des « fantômes

numériques » plus réalistes. Ce travail a été effectué en combinant les qualités des différentes microscopies à notre disposition, microscopie confocale et microscopie ionique, associées à des outils de reconstruction et d'analyses numériques.

Cette définition de « fantômes » et leur intégration dans les simulations nous ont permis d'optimiser les conditions expérimentales. Ainsi avons mis en évidence l'impact de la morphologie cellulaire sur le dépôt en énergie lors du passage des particules. Les modes de préparation des échantillons avant irradiation ont en effet une influence directe sur le dépôt de dose. L'épaisseur des cellules dépend énormément des temps d'incubation. Par exemple, le dépôt de dose moyen peut ainsi varier d'un facteur 2.5 à 4 selon la région sub-cellulaire considérée (respectivement noyau et cytoplasme) et en fonction du temps d'incubation pré-irradiation (4 et 24 heures). Dans tous les cas, ces calculs montrent que les particules α incidentes ont un trajet total estimé à 12 μm et traversent donc la totalité du volume cellulaire pour s'arrêter dans le milieu de culture. Le pouvoir d'arrêt moyen estimé à l'entrée des cellules est de l'ordre de $140 \pm 27 \text{ keV}/\mu\text{m}$.

Par ailleurs, ces études nous ont également permis de montrer également que le temps d'incubation des cellules dans le puits d'irradiation jouait un rôle primordial sur l'état sanitaire et donc potentiellement sur les réponses cellulaires et moléculaires induites par une irradiation (perturbation de l'homéostasie ionique, notamment des ions calcium, sodium et potassium).

Ces données préliminaires demandent à être complétées en intégrant notamment, dans les calculs de simulation, les compositions chimiques élémentaires et les densités réelles des différents compartiments cellulaires. Nous nous sommes donc attachés à caractériser nos lignées cellulaires dans ce but. A l'heure actuelle, et dans un souci de simplification, les calculs considèrent des cellules de constitution et de densité homogène (eau avec une densité de 1).

Vers la génération de dommages radio-induits spécifiques

L'une des questions fondamentales concernant l'effet des faibles doses de rayonnements ionisants sur le vivant repose sur la capacité : **(i)** de ces faibles doses à générer des dommages radio-induits ; **(ii)** de la cellule à reconnaître, à distinguer ces dommages radio-induits des dommages occasionnés spontanément lors d'un métabolisme cellulaire normal, et à les prendre en charge.

L'étude des faibles doses nécessite de distinguer des effets radio-induits à faible dose du bruit de fond environnant associé. Il apparaît malheureusement que certaines méthodologies expérimentales souvent utilisées par la communauté reposent, lors des phases d'irradiation, sur l'utilisation de facteurs physiques et chimiques dont l'innocuité reste à démontrer.

Ainsi, lors d'irradiations microfaisceau de cibles subcellulaires spécifiques, noyaux cellulaires en particulier, il n'est pas rare de voir l'utilisation conjointe de colorants basés sur des agents intercalants (Hoechst³³³⁴², Hoechst³³³⁵⁸) et de rayonnement ultra-violet. L'impact combiné de ces deux agents a déjà été caractérisé et est bien connu pour les effets délétères associés sur le métabolisme de l'ADN. Il a été démontré en particulier qu'un marquage au Hoechst³³³⁴² effectué 1 heure après une illumination aux ultra-violets, a pour effet de diminuer la fraction survivante de cellules (gliomes) alors qu'un traitement avant illumination montre une baisse de la létalité cellulaire (Singh *et al.*, 2004). Ces résultats s'expliqueraient par les réactions d'interférence entre le Hoechst³³³⁴² et les topoisomérases, qui se trouvent alors accumulées sous forme de complexes dits « cleavables ». Enfin, la formation de dimères de thymines induite par la combinaison du Hoechst³³³⁴² et d'une illumination aux ultra-violets stabilise les lésions de l'ADN et ne permet pas la reconnaissance des coupures de l'ADN (Moné *et al.*, 2001).

Bien que, lors des expériences d'irradiation où le colorant Hoechst est utilisé, des populations cellulaires contrôles soient traitées en parallèle, il nous a cependant semblé important de s'affranchir de ce stress supplémentaire infligé aux cellules et d'envisager une nouvelle approche expérimentale compatible avec : **(i)** la reconnaissance spécifique *in vivo* de structures sub-cellulaires ; **(ii)** l'absence d'agents chimiques et physiques exogènes nécessaires au repérage des cellules au cours de la phase d'irradiation ; **(iii)** le suivi *in vivo* et en temps réel d'altérations cellulaires radio-induites.

Bien que le mode de reconnaissance cellulaire basé sur l'utilisation conjointe des rayonnements ultra-violets et du Hoechst³³³⁴² reste encore très répandu dans la communauté (facilité d'utilisation), certaines équipes suivent actuellement cette nouvelle voie pour les phases de repérage des cellules. Des modèles cellulaires transgéniques exprimant des protéines chimères fusionnées à des protéines de type GFP, ou bien des méthodes de reconnaissance uniquement basée sur de la microscopie optique classique (Ross *et al.*, 2005) sont les alternatives généralement envisagées.

L'approche originale que nous avons développée est basée sur la création et la caractérisation de lignées cellulaires transgéniques exprimant de manière constitutive l'histone H2B fusionnée à la GFP. Outre la reconnaissance exclusive et spécifique du noyau cellulaire, cette protéine recombinante autorise la définition de différents paramètres tels que : **(i)** la position dans le cycle cellulaire ; **(ii)** des anomalies cytogénétiques (micronoyaux, ponts inter-chromosomiques) ; **(iii)** l'induction de processus apoptotiques.

Deux populations clonales ont ainsi été développées (HaCaT/[H2B-GFP]Tg, HPK/[H2B-GFP]Tg). La population clonale HaCaT/[H2B-GFP]Tg a été totalement caractérisée et utilisée en routine lors de nos irradiations par microfaisceaux d'ions. C'est la première validation expérimentale d'une telle méthode en condition d'irradiation par microfaisceau.

Vers de nouveaux « marqueurs radiobiologiques »

La relation dose-effet repose sur l'identification et la quantification de « marqueurs » en réponse à des expositions de rayonnements ionisants. Historiquement, le paramètre essentiel et de référence déterminant cette relation est la survie clonogénique. Ce paramètre a été choisi pour son application potentielle en thérapie, qui cherche à déterminer avec plus ou moins de précision, le taux de mort cellulaire pour une dose moyenne définie. L'utilisation de ce paramètre en conditions expérimentales nécessite l'établissement d'une relation de causalité sans faille entre la dose moyenne déposée et la mort cellulaire associée quelques semaines plus tard.

Reste que cette survie clonogénique comme le taux de mort cellulaire sont l'expression de processus de réponses complexes, multiples et tardifs des populations cellulaires. De nombreuses variations peuvent ainsi être mises en évidence selon la nature des expositions, le type d'irradiation ou encore le type cellulaire testé. Cependant, il apparaît que toutes les lignées cellulaires ne se prêtent pas aux expériences de survie clonogéniques (Jensen *et al.*, 2000), que les événements moléculaires et cellulaires associés ne sont pas déterminés et que de nombreuses variantes sont décelées dans l'application des protocoles expérimentaux (temps d'incubation, nombre de cellules par clones, conditions de culture, ...).

Dans un souci d'apporter une meilleure définition de la relation dose-effet, nous nous sommes attachés à définir des « observables » objectives, qui puissent nous renseigner facilement sur le métabolisme de l'ADN et les processus apoptotiques, tout en permettant un suivi immédiat puis dans le temps, de l'impact de doses définies de rayonnements ionisants. Nous avons donc décidé d'étudier les cassures double brin de l'ADN au travers de la cinétique de phosphorylation de la sérine en position 139 de l'histone H2A.X, la condensation et la fragmentation chromatinienne au travers de la répartition de la protéine H2B-GFP, et enfin la formation de micronoyaux. Les critères moléculaires qui caractérisent ces trois processus sont bien établis, stricts et surtout peuvent se transposer à tous types de lignées cellulaires *in vitro*, voire sur des organes *in vivo* (Hu *et al.*, 2005).

Actuellement, de nombreuses publications mènent à penser que la phosphorylation de la sérine en position 139 de l'histone H2A.X ou de protéines apparentées, mesurée par différentes techniques, notamment la cytométrie en flux, peut apporter une nouvelle méthode de quantification moléculaire directe pour des études fondamentales de la relation dose-effet, à des fins de diagnostic lors d'expositions accidentelles ou enfin dans le cadre de suivis en radiothérapie (Leatherbarrow *et al.*, 2006 ; Rothkamm *et al.*, 2007).

Vers la quantification de ces nouveaux « marqueurs radiobiologiques »

L'analyse de la cinétique des modifications biochimiques et post-traductionnelles *in vivo*, comme de la cinétique de phosphorylation de la sérine en position 139 de l'histone H2A.X (appelée γ -H2A.X) ou d'autres protéines impliquées dans le processus de réplication, de

réparation, et de la transcription de l'ADN, est aujourd'hui bien répandue. Plusieurs méthodes d'analyse sont à notre disposition mais reposent généralement sur l'utilisation de grandes quantités de matériels biologiques et montrent des seuils de sensibilité de détection qui sont difficilement compatibles avec les exigences de l'irradiation par microfaisceau d'ions. Il est donc nécessaire de trouver des méthodes alternatives qui autorisent la détection et la mesure de dommages radio-induits à faible dose de rayonnements ionisants et à l'échelle de la cellule unique. Parmi ces nouvelles méthodes, l'utilisation conjointe de l'imagerie numérique à haute résolution et d'applications informatiques dédiées semble prometteuse. Bien que ces méthodes soient encore en cours de développement et de validation, elles permettent déjà d'obtenir des informations concernant la distribution spatiale et la quantité des ces dommages au sein d'un seul noyau cellulaire. L'automatisation de l'acquisition ainsi que le traitement numérique et statistique des données permettent d'obtenir une bonne représentation des dommages radio-induits par une analyse cellule par cellule au sein d'une population cellulaire (Böcker & Illiakis, 2006).

Cependant, la pertinence de ces analyses repose sur la définition de paramètres de normalisation inter et intra-expérience reproductibles, la définition de seuils de détection réalistes, et enfin la définition de taille d'« objet » exprimée en pixels représentative d'une réalité biologique... Sur ce dernier point, la microscopie confocale en 3D de foci γ -H2A.X permet d'obtenir une distribution de la taille des « foci » γ -H2A.X généralement exprimée en pixels. La difficulté vient ici de la définition de la taille « normale » d'un foci, ou bien encore de la taille minimale du foci à prendre en considération lors des analyses statistiques.

Couplée à l'immunocytofluorescence dirigée contre la forme phosphorylée de l'histone H2A.X, la méthode utilisée dans ces travaux a permis de quantifier le nombre de foci γ -H2A.X en fonction du nombre de particules incidentes et en fonction du temps. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une corrélation existe entre le nombre de particules déposées et la quantité d'« objets » γ -H2AX recensée.

Les avantages d'une telle méthodologie sont nombreux puisqu'elle permet : **(i)** de s'affranchir de tout biais introduit par une observation subjective liée à l'œil de l'expérimentateur – De nombreuses études sont encore réalisées par comptage de visu des foci sous microscopie en épifluorescence ; **(ii)** de valider les performances du dispositif employé pour l'irradiation ion par ion ; **(iii)** d'observer une corrélation entre la dose déposée et le nombre de dommages observés ; **(iv)** de définir une cinétique de réponse en fonction du nombre de particules.

Cependant, l'application développée pour cette approche nécessite des améliorations. A ce jour, la quantification des dommages radio-induits de l'ADN nécessite une projection en z des différents plans de coupe des cellules obtenus en microscopie confocale. Cette projection induit donc une sous-estimation du nombre de foci et pose le problème de la

définition de la taille réelle d'un foci γ -H2AX. Des développements, en cours actuellement, ont pour objectif de réaliser une quantification numérique plus fine plan par plan.

Ceci est d'autant plus important que l'existence d'un certain nombre de cassures double brin de l'ADN n'est plus une notion suffisante pour expliquer les effets des rayonnements ionisants (Ward *et al.*, 2003). La structure moléculaire de ces cassures peut s'avérer être très complexe. En particulier, des études ont montré que la létalité due à des cassures double brin de l'ADN induites par des rayonnements ionisants de haut TLE se trouve significativement plus élevée que la létalité due à des cassures double brin de l'ADN induites par des rayonnements de faible TLE (Taucher-Sholz *et al.*, 1996). Les cassures générées à haut TLE regroupent en effet toute une combinaison de cassures double et simple brin, très proches les unes des autres et surtout difficilement reconnues par les systèmes adaptés de réparation de l'ADN. On peut estimer que les techniques expérimentales actuelles ne permettent pas de séparer et donc d'analyser la complexité de ces nombreuses lésions regroupées au niveau de un ou de plusieurs loci (Scholz *et al.*, 2003).

Des modèles de dommage en « grappes » ou « cluster » récemment développés se basent sur le fait que l'énergie de la particule incidente est déposée de manière hétérogène dans l'environnement immédiat de l'ADN, à une échelle nanométrique où apparaissent des « clusters d'ionisations ». Ces modèles de clusters reposent principalement sur l'idée selon laquelle l'effet biologique des rayonnements ionisants est essentiellement dû aux micro-dépôts d'énergie intenses (grappes d'ionisations) produits par les particules ionisantes, tout particulièrement en fin de parcours.

Nos observations en microscopie confocale, font apparaître des foci γ -H2A.X dans le noyau des cellules irradiées avec une distribution qui suggère une répartition sous forme de « clusters ». Néanmoins, nous nous approchons des limites de résolution de la microscopie confocale notamment (240 nm en z) et il est encore difficile de conclure quant à la distribution exacte de ces dommages. Le développement de méthodes numériques quantitatives plan par plan en complément de méthodes d'analyses de biologie moléculaire et cellulaire (par exemple, étude de la co-localisation de protéines spécifiques des différents systèmes de réparation de l'ADN) vont donc être nécessaires.

L'influence du fond génétique et de la protéine P53

Initialement, notre étude a été réalisée sur une population cellulaire de kératinocytes humains HaCaT immortalisés spontanément. Outre l'origine tissulaire et l'exposition potentielle *in vivo* de ces cellules, leur immortalité associée à la conservation de leurs capacités de prolifération, de régénération, de différenciation et de transformation, ont définitivement orienté notre choix. Cependant, ces cellules présentent de nombreuses altérations génétiques (remaniements chromosomiques et mutations ponctuelles – Boukamp *et al.*,

1997). Parmi ces mutations, il est intéressant de noter que les deux allèles du gène P53 portent les mutations suivantes : **(i)** transition C > T au codon 179, **(ii)** une modification des bases CC > TT aux codons 281 et 282. Ces mutations se situent dans des « hot spots » sensibles aux ultra-violets, et au niveau protéique, dans les sites spécifiques de liaison à l'ADN.

La protéine P53 est une phosphoprotéine nucléaire, indispensable au maintien de l'intégrité du génome et au contrôle de cycle cellulaire. Elle se lie à des séquences d'ADN spécifiques et régule l'expression de différents gènes de régulation impliqués dans la croissance. Elle interagit avec d'autres protéines en réponse aux altérations de l'ADN et induit l'apoptose quand les altérations ne peuvent être réparées. Sa fonction primaire est de contrôler l'entrée de la cellule en phase S du cycle. Des mutations somatiques dans le gène p53 ont été retrouvées dans presque 50 % des tumeurs et 80% des cancers de peau. Bien que nous ayons caractérisé la réponse apoptotique de ces deux populations HaCaT et HaCaT/[H2B-GFP]Tg suite à une exposition à des doses croissantes et contrôlées de rayonnements ultra-violets et montré la capacité de ces deux lignées à répondre positivement, il est probable que ce fond génétique particulier vis à vis du gène p53 participe à la « réponse aux rayonnements ionisants » en « retardant/ ralentissant » l'induction des voies de signalisation de la cascade apoptotique P53-médiée. Face à ce constat, nous avons décidé de développer et de caractériser une seconde population cellulaire de kératinocytes primaires transgéniques pour l'histone H2B-GFP afin de comparer l'influence du fond génétique, et plus précisément du statut génétique P53 sur la relation dommages de l'ADN radio-induits et apoptose. Plusieurs populations clonales primaires de kératinocytes transfectées pour l'histone H2B-GFP ont été établies et les premières irradiations sous microfaisceau réalisées. De ces toutes premières expériences, nous avons pu mettre en évidence des réponses différentes avec notamment, à 24 heures post-irradiation, la présence de nombreuses cellules en apoptose (présence de noyaux pycnotiques). La caractérisation de ces populations de kératinocytes primaires est toujours en cours.

Nous nous proposons également de ré-introduire une protéine P53 fonctionnelle dans les cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg par transfection d'une forme thermosensible de la protéine murine P53 (Mp53ts) (Paramio *et al*, 2000).

Vers la définition de l'effet de proximité : artefact expérimental ou réalité biologique

Au cours des cinq dernières années, de nombreuses publications (plus de 250 articles entre 1997 et 2004, Mothersill & Seymour, 2004) ont mis en évidence, notamment lors d'irradiations sous microfaisceau d'ions, que les cellules irradiées avec de faibles doses de rayonnements ionisants induisent une réponse cellulaire de la part des cellules non-irradiées avoisinantes. Par ailleurs, certaines expériences ont mis en évidence que des milieux de culture dans lesquels des cellules avaient été exposées induiraient également une réponse de la part de cellules non irradiées plongées ultérieurement dans ces milieux. De nombreuses hypothèses

ont été avancées afin d'expliquer cet « effet de proximité » mais les difficultés rencontrées pour reproduire ces données d'un dispositif expérimental à un autre, d'un type cellulaire à un autre et pour identifier un mécanisme moléculaire défini, soulèvent la controverse.

L'outil et la méthodologie associée que nous avons développés nous permettent d'envisager maintenant ce type d'études. De manière très surprenante et assez inattendue, nous avons par exemple observé une augmentation « globale » du taux de phosphorylation de la protéine H2A.X dans des cellules dites « contrôles » non irradiées mais exposées aux mêmes conditions expérimentales. Ces observations préliminaires soulèvent de nombreuses interrogations. En effet, et sans pour autant être en mesure à ce jour d'expliquer ce phénomène, des pistes peuvent être avancées telles que : **(i)** la présence d'un artefact expérimental qui altérerait le métabolisme des cellules et l'induction de cassures double brin de l'ADN ; **(ii)** la génération d'un biais lors de l'acquisition ou du traitement des données numériques entre cellules non irradiées et irradiées (seuil, ...) ; **(iii)** la présence d'un effet de proximité dont l'origine reste indéterminée mais qui suggère la mise en place d'un ou plusieurs mécanismes de communication intercellulaire en réponse à une irradiation cellulaire.

A ce jour, il nous est impossible de conclure et seules la reproduction de ces observations sur un plus grand nombre d'échantillons et l'utilisation de mesures complémentaires pourront nous apporter une preuve de la présence réelle ou artefactuelle de cet effet.

En conclusion, l'obtention et la validation expérimentale d'un microfaisceau d'ions au centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan nous ont permis d'ouvrir de larges perspectives expérimentales allant de l'interaction ion-vivant jusqu'à l'appréhension des mécanismes de réponses moléculaires et cellulaires à de faibles doses de rayonnements ionisants. Ce dispositif expérimental, a le potentiel pour répondre aux interrogations de plus en plus pressantes de l'effet des faibles doses de rayonnements sur le vivant. Il devrait permettre une étude fine des mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux qui dirigent les grandes voies métaboliques associées à la conservation du patrimoine génétique ou encore des processus radio-pathologiques, comme le cancer. Il nous offre une formidable opportunité de mieux comprendre les mécanismes d'interaction ion-matière vivante avec l'ensemble des implications qui en découleront : **(i)** amélioration des règles de radio-protection et de radio-diagnostic ; **(ii)** développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses.

Index des figures et des tableaux

Index des figures

Figure 1. Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN.

Figure 2. Réparation des cassures double brin de l'ADN par Recombinaison Homologue.

Figure 3. Réparation des cassures double brin de l'ADN par Recombinaison Non-Homologue.

Figure 4. Chaîne de désintégration du radon.

Figure 5. Les atteintes par l'inhalation du radon et de ses descendants.

Figure 6. Propagation de la phosphorylation de l'histone H2A.X suite à une cassure double brin de l'ADN.

Figure 7. Représentation schématique résumant les réponses moléculaires induites suite à une génération de cassures double brin de l'ADN.

Figure 8. L'accélérateur de la plateforme AIFIRA.

Figure 9. Schéma de principe de la microsonde nucléaire du CENBG.

Figure 10. Principe de fonctionnement de la chambre d'irradiation.

Figure 11. La ligne microfaisceau du CENBG.

Figure 12. Puits de culture monté sur son support d'aluminium.

Figure 13. Conditions de culture dans le puits d'irradiation.

Figure 14. Localisation et expression de la protéine chimère 4-GFP.

Figure 15. Caractérisation du clone HaCaT/[H2B-GFP]Tg par études comparées avec la lignée parentale de kératinocytes humains HaCaT.

Figure 16. Morphologie cellulaire et microdosimétrie.

Figure 17. Epaisseur cellulaire moyenne.

Figure 18. Microanalyse en microscopie ionique (PIXE) de cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg.

Figure 19. Microanalyse en microscopie ionique (PIXE, RBS) de cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg.

Figure 20. Microdosimétrie et simulation Monte Carlo.

Figure 21. Distribution des foci γ -H2A.X sur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg.

Figure 22. Observation qualitative des foci γ -H2A.X sur des cellules HaCaT/[H2B-GFP]Tg en microscopie confocale.

Figure 23. Localisation périphérique des foci γ -H2A.X.

Figure 24. « Cluster » de foci γ -H2A.X dans le noyau de cellule HaCaT/[H2B-GFP]Tg .

Figure 25. Analyse quantitative de l'aire des objets γ -H2A.X.

Figure 26. Distribution du nombre d'objets γ -H2A.X.

Index des tableaux

Tableau 1. Facteurs de pondération des différents types de rayonnements.

Tableau 2. Facteurs de pondération correspondant aux différents types de tissus.

Tableau 3. Résultats des tests pour les différents types de support des puits d'irradiation.

Tableau 4. Tableau des compositions chimiques selon les structures cellulaires utilisées lors des simulations Geant4.

Tableau 5. Comparaison des masses organiques et inorganiques

Références bibliographiques

Académies des Sciences. (1995). "Problèmes liés aux effets des faibles doses des rayonnements ionisants." 1 vol., Rapport n°34, Paris.

Agostinelli S., Allison J., Amoko K., Apostolakis J. *et al* (2003). "GEANT4 a simulation toolkit." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A **506**: 250-303.

AIEA (1986). "Sureté.", Vienne.

Almodovar J.M.R., Guirado D., Núñez M.I., López E., Guerrero R., Valenzuela M.T., Villalobos M. & del Moral R. (2002). "Individualisation of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity." Radiotherapy and Oncology **62**(3): 327-333.

Alpen E.L. (1990). Radiation Biophysics. New Jersey, USA, Prentice-Hall.

Antonelli F., Belli M., Cuttone G., Dini V., Esposito G., Simone G., Sorrentino E. & Tabocchini M.A. (2005). "Induction and repair of DNA double-strand breaks in human cells: dephosphorylation of histone H2AX and its inhibition by calyculin A." Radiat. Res. **164**: 514-517

Azzam E.I., de Toledo S.M., Raaphorst G.P. & Mitchel R.E. (1996). "Low-dose ionizing radiation decreases the frequency of neoplastic transformation to a level below the spontaneous rate in C3H 10T1/2 cells." Radiat. Res. **146**(4): 369-373.

Azzam E.I., Raaphorst G.P. & Mitchel R.E. (1994). "Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells." Radiat. Res. **138**(1): S28-S31.

Azzam E.I., de Toledo S.M. & Little J.B. (2001). "Direct evidence for the participation of gap junction mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from a-particle irradiated to non irradiated cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **98** (2): 473-478.

Bailly I., Champion C., Massiot P., Savarin P., Poncy J.L., Crespin S., Alloy G., Jacob V. & Petibon E. (2002). "Development of an experimental system for biological studies: Scintillation and solid-track detectors as dose monitors." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **187**: 137-148.

Bakkenist C.J. & Kastan M.B. (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.

Ballarini F., Biaggi M., Ottolenghi A. & Sabora O. (2002). "Cellular communication and Bystander effects: a critical review for modelling low-dose radiation action." Mutat. Res. **501**: 1-12.

Banath J.P., MacPhail S.H. & Olive P.L. (2004). "Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines." Cancer Research **64**: 7144-7149.

Barberet Ph. (2004). Développement d'une ligne d'irradiation microfaisceau en mode ion par ion pour la radiobiologie expérimentale à l'échelle cellulaire. Physique. Bordeaux, Université Bordeaux I: 158.

Barberet Ph., A. P., Balana A., Gault N., Incerti S., Lefaix J.L., Michelet-Habchi C., Moretto Ph., Poncy J.L. (2004). "First experiments on cells using the focused microbeam at CENBG." Radiat. Res. **161**: 91-93.

- Barberet Ph., B. A., Incerti S., Michelet-Habchi C., Moretto Ph. & Pouthier Th. (2005). "Development of a focused charged particle microbeam for the irradiation of individual cells." Review of Scientific Instruments **76**: 405-410.
- Barzilai A. & Yamamoto K. (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." DNA Repair **3**(8-9): 1109-1115.
- Bassing C.H. & Alt F.W. (2004). "The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks " DNA Repair **3**(8-9): 781-796.
- Bassing C.H., Chua K.F., Sekiguchi J., Suh H., Whitlow S.R., Fleming J.C., Monroe B.C., Ciccone D.N., Yan C., Vlasakova K., Livingston D.M., Ferguson D.O., Scully R. & Alt F.W. (2002). "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**(12): 8173-8178.
- Baysson H., Tirmarche M., Tymen G., Gouva S., Caillaud D., Artus J.C., Vergnenegre A., Ducloy F. & Laurier D. (2005). "Indoor radon exposure and lung cancer risk. Results of an epidemiological study carried out in France." Rev. Mal. Respir. **22**(4): 587-594.
- Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M.B., Bartek J. & Lukas J. (2006). "Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks." J. Cell Biol. **173**(2): 195-206.
- Belli M., Cera F., Cherubini R., Haque A.M.I., Ianzini F., Moschini G., Sapora O., Simone G., Tabocchini M.A. & Tiveron P. (1993). "Inactivation and mutation induction in V79 cells by low energy protons: re-evaluation of the results at the LNL facility." International Journal of Radiation Biology **63**(3): 331-337.
- Belyakov O.V., Mitchell S.A., Parikh D., Randers-Pehrson G., Marino S.A., Amundson S.A., Geard C.R. & Brenner D.J. (2005) "Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away." Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **102**(40): 14203-14208.
- Bijwaard H., B. M. J. R. S. M. (2005). "Comment on "Studies of radon-exposed miner cohorts using a biologically based model: comparison of current Czech and French data with historic data from China and Colorado" by W.F. Heidenreich, L. Tomasek, A. Rogel, D. Laurier and M. Tirmarche (2004) Radiat Environ Biophys 43:247-256." Radiat. Environ. Biophys. **44**(2): 149-151.
- Billon S., Morin A., Caër S., Baysson H., Gambard J.P. Rannou A. *et al.*, (2004). "Evaluation de l'exposition de la population française à la radioactivité naturelle." Radioprotection **39**(2): 213-232.
- Blakely E.A. & Kronenberg A. (1998). "Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness." Radiat. Res. **150**(5): S126-145.
- Böcker W. & Iliakis G. (2006). "Computational methods for analysis of foci: Validation for radiation-induced γ -H2A.X foci in human cells." Radiat. Res. **165**: 113-124.
- Bonner W.M. (2004). "Phenomena leading to cell survival values which deviate from linear-quadratic models." Mutat Res. **568**(1):33-39.
- Boukamp P., Petrussevka R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. & Fusenig N.E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." The Journal of Cell Biology **106**: 761-771.

- Boukamp P., Popp S., Altmeyer S., Hulsen A., Fasching C., Cremer T. & Fusenig N.E. (1997). "Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT." Genes Chromosomes Cancer **19**(4): 201-214.
- Bowen A.R., Hanks A.N., Allen S.M., Alexander A., Diedrich M.J. & Grossman D. (2003). "Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells." J. Invest. Dermatol. **120**(1): 48-55.
- Boyle P. & Ferlay J. (2005). "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004." Annals of Oncology **16**: 481-488.
- Braby L.A., Brooks A.L. & Metting N.F. (1997). "Cellular effects of individual high-linear energy transfer particles and implications for tissue response at low dose." Radiat. Res. **148**: 108-114.
- Bradbury A. & Olopade O.I. (2006). "The case of individualized screening recommendations for breast cancer." J.C.O. **24**(21): 1-3.
- Brammer I., Zoller M. & Dikomey E. (2001). "Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts." Int J Radiat Biol. **77**(9): 929-38.
- Brennan P. & Bray I. (2002). "Recent trends and future directions for lung cancer mortality in Europe." Br. J. Cancer **87**(1): 43-48.
- Brenner D.J. & Hall E.J. (2002). "Microbeams: a potent mix of physics and biology. Summary of the 5th International Workshop of Microbeam Probes of Cellular Radiation Response." Radiat. Prot. Dosim. **99**: 283-286.
- Brenner D.J., Doll R., Goodhead D.T., Hall E.J., Land C.E., Little J.B., Lubin J.H., Preston D.L., Preston R.J., Puskin J.S., Ron E., Sachs R.K., Samet J.M., Setlow R.B. & Zaider M. (2003). "Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(24): 13761-13766.
- Burma S. & Chen D.J. (2004). "Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks." DNA Repair **3**(8-9): 909-918.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L. & Sauvaigo S. (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." Mutat. Res. **424**: 9-21.
- Campbell J.L., Hopman T.L., Maxwell J.A. & Nejedly Z. (2000). "The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. **170**(1-2): 193-204.
- Catelinois O., Rogel A., Laurier D., Billon S., Hemon D., Verger P. & Tirmarche M. (2006). "Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France : impact of the risk models and uncertainty analysis." Environ. Health Perspect. **114**(9): 1361-1366.
- Celeste A., Difilippantonio S., Difilippantonio M.J., Fernandez-Capetillo O., Pilch D.R., Sedelnikova O.A., Eckhaus M., Ried T., Bonner W.M. & Nussenzweig A. (2003b) "H2A.X haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility." Cell **114**: 371-383.
- Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M.J., Pilch D.R., Staudt D.W., Lee A., Bonner R.F., Bonner W.M. & Nussenzweig A. (2003a) "Histone H2A.X phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." Nat. Cell Biol. **5**: 675-679.

- Celeste A., Petersen S. Romanienko P.J., Fernandez-Capetillo O., Chen H.T., Sedelnikova O.A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M.J., Redon C., Pilch D.R., Olaru A., Eckhaus M., Camerini-Otero R.D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W.M., Nussenzweig M.C. & Nussenzweig A. (2002) "Genomic instability in mice lacking histone H2A.X." Science **296**: 922-927.
- Chauvie S., Francis Z., Guatelli S., Incerti S., Mascialino B., Montarou G., Moretto Ph., Nieminen P. & Pia M.G. (2006). "Monte Carlo simulation of interactions of radiation with biological systems at the cellular and DNA levels: the Geant4-DNA project." Proceeding of 7th International Workshop: Microbeam Probes of Cellular Radiation – New York City, USA soumis à Rad. Res.
- Charlot J.F., Pretet J.L., Haughey C. & Mougin C. (2004). "Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells." Apoptosis **9**: 333-343.
- Cherry R.N. (2000). "Les rayonnements ionisants." Encyclopédie de Sécurité et de Santé au travail, 3^{ème} édition, chapitre 48. Genève, Suisse, Bureau International du Travail.
- Cohn S.H., Gong J.K., Skow R.K. (1953). "Radon inhalation studies in rats." Arch. Ind. Hyg. Occup. Med., **7**: 508-515.
- Critchlow S.E. & Jackson S.P. (1998). "DNA end joining: from yeast to man." Trends Biochem. Sci. **23**: 394-398.
- C.I.R.C. manographs (1998). "The evaluation of carcinogenic risks to humans, man-made mineral fibres and radon, **43**.
- Daboussi F., Dumay A., Delacote F. & Lopez B. (2002). "DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation." Cell Signal. **14**(12): 969-975.
- Davis S.K. & Bardeen C.J. (2003). "Cross-linking of histone proteins to DNA by UV illumination of chromatin stained with Hoechst³³³⁴²." Photochemistry and Photobiology **77**(6): 675-679.
- de Moura Gallo C.V., Azevedo E. Silva Mendonca G., de Moraes E., Olivier M. & Hainaut P. (2005). "TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives." Mutat. Res. **589**(3):192-207.
- Dizdaroglu M. & Gajewski E. (1989). "Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA-protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone." Cancer Res. **49**: 3463-3467.
- Downs J.A. & Jackson S.P. (2003) "Cancer: Protective packaging for DNA." Nature **424**: 732-734.
- Downs J.A., Allard S., Jobin-Robitaille O., Javaheri A, Auger A., Bouchard N., Kron S., Jackson S.P. & Côté J. (2005) "Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites." Molecular Cell **16**(6): 979-990.
- Dynan W.S., Li S., Mernaugh R., Wragg S., & Takeda Y. (2005) "Visualization of DNA double-strand break repair at the single-molecule level." A.C.S. symposium series **904**: 351-373
- Elkind M.M. & Whitmore G.F. (1967). The Radiobiology of Cultured Mammalian Cells, New York, USA, Gordon and Breach).

Environmental Protection Agency (2003). "A Citizen's Guide to Radon: The Guide to Protecting Yourself and Your Family From Radon." Washington.

Epperly M.W., Shields D., Niu Y., Carlos T. & Greenberger J.S. (2006). "Bone marrow from CD18-/- (MAC-1-/-) homozygous deletion recombinant negative mice demonstrates increased longevity in long-term bone marrow culture and decreased contribution to irradiation pulmonary damage." *In vivo* **20**(4): 431-438.

Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M. & Nussenzweig A. (2004). "H2A.X: the histone guardian of the genome." *DNA Repair* **3**: 959-967.

Fernandez-Capetillo O., Chen H.T., Celeste A., Ward I., Romanienko P.J., Morales J.C., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R.D., Motoyama N., Carpenter P.B., Bonner W.M., Chen J. & Nussenzweig A. (2002). "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1." *Nat. Cell Biol.* **4**(12): 993-997.

Floryk D. & Houstek J. (1999). "Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin." *Bioscience Reports* **19**(1): 27-34.

Folkard M., Prise K.M., Vojnovic B., Davies S., Roper M.J. & Michael B.D. (1989). "The irradiation of V79 mammalian cells by protons with energies below 2 MeV. Part I : Experimental arrangement and measurements of cell survival." *International Journal of Radiation Biology* **56**(3): 221-237.

Folkard M., Prise K.M., Vojnovic B., Gilchrist S., Scettino G., Belyakov O.V., Ozols A. & Michael B.D. (2001). "The impact of microbeams in radiation biology." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **181**: 426-430.

Folkard M., Vojnovic B., Gilchrist S., Prise K.M. & Michael B.D. (2003). "The design and application of ion microbeams for irradiating living cells and tissues." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **210**: 302-307.

Folkard M., Vojnovic B., Prise K.M., Bowey A.G., Locke R.J., Schettino G. & Michael B.D. (1997 a). "A charged-particle microbeam : I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles." *International Journal of Radiation Biology* **72**(4): 375-385.

Folkard M., Vojnovic B., Prise K.M. & Michael B.D. (2002). "The application of charged particle microbeam in radiobiology." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **188**: 49-54.

Folkard M., Vojnovic B., Hollis K.J., Bowey A.G., Watts S.J., Schettino G., Prise K.M. & Michael B.D. (1997 b). "A charged-particle microbeam : II. A single-particle micro-collimation and detection system." *International Journal of Radiation Biology* **72**(4): 387-395.

Foster E.R. & Downs J.A. (2005) "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." *F.E.B.S. J.* **272**(13): 3231-3240.

Frankenberg-Schwager M. (1999) "Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells." *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 273-292.

Freshney R.I. (2000). *Culture of animal cells – a manual of basic technique, Fourth edition*. NY, USA, Wiley-Liss.

Fukuda H., Sano N., Muto S. & Horikoshi M. (2006). "Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression." *Brief. Funct. Genomic Proteomic* **5**(3):190-208

Fusenig N.E. & Boukamp P. (1998). "Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes." Molecular Carcinogenesis **23**: 144-158.

Galle P. & Paulin R. (1992). Biophysique. 1, Radiobiologie, radiopathologie. Paris, France, Masson.

Giussani A., Cantone M.C., de Bartolo D., Roth P. & Werner E. (2000). "Internal dose for ingestion of molybdenum radionuclides based on a revised biokinetic model." Health Phys. **78**(1): 46-52.

Gonzalez A.J. (1999). "Regulation of low level radiation." C.R. Acad. Sci. **322**: 241-243.

Goodhead D.T. (1999). "Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations." J. Radiat. Res. **40**: 1-13.

Hall E.J. & Hei T.K. (2003). "Genomic instability and Bystander effects induced by high-LET radiation." Oncogene **22**: 7034-7042.

Hall E.J. (2000a). "Radiation, the two-edged sword : Cancer risks at high and low doses." The Cancer Journal **6**(6): 343-349.

Hall E.J. (2000b). Radiobiology for the radiobiologist, Fifth Edition. NY, USA, Lippincott Williams & Wilkins.

Härle-Bachor C. & Boukamp P. (1996). "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(13): 6476-6481.

Haut Comité de la Santé Publique - Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. (2000). Politiques publiques, pollution atmosphérique et santé Poursuivre la réduction des risques, Rennes, France, Editions ENSP.

Hauptner A., Dietzel S., Drexler G.A., Reichart P., Krücken R., Cremer T., Friedl A.A. & Dollinger G. (2004). "Microirradiation of cells with energetic heavy ions." Strahlenther. Radiat. Environ. Biophys. **42**: 237-245.

Health Physics Society (1995). "Risk assessment – Position of the Health Physics Society." Health Physics Society Report : 1-3.

Hefferin M.L. & Tomkinson A.E. (2005). "Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining." DNA Repair **4**(6): 639-648.

Hei T.K., Wu L.J., Liu S.X., Vannais D., Waldren C.A. et Randers-Pehrson G. (1997). "Mutagenic effects of a single and an exact number of α particles in mammalian cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 65-3770.

Heidenreich W.F., Tomasek L., Rogel A., Laurier D. & Timarche M. (2004). "Studies of radon-exposed miner cohorts using a biologically based model : comparison of current Czech and French data with historic data from China and Colorado." Radiation and Environmental Biophysics **43**: 247-256.

Heilmann J., Taucher-Scholz G., Haberer T., Scholz M. & Kraft G. (1996). "Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water." Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **34**(3): 599-608.

Heiß M., Fischer B.E., Jakob B., Fournier C., Becker G. & Taucher-Scholz G. (2006). "Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe." Radiat. Res. **165**(2): 231-239.

Hu B., Han W., Wu L., Feng H., Liu X., Zhang L., Xu A., Hei T.K. & Yu Z. (2005). "In situ visualization of DSBs to assess the extranuclear/extracellular effects induced by low-dose alpha-particle irradiation." Radiat. Res. **164**(3): 286-291.

Huang X., Kurose A., Tanaka T., Traganos F., Dai W. & Darzynkiewicz Z. (2006). "Sequential phosphorylation of Ser-10 on histone H3 and ser-139 on histone H2A.X and ATM activation during premature chromosome condensation: relationship to cell-cycle phase and apoptosis." Cytometry A. **69**(4): 222-229.

ICRP (1991). Recommandation Report 60, Pergamon Press.

Incerti S., Allison J., Amako K., Apostolakis J., Araujo H., Arce Dubois P., Asai M., Barrand G., Capra R. *et al.* (2006). "Geant4 Developments and Applications." IEEE Trans.Nucl.Sci. **53**: 270-283.

Incerti S., Barberet Ph., Courtois B., Michelet-Habchi C., Moretto Ph. (2003). "Simulation of ion propagation in the microbeam line of CENBG using GEANT4." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **210**: 92-97.

Incerti S., Barberet Ph., Villeneuve R., Aguer P., Gontier E., Michelet-Habchi C., Moretto Ph., Nguyen D.T., Pouthier T. & Smith R.W. (2004). "Simulation of cellular irradiation with the CENBG microbeam line using Geant4." IEEE transaction on nuclear science **51**(4): 1395-1401.

Incerti S., Gault N., Habchi C., Lefaix J.L., Moretto Ph., Poncy J.L., Pouthier T. & Seznec H. (2006). "A comparison of cellular irradiation techniques with alpha particles using the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit." Radiat. Prot. Dosimetry. accepté.

Institut de veille sanitaire. (2003). "Propositions pour la mise en place et le renforcement d'activités de surveillance des expositions et des risques associés à l'inhalation du radon." Département santé environnement : 1-108.

IRSN (2005). "RAPPORT FINAL - IRSN/DSDRE/GT n°3 - Réflexions sur les études menées à l'IRSN pour l'estimation des conséquences de l'accident de Tchernobyl en France." Groupe de travail : études de l'IRSN sur les conséquences de l'accident de Tchernobyl en France.

IRSN (2006). "La radioprotection des travailleurs – Activités de l'IRSN en 2005 dans le domaine de la radioprotection." Direction de la radioprotection de l'homme.

Janin N. (1995). "Genetic predisposition to cancer." Rev. Med. Interne **16**(7): 500-517.

Jeggo P.A. (1998) "Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells." Radiat. Res. **150**(5): S80-91.

Jensen U.B., Petersen M.S., Lund T.B., Jensen T.G. & Bolund L. (2000). "Transgene expression in human epidermal keratinocytes: cell cycle arrest of productively transfected cells." Exp. Dermatol. **9**(4): 298-310.

Johansson S.A.E. & Campbell J.L. (1988). PIXE a novel technique for elemental analysis. New York, John Wiley & Sons.

Kabir J., Lobo M. & Zachary I. (2002). "Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis." Biochem. J. **367**: 145-155.

Kadhim M.A., Macdonald D.A., Goodhead D.T., Lorimore S.A., Marsden S.J. & Wright E.G. (1992). "Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation." Nature **355**(6362): 738-740.

Kaminsky J.M., Shinohara E., Summers J.B., Niermann K.J., Morimoto A. & Brousal J. (2005). "The controversial abscopal effect." Cancer Treat. Rev. **31**(3): 159-172.

Kamiya T., Hirao T. & Kobayashi Y. (2004). "Development of single-ion hit techniques and their applications at TIARA of JAERI Takasaki." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B **219-220**: 1010-1014.

Kamiya T., Sakai T., Naitoh Y., Hamano T. & Hirao T. (1999). "An automated single ion hit at JAERI heavy ion microbeam to observe individual radiation damage." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B **158**(1-4): 255-259.

Kamiya T., Yokota W., Kobayashi Y., Cholewa M., Krochmal M.S., Laken G., Larsen I.D., Fiddes L., Parkhill G. & Dowsey K. (2001). "Development of an automated single cell irradiation system combined with a high-energy heavy ion microbeam system." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B **158**(1-4): 27-31.

Kanda T., Sullivan K.S., Wahl G.M. (1998). "Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells." Current Biology **8**(7): 377-385.

Kellerer A.M. (2001). "Invisible Threat - The Risk of Ionizing Radiation -". NUPECC Workshop, Dourdan, France.

Kendall G.M. & Smith T.J. (2002). "Doses to organs and tissues from radon and its decay products." J. Radiol. Prot. **22**(4): 389-406.

Kobayashi J. (2004). "Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks : NBS1 binds to gamma-H2A.X through FHA/BRCT domain." Radiat. Res. **45**(4): 473-478.

Kobayashi J., Antoccia A., Tauchi H., Matsuura S. & Komatsu K. (2004). "NBS1 and its functional role in the DNA damage response." DNA Repair **3**(8-9): 855-861.

Kobayashi J., Tauchi H., Sakamoto S., Nakamura A., Morishima K., Matsuura S., Kobayashi T., Tamai K., Tanimoto K. & Komatsu K. (2002). "NBS1 localizes to gamma-H2A.X foci through interaction with the FHA/BRCT domain." Curr. Biol. **12**(21): 1846-1851.

Krogan N.J., Lam M.H., Fillingham J., Keogh M.C., Gebbia M., Li J., Datta N., Cagney G., Buratowski S., Emili A. & Greenblatt J.F. (2004) "Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks." Mol Cell. **16**(6):1027-1034.

Kühne M., Riballo E., Rief N., Rothkamm K., Jeggo P.A. & Löbrich M. (2004) "A double strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity." Cancer Research **64**: 500-508.

Kurz E.U. & Lees-Miller S.P. (2004). "DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways." DNA Repair **3**(8-9): 889-900.

Laurier D., R. A., Tomasek L. & Tirmarche M. (2005). "Comment on "Studies of radon-exposed miner cohorts using a biologically based model: comparison of current Czech and French data with historic data from China and Colorado" by W.F. Heidenreich, L. Tomasek, A. Rogel,

- Laurier D., Tirmarche M. (2004) *Radiat Environ Biophys* 43:247-256, and "Radon-induced lung cancer in French and Czech miner cohorts described with a two-mutation cancer model" by Brugmans M.J.P., Rispens S.M., Bijwaard H., Laurier D., Rogel A., Tomasek L. & Tirmarche M. (2004). *Radiat Environ Biophys* 43:153-163." *Radiat. Environ. Biophys.* **44**(2): 155-156.
- Leatherbarrow E.L., Harper J.V., Cucinotta F.A. & O'Neill P. (2006) "Induction and quantification of gamma-H2A.X foci following low and high LET-irradiation." *Int. J. Radiat. Biol.* **82**(2): 111-118.
- Lehman T.A., Rama M., Boukamp P., Stanek J., Bennett W.P., Welsh J.A., Metcalf R.A. *et al.* (1993) "p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines." *Carcinogenesis* **14**: 833-839.
- Little J.B. (2000) "Radiation carcinogenesis." *Carcinogenesis* **21**(3): 397-404.
- Llabador Y., Bertault D., Gouillaud J.C., Moretto Ph. (1990). "Advances of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **49**(435-440).
- Llabador Y. & Moretto Ph. (1998). "Application of nuclear microprobe in the life science: an efficient analytical technique for research in biology and medicine." *World Scientific Publishing Company*, Singapour 1-274.
- Löbrich M., Cooper P.K., Rydberg B. (1998). "Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts." *Radiat. Res.* **150**(6): 619-626.
- Löbrich M., Rief N., Kühne M., Heckmann M., Fleckenstein J., Rube C. & Uder M. (2005). "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(25): 8984-8989.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F. & Richmond T.J. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution." *Nature* 389: 251-260.
- Masse R. & Pasquier J.L. (1997). "De la connaissance des risques à la réglementation des expositions aux rayonnements ionisants." *C.R. Soc. Biol.* **191**: 797-806.
- Masse R. (2001). "Effets des faibles doses de rayonnements ionisants." *Rapport OPRI*.
- Miller R.C., Marino S.A., Brenner D.J., Martin S.G., Richards M., Randers-Pehrson G. & Hall E.J. (1995). "The biological effectiveness of radon-progeny alpha-particles. II. Oncogenic transformation as a function of linear energy transfer." *Radiat. Res.* **142**:54-60.
- Miller R.C., Randers-Pehrson G., Geard C.R., Hall E.J. & Brenner D.J. (1999). "The oncogenic transforming potential of the passage of single α particles through mammalian cell nuclei." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 19-22.
- Mitchell S.A., Randers-Pehrson G., Brenner D.J. & Hall E.J. (2004). "The Bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact." *Radiat. Res.* **161**: 397-401.
- Mitchel R.E., Gragtmans N.J. & Morrison D.P. (1990). "Beta-radiation-induced resistance to MNNG initiation of papilloma but not carcinoma formation in mouse skin." *Radiat. Res.* **121**(2):180-6.
- Mitchel R.E., Jackson J.S. & Heinmiller B. (1999) "Inhaled uranium ore dust and lung cancer risk in rats." *Health Phys.* **76**(2): 145-55.

Moné M.J., Volker M., Nikaido O., Mullenders L.H.F., van Zeeland A.A., Vershure P.J., Manders E.M.M. & van Driel R. (2001). "Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition." EMBO reports **2**(1): 1013-1017.

Monteiro A.N.A., Zhang S., Phelan C.M. & Narod S.A. (2003). "Absence of constitutional H2A.X gene mutations in 101 hereditary breast cancer families." J. Med. Genet. **40**:51-52.

Moretto Ph. (1996). "The Nuclear Microprobe: an analytical technique for biomedical studies." Cell Mol. Biol. **42**(1): 1-16.

Moretto Ph., Michelet C., Balana A., Barberet Ph., Przybylowicz W.J., Slabbert J.P., Prozesky V.M., Pineda C.A., Brut G., Laurent G., Lhoste F. (2001). "Development of a single ion irradiation system at CENBG for applications in radiation biology." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **181**: 104-109.

Moretto Ph. & Razafindrabe L. (1995). "Simulation of RBS spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **104**: 171-175.

Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I., McGhee E.M. & Limoli C.L. (1996). "Genomic instability induced by ionizing radiation." Radiat. Res. **146**(3): 247-258.

Morgan W.F. (2002). "Genomic instability and bystander effects: a paradigm shift in radiation biology?" Mil. Med. **167**(2): 44-45.

Mothersill C. & Seymour C. (1998). "Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure." Mutagenesis **13**(5): 421-426.

Mothersill C. & Seymour C. (2001). "Radiation-induced Bystander effect : past history and future direction." Radiat. Res. **155**: 759-767.

Mothersill C. & Seymour C. (2004). "Radiation-induced Bystander effect – implications for cancer." Nat. Rev. Cancer **4**: 158-164.

Mukherjee B., Kessinger C., Kobayashi J., Chen B.P., Chen D.J., Chatterjee A. & Burma S. (2006). "DNA-PK phosphorylates histone H2A.X during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells." DNA Repair **10**(5): 575-590.

Munshi A., Tanaka T., Hobbs M.L., Tucker S.L., Richon V.M. & Meyn R.E. (2006). "Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2A.X foci." Mol. Cancer Ther. **5**(8): 1967-1974.

Mustonen R., Bouvier G., Wolber G., Stohr M., Peschke P. & Bartsch H. (1999). "A comparison of gamma and neutron irradiation on Raji cells : effects on DNA damage, repair, cell cycle distribution and lethality." Mutat. Res. **429**(2): 169-179.

Nagasawa H. & Little J.B. (1992). "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles." Cancer Res. **52**: 6394-6396.

Narayanan P.K., LaRue K.E., Goodwin E.H. & Lehnert B.E. (1999). "Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells." Radiat Res. **152**(1): 57-63.

National Council on Radiation Protection (1993). "Limitation of Exposure to Ionizing Radiation : report 116.", Washington.

National Research Council (1998). "Health effects of exposure to radon.", Beir VI, Natl. Acad. Press, Washington.

- Nelson J.M., Brooks A.L., Metting N.F., Khan M.A., Buschbom R.L., Duncan A., Miick R. & Braby L.A. (1996). "Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells." Radiat. Res. **145**: 568-574.
- Olive P.L. & Banath J.P. (2004) "Phosphorylation of histone H2A.X as a measure of radiosensitivity." Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **58**(2): 331-335.
- Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. (1984). "Adaptative response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine." Science **223**: 594-597.
- Österreicher J., Prise K.M., Michael B.D., Vogt J., Butz T. & Tanner J.M. (2003a). "Radiation-induced Bystander effects." Strahlenther und Onkologie **179**: 69-77.
- Österreicher J., Vogt J., Tanner J.M., Lehmann D., Spemann D., Reinert T., Butz T., Navratil L. & Kuna P. (2003b). "Cell analysis with the new Leipzig high-energy ion nanoprobe." Radiat. Biol. Radioecol. **43**(2): 223-226.
- Paques F. & Haber J.E. (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 349-404.
- Paramio J.M., Segrelles C., Lain S., Gomez-Casero E., Lane D.P., Lane E.B. & Jorcano J.L. (2000). "p53 is phosphorylated at the carboxyl terminus and promotes the differentiation of human HaCaT keratinocytes." Mol. Carcinog. **29**(4):251-262.
- Paull T.T., Rogakou E. P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M. & Bonner W.M. (2000). "A critical role for histone H2A.X in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Current Biology **10**(15): 886-895.
- Peshkin B.N. & Isaacs C. (2005). "Evaluation and management of women with BRCA1/2 mutations." Oncology **19**(11): 1451-1474.
- Peterson C.L. & Cote J. (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." Genes Dev **18**: 602-616.
- Petrini J.H. & Stracker T.H. (2003). "The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators." Trends Cell Biol. **13**(9): 458-462.
- Pierce A.J., Stark J.M., Araujo F.D., Moynahan M.E., Berwick M. & Jasin M. (2001). "Double-strand breaks and tumorigenesis." Trends Cell Biol. **11**(11): S52-59.
- Pierce D.A., Shimizu Y., Preston D.L., Vaeth M., Mabuchi K. (1996). "Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 12, Part I." Cancer. Radiat. Res. **146**: 1-27.
- Pierce D.A. & Preston D.L. (2000). "Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors." Radiat. Res. **154**(2): 178-186.
- Ponnaiya B., Cornforth M.N. & Ullrich R.L. (1997). "Radiation-induced chromosomal instability in BALB/c and C57BL/6 mice: the difference is as clear as black and white." Radiat. Res. **147**(2): 121-125.
- Poujol C. (2006). "Metamorph : développement interne." Plateforme d'Imagerie Cellulaire de l'Institut des Neurosciences, Université de Bordeaux II.
- Preston D.L., Pierce D.A., Shimizu Y., Ron E. & Mabuchi K. (2003). "Dose response and temporal patterns of radiation-associated solid cancer risks." Health Phys. **85**(1): 43-46.
- Prise K.M., Folkard M., Kuosaitė V., Tartier L., Zyuzikov N. & Shao C. (2006). "What role for DNA damage and repair in the Bystander response ?" Mutat. Res. **597**(1-2): 1-4.

- Prise K.M., Folkard M. & Michael B.D. (2003) "Bystander responses induced by low LET radiation." Oncogene **22**: 7043-7049.
- Prise K.M., Schettino G., Folkard M. & Held K.D. (2005) "New insights on cell death from radiation exposure." Lancet Oncol. **6**: 520-528.
Proceedings of the 6th International Workshop/12th L. H. Gray Workshop : Microbeam Probes of Cellular Radiation Response St. Catherine's College (2004), Oxford, United Kingdom, March 29-31, Radiat. Res. **161**(1): 87-119.
- Randers-Pehrson G., Geard C.R., Johnson G., Elliston C.D. & Brenner D.J. (2001). "The Columbia University Single-Ion Microbeam." Radiat. Res. **156**: 210-214.
- Rannou A. & Tymen G. (1989). "Les résultats des campagnes de mesures de radon et facteurs explicatifs, Exposition au radon dans les habitations: aspects techniques et sanitaires." Société Française de Radioprotection, Paris: 41-63.
- Rapp A. & Greulich K.O. (2004). "After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available." Journal of Cell Science **117**(21): 4935-4945.
- Rapport de la commission VROUSOS (2004). "Priorités en radioprotection : Propositions pour une meilleure protection des personnes contre les dangers des rayonnements ionisants." Rayonnements ionisants : 1-85.
- Reichrath J. (2006). "The challenge resulting from positive and negative effects of sunlight: how much solar UV exposure is appropriate to balance between risks of vitamin D deficiency and skin cancer?" Prog. Biophys. Mol. Biol. **92**(1): 9-16.
- Risch N. (2001). "The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **10**(7): 733-41.
- Riballo E., Kuhne M., Rief N., Doherty A., Smith G.C., Recio M.J., Reis C., Dahm K., Fricke A., Krempler A., Parker A.R., Jackson S.P., Gennery A., Jeggo P.A. & Lobrich M. (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2A.X foci." Mol. Cell **16**(5): 715-724.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C. & Bonner W.M. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J. Cell Biol. **146**(5): 905-916.
- Rogakou E.P., Nievas-Neira W., Boon C., Pommier Y. & Bonner W.M. (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2A.X histone at serine 139." The journal of biological chemistry **275**(13): 9390-9395.
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S. & Bonner W.M. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2A.X phosphorylation on serine 139." The journal of biological chemistry **273**(10): 5858-5868.
- Ross G.J., Bigelow A.W., Randers-Pehrson G., Peng C.C. & Brenner D.J. (2005). "Phase-based cell imaging techniques for microbeam irradiations." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **241**: 387-391.
- Rothkamm K. & Lobrich M. (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 5057-5062.

Rothkamm K., Balroop S., Shekhdar J., Fernie P. & Goh V. (2007). "Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT : a quantitative biomarker of low-level radiation exposure." Radiology **242**(1): 244-251.

Sanakkayala N, Sokolovska A, Gulani J, Hogenesch H, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG & Vemulapalli R. (2005). "Induction of antigen-specific Th1-type immune responses by gamma-irradiated recombinant *Brucella abortus* RB51." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **12**(12): 1429-1436.

Sawant S.G., Randers-Pehrson G., Metting N.F. & Hall E.J. (2001). "Adaptative response and the Bystander effect induced by radiation in C3H 10T1/2 cells in culture." Radiat. Res. **156**: 177-180.

Scholz M. & Kraft G. (1994). "Calculation of heavy ion inactivation probabilities based on track structure, X ray sensitivity and target size." Rad. Prot. Dos. **52**: 29-33.

Scholz M. (2003). "Effects of ion radiation on cells and tissues." Adv. Polym. Sci. **162**: 95-155.

Scholz M. & Kraft G. (2004). "The physical and radiobiological basis of the local effect model: a response to the commentary by R. Katz." Radiat. Res. **161**(5): 612-620.

Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Redon C. & Bonner W.M. (2003) "Histone H2A.X in DNA damage and repair." Cancer Biol. Ther. **2**(3): 233-235.

Shao C., Folkard M., Michael B.D. & Prise K.M. (2004). "Targeted cytoplasmic irradiation induces Bystander responses." Proc. Nat. Acad. Sci. USA **101**(37): 13495-13500.

Siddiqi M. A. & Bothe E. (1987). "Single and double strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and °OH radical scavenger concentration." Radiat. Res. **112**: 449-463.

Singh S., Dwarakanath B.S. & Mathew T.L. (2004). "DNA ligand Hoechst-33342 enhances UV induced cytotoxicity in human glioma cell lines." J. Photochem. Photobiol. B. **77**(1-3): 45-54.

Skolnick M.H., Frank T., Shattuck-Eidens D. & Tavtigian S. (1997). "Genetic susceptibility to breast and ovarian cancer." Pathol. Biol. **45**(3): 245-249.

Smith P.J., Bell S.M., Dee a. & Sykes H. (1990). "Involvement of mutant to DNA topoiomérase II in the selective resistance of a mammalian cell mutant to DNA minor groove ligands: ligands-induced DNA-protein crosslinking and responses to topoisomerase poisons." Carcinogenesis **11**: 659-665.

Spencer V.A. & Davie J.R. (1999). "Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression." Gene **240**(1): 1-12.

Soussi T. (2000). "Cycle cellulaire et apoptose : Le gène suppresseur de tumeur p53." Médecine/Sciences **16**: 469-472.

Stojic L., Brun R. & Jiricny J. (2004). "Mismatch repair and DNA damage signalling." DNA Repair **3**(8-9): 1091-1101.

Stucki M. & Jackson S.P. (2006). "γ-H2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes." DNA repair **5**(5): 534-543.

Symons M.C.R. (2004). "Direct and indirect damage to DNA by ionizing radiation." Radiat. Phys. Chem. **43**: 403-405.

- Tartier L., Spenlehauer C., Newman H.C., Folkard M., Prise K.M., Michael B.D., Ménissier-de Murcia J. & de Murcia G. (2003). "Local DNA damage by proton microbeam irradiation induces poly(ADP-ribose) synthesis in mammalian cells." Mutagenesis **18**(5): 411-416.
- Taucher-Scholz G., Heilmann J. & Krafft G. (1996). "Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation." Adv. Space Res. **18**(1-2):83-92.
- Tauchi H., Matsuura S., Kobayashi J., Sakamoto S. & Komatsu K. (2002). "Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability." Oncogene **21**(58): 8967-8980.
- Teysier F., Bay J.O., Dionet C. & Verrelle P. (1999). "Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation." Bull. Cancer **86**(4): 345-357.
- Thompson L.H. & Limoli C.L. (2003). "Eukaryotic DNA damage surveillance and repair - Chapter 6 - Origin, recognition, signalling and repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells." Eds. Caldecott, Plenum Publishers, New York: 107-145.
- Tirmarche M., Baysson H. & Telle-Lamberton M. (2004). "Uranium exposure and cancer risk: a review of epidemiological studies." Rev. Epidemiol. Sante Publique. **52**(1): 81-90.
- Tubiana M. & Aurengo A. (2005). "La relation dose-effet et l'estimation des effets cancérigènes des faibles doses de rayonnements ionisants." Rapport de l'Académie Nationale de Médecine et de l'Académie des Sciences 1-59.
- Tubiana M., Aurengo A., Averbek D. & Masse R. (2006). "The debate on the use of linear threshold for assessing the effects of low doses." J. Radiol. Prot. **26**(3):317-324.
- Uhrhammer N., Bornes S. & Bignon Y.J. (2005). "Quelle place tiennent les genes BRCA1 et BRCA2 dans les risques héréditaires du cancer de l'ovaire ?" Oncologie **7**: 526-530
- Ullrich R.L., Bowles N. D., Satterfield L.C. & Davis C.M. (1996). "Strain-dependent susceptibility to radiation-induced mammary cancer is a result of differences in epithelial cell sensitivity to transformation." Radiat. Res. **146**(3): 353-355.
- UNSCEAR (2000a) "Volume I. Sources of ionizing radiation." Report to the General Assembly of the United Nations with Scientific Annexes, United Nations sales publication, New York.
- UNSCEAR (2000b) "Volume II. Effects of ionizing radiation." Report to the General Assembly of the United Nations with Scientific Annexes, United Nations sales publication, New York.
- United States Nuclear Regulatory Commission (2006). "Fact Sheet : The accident at Three Mile Island." Office of Public Affairs, Washington.
- Violot D., M'kacher R., Adjadj E., Dossou J., de Vathaire F. & Parmentier C. (2004). "Evidence of increased chromosomal abnormalities in French Polynesian thyroid cancer patients." Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging **32**:174-179.
- Vogelstein B. & Kinzler K.W. (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nature Medicine **10**: 789-799.
- Vorobiova M.I., Degteva M.O., Burmistrov D.S., Safronova N.G., Kozheurov V.P. & Anspaugh L.R. (1999). "Review of historical monitoring data on techa river contamination." Health Physics **76**: 605-618.
- Wallace S.S. (1994). "DNA damages processed by base excision repair : biological consequences." Int. J. Radiat. Biol. **66**: 579-589.

Wallace S.S. (1998). "Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA." Radiat. Res. **150**(5): S60-79.

Ward I.M., Minn K., van Deursen J., Chen J. (2003). "p53 Binding Protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice." Molecular and Cellular Biology **23**(7): 2556-2563.

Ward J.F. (1994). "The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences." Int. J. Radiat. Biol. **66**(5): 427-432.

Wu L.J., Randers-Pehrson G., Xu A., Waldren C.A., Geard C.R., Yu Z.L. et Hei T.K. (1999) "Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutation in mammalian cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**: 4959-4964.

Zhang Y, Adachi M, Zou H, Hareyama M, Imai K & Shinomura Y. (2006) "Histone deacetylase inhibitors enhance phosphorylation of histone H2A.X after ionizing radiation." Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **65**(3): 859-866.

Zhong R., Roeder R.G. & Heintz N. (1983) "The primary structure and expression of four cloned human histone genes." Nucleic Acids Res. **11**(21): 7409-7425.

Zhou H., Suzuki M., Geard CR., Hei TK. (2002). "Effects of irradiated medium with or without cells on Bystander cell responses." Mut. Res. **499**: 135-141.