

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG  
ECOLE DOCTORALE VIE ET SANTE**

**THESE**

*pour obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR  
DE STRASBOURG**

**Discipline : Sciences du vivant  
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Barbara FISCHER**

*Le 26 Novembre 2004*

*Titre :*

**ETUDE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE DE L' APOPTOSE  
INDUITE PAR DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS  
IONISANTS DANS DES CELLULES LYMPHOBLASTOÏDES  
HUMAINES DIFFERANT PAR LEUR STATUT P53**

**Directeur de Thèse : Dr. P. BISCHOFF**

**JURY**

<b>Pr. R. HERBRECHT</b>	Président du Jury
<b>Dr. P. BISCHOFF</b>	Directeur de Thèse
<b>Pr. W. SAUERWEIN</b>	Rapporteur Externe
<b>Dr. G. LIZARD</b>	Rapporteur Externe
<b>Dr. J.P. LOEFFLER</b>	Rapporteur Interne
<b>Dr. I. FLORENTIN</b>	Examineur

## LISTE DES ABREVIATIONS

AIF : Apoptosis Inducing Factor  
amc : amino-méthyl-coumarine  
ANT : Adenine Nucleotide Translocastor  
Apaf-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1  
ASPP : Apoptotic Stimulating Proteins of p53  
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated  
BER : Base Excision Repair  
CAD/ICAD : Caspase Activated DNase / Inhibitor of Caspase Activated DNase  
CAPK : Ceramide Activated Protéine Kinase  
CARD : Caspase Activation Recruitment Domain  
Caspase : Cystéinyl Aspartic Acid-Protease  
CDB : Cassures Double-Brin de l'ADN  
CFSE : 5(et 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester  
CMX-Ros : ChloroMéthyl-X-Rosamine  
CSB : Cassures Simple-Brin de l'ADN  
DD : Death Domain  
DED : Death Effector Domain  
DEVD : aspartate-glutamate- valine- aspartate  
DFF : DNA Fragmentation factor  
DISC : Death Inducing Signaling Complex  
DNA-PK : Protéine Kinase Dépendante de l'ADN  
DR4, DR5 : Death Receptor 4, Death Receptor 5 : (DR4=TRAILR1, DR5=TRAILR2)  
 $\Delta\psi_m$  : Potentiel transmembranaire mitochondrial  
EBR : Efficacité Biologique Relative  
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase  
eV : électron Volt  
FADD : Fas Associated Death Domain

---

FasL : Fas Ligand

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

fmk : fluoromethylketone

GANIL : Grand Accélérateur National d'Ions Lourds de Caen

Gy : Gray

HRR : Homologous Recombination Repair

IAP : Inhibitor of Apoptosis

iASPP : inhibitor of Apoptotic Stimulating Proteins of p53

IETD : isoleucine-glutamate-thréonine-aspartate

IP : Iodure de Propidium

IR : Ionizing Radiation

JC-1 : 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

LEHD : leucine-glutamate-histidine-aspartate

LMDS : Locally Multiply Damage Sites

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilization

MMR : MisMatch Repair

MNNG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

NER : Nucleotide Excision Repair

NHEJ : Non Homologous End-Joining

NIRS : National Institute of Radiological Sciences

OER : Oxygen Enhancement Ratio

p300/CBP : p300/Creb Binding Protein

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PE : Phycoerythrin

PERP : p53 apoptosis Effector Related to PMP-22

PIG : p53-Inducing-Genes

PTPC : Permeability Transition Pore Complex

Rb : protéine du rétinoblastome

ROS : Reactive Oxygen Species

RPA : Replication Protein A

---

RTPCR : Reverse Transcription Polychain Reaction

SAPK/JNK : Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase

SMase : SphingoMyélinase

TNF : Tumor Necrosis Factor

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

TRAIL : Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand (=Apo-2L)

TRAILR : Récepteur de TRAIL

VDAC : Voltage Dependent Anion Channel

z-VAD-fmk : Benzoloxo-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

---

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Les radiations ionisantes et leurs effets biologiques</b>	<b>6</b>
1. Définitions	9
1.1. Les radiations ionisantes	9
1.2. Origine des radiations ionisantes	9
1.3. Les différents types de radiations ionisantes	10
1.3.1. Les radiations directement ionisantes	11
1.3.2. Les radiations indirectement ionisantes	13
2. Effets physiques des radiations ionisantes	15
2.1. Notion de dose absorbée	15
2.2. Absorption des photons (rayons X ou $\gamma$ ) par la matière vivante	15
2.3. Absorption des neutrons par la matière vivante	17
2.4. Absorption des ions lourds par la matière vivante	19
2.5. Notion de transfert d'énergie linéique	20
3. Effets physico-chimiques des radiations ionisantes	23
3.1. Action directe et indirecte des radiations	23
3.2. Influence du TEL sur les effets physico-chimiques des radiations	25
3.3. Effet oxygène	26
4. Effets biologiques des radiations ionisantes	29
4.1. Effets induits au niveau des constituants cellulaires par les radiations ionisantes	29
4.1.1. Cibles cellulaires des radiations ionisantes	29
4.1.2. Importance du TEL dans les dommages induits par les radiations	34
4.2. Effets cellulaires des radiations ionisantes	36

---

4.2.1. Conséquences des lésions dues à l'irradiation	36
4.2.2. Effets cytotoxiques des radiations ionisantes	38
4.3. Effets tissulaires des radiations ionisantes	43
4.3.1. Effets déterministes et probabilistes	43
4.3.2. Facteurs influençant les effets tissulaires	45
5. Hadronthérapie : avantages et clinique	47
<b>Chapitre 2 : L'apoptose radio-induite</b>	<b>51</b>
1. Généralités sur l'apoptose	51
1.1. Définition	51
1.2. Rôles de l'apoptose	53
1.3. Description de l'apoptose	55
1.3.1. Caractéristiques morphologiques	55
1.3.2. Caractéristiques biochimiques	58
1.4. Les principaux effecteurs de l'apoptose	59
1.4.1. Les caspases	61
1.4.2. La famille BCL-2	68
2. Voies de signalisation induites par les radiations ionisantes	73
2.1. Mécanismes cellulaires activés par les dommages de l'ADN	73
2.1.1. Détection des dommages	73
2.1.2. Rôle de p53 dans la réponse aux radiations ionisantes	74
2.1.3. Réponses cellulaires indépendantes de p53	87
2.1.4. Les systèmes de réparation de l'ADN	88
2.2. Voies de signalisation de l'apoptose radio-induite	92
2.2.1. Voie mitochondriale	92
2.2.2. Voie des céramides	96
2.2.3. Voie des récepteurs de mort	98

---

---

<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>104</b>
1. Lignées cellulaires	104
2. Irradiations	104
2.1. Irradiation par les rayons X	105
2.2. Irradiation par les neutrons rapides	105
2.3. Irradiation par les ions carbone	106
3. Traitement des cellules	108
3.1. Traitement par l'anticorps anti-Fas CH11 ou par FasL	108
3.2. Traitement des cellules à la méthyl $\beta$ cyclodextrine	108
4. Cytométrie en flux	108
5. Analyse de l'apoptose	109
5.1. Mesure des particules hypodiploïdes	109
5.2. Externalisation des phosphatidylsérines	110
6. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$	111
6.1. Utilisation du JC-1	111
6.2. Utilisation de la chlorométhyl-X-rosamine	112
7. Mesure de l'activation des caspases	112
7.1. Mesure de l'activité enzymatique des caspases	112
7.2. Mesure de l'activation de la caspase-3 par cytométrie en flux	113
7.3. Inhibition des caspases	114
8. Quantification de la nécrose par mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)	114
9. Extraction protéique et Western Blot	114
10. Tests de prolifération et de survie clonogénique	116
10.1. Test de prolifération UptiBlue	116
10.2. Survie clonogénique	116
10.3. Test CFSE	117
11. Etude de l'expression de Fas/FasL et de l'agrégation des récepteurs Fas	117
11.1. Analyse de l'expression de Fas et FasL par cytométrie en flux	117

---

11.2. Détection des agrégats de Fas et immunofluorescence	118
12. Mesure de l'activation de p53 par cytométrie en flux	118
13. Analyse de l'expression différentielle des gènes par tests d'hybridation d'ADNc : technique de « cDNA expression arrays »	119
13.1. Extraction des ARN	119
13.2. Analyse de la qualité des ARN	121
13.3. « cDNA expression arrays »	121
13.3.1. Synthèse des sondes radioactives à partir de l'ARN total	121
13.3.2. Purification des sondes radioactives par chromatographie sur colonne	122
13.3.3 Hybridation des sondes radioactives sur les membranes Atlas Arrays	122
13.3.4 Révélation des membranes	123
13.3.5 Analyse des résultats avec le logiciel AtlasImage 1.01	123
14. Analyse statistique	124

## **PRESENTATION DES RESULTATS** **125**

*1<sup>ère</sup> partie : Etude de la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par les neutrons rapides dans des cellules lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53* 127

### **Chapitre 1 : Rôle de p53 dans l'apoptose induite dans des lignées lymphoblastoïdes humaines par des neutrons rapides** **128**

1. Introduction 129

---



2. Résultats	130
2.1. Expression de p53 après irradiation	130
2.2. Induction de l'apoptose par les neutrons rapides	130
2.3. Activation des caspases	132
2.4. Radiosensibilité vis-à-vis des neutrons rapides	135
3. Discussion	138

**Chapitre 2 : Signalisation de l'apoptose induite dans des lignées lymphoblastoïdes par les neutrons rapides** **143**

1. Introduction	144
2. Résultats	146
2.1. Externalisation des phosphatidylsérines et inhibition des caspases	146
2.2. Activités des caspases en fonction du statut p53	148
2.3. Analyse de l'activation des caspases par western blot	150
2.4. L'apoptose dépendante de p53 est caractérisée par des dommages mitochondriaux causés par les caspases	154
2.5. L'apoptose p53-dépendante fait intervenir BID	156
2.6. Identification de la caspase responsable du clivage de BID	157
2.7. Libération du cytochrome c de la mitochondrie lors de l'apoptose p53-dépendante	158
3. Discussion	160
3.1. Nature des caspases activées après irradiation par les neutrons rapides	160
3.2. Identification de la caspase initiatrice responsable de l'apoptose induite par les neutrons rapides	161
3.3. p53 et la voie d'amplification mitochondriale	164

---

**Chapitre 3 : Rôle du récepteur Fas dans l'apoptose induite dans des lignées lymphoblastoïdes humaines par des neutrons rapides 167**

1. Introduction	168
2. Résultats	170
2.1. Activation de la caspase-8 par les neutrons rapides	170
2.2. Les cellules TK6 et NH32 sont sensibles à l'apoptose induite par Fas	171
2.3. Etude de l'expression de Fas après irradiation par les neutrons rapides	174
2.4. Influence des neutrons rapides sur l'expression de FasL	179
2.5. Les neutrons rapides n'induisent pas d'agrégation des récepteurs Fas	182
3. Discussion	188

**Chapitre 4 : Identification de gènes impliqués dans l'apoptose induite par des neutrons rapides dans des lignées lymphoblastoïdes humaines 194**

1. Introduction	195
2. Résultats	197
2.1. Mesure de l'apoptose	197
2.2. Rappel de la technique de « cDNA expression arrays »	198
2.3. Vérification de la qualité des ARN extraits des cellules	200
2.4. Analyse de l'expression de gènes après irradiation par les neutrons rapides	201
3. Discussion	204

---

<i>2<sup>ème</sup> partie : Etude de la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par les ions carbone dans des cellules lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53</i>	212
<b>Chapitre 5 : Rôle de p53 dans l'induction d'apoptose par les ions carbone dans des lignées tumorales humaines d'origine lymphoïde</b>	<b>213</b>
1. Introduction	214
2. Résultats	216
2.1. Radiosensibilité aux ions carbone	216
2.2. Induction de l'apoptose par les ions carbone	217
2.3. Corrélation entre l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire, induites par les ions carbone	218
2.4. Activation des caspases par les ions carbone	221
2.5. Importance de la caspase-3 dans l'apoptose induite par les ions carbone	223
3. Discussion	228
<b>CONCLUSION</b>	<b>232</b>
Références bibliographiques	235
Publications et communications personnelles	279
<b>ANNEXES</b>	<b>282</b>

---

---

# *Introduction Générale*

---

## INTRODUCTION

Le cancer figure parmi les premières causes de mortalité dans les pays développés (Tableau 1). Son apparition et son développement dépendent de nombreux facteurs : environnement, hérédité, agents infectieux, processus de vieillissement, habitudes personnelles...

La radiothérapie occupe une des toutes premières places au côté de la chirurgie, dans le traitement des cancers. Plus de la moitié des patients atteints de tumeurs en bénéficient et plus du tiers des cancers guéris l'ont été par cette technique, qui repose sur l'utilisation des radiations ionisantes.

Localisation du cancer	Nombre de décès		
	Hommes	Femmes	Total
Poumon	22649	4515	27164
Colon-rectum	8505	7468	15973
Sein	-	11637	11637
Prostate	10004	-	10004
Foie	6287	1569	7856
Pancréas	3728	3453	7181
Lymphome non-Hodgkinien	2664	2579	5243
Leucémies	2547	2548	5095
Lèvre-bouche-pharynx	4341	749	5090
<b>TOTAL</b>	<b>60725</b>	<b>34518</b>	<b>95243</b>

*Tableau 1 : Mortalité par cancer en 2000 en France.*

La radiothérapie est née, à la fin du siècle dernier, de deux découvertes majeures (Bernier *et al.* 2004) :

- Tout d'abord en 1895, Röntgen découvre les rayons X : il observe que lorsque des électrons accélérés frappent une plaque de métal dans une

ampoule en verre vide d'air, l'ampoule émet des rayonnements, qu'il nomme rayons X. Le français Henri Becquerel entreprend alors des expériences sur le sujet et montre que l'uranium émet naturellement un rayonnement sans cause extérieure.

- En 1898, Pierre et Marie Curie réussissent à extraire du minerai d'uranium deux nouveaux éléments, le polonium et le radium, qui émettent encore plus de rayonnements que l'uranium. Ils montrent que ces rayonnements sont liés aux propriétés mêmes de l'atome et appellent ce phénomène "radioactivité".

Dans les années suivantes, de nombreux éléments radioactifs, ou radioéléments, sont découverts et l'anglais Ernest Rutherford identifie les trois rayonnements de la radioactivité : alpha, bêta et gamma.

L'utilisation médicale des rayonnements se développe immédiatement après leur découverte : les rayons X pour la radiologie dès 1896, les rayons gamma ( $\gamma$ ) du radium pour le traitement des cancers en 1903.

Très rapidement, les expériences menées démontrent qu'il est possible de guérir un cancer par des radiations ionisantes (Bernier *et al.* 2004).

Le but de la radiothérapie est de détruire les cellules malignes tout en respectant les tissus sains environnants. Le traitement des cancers utilise principalement des photons : des rayons X de haute énergie ou des rayons  $\gamma$ .

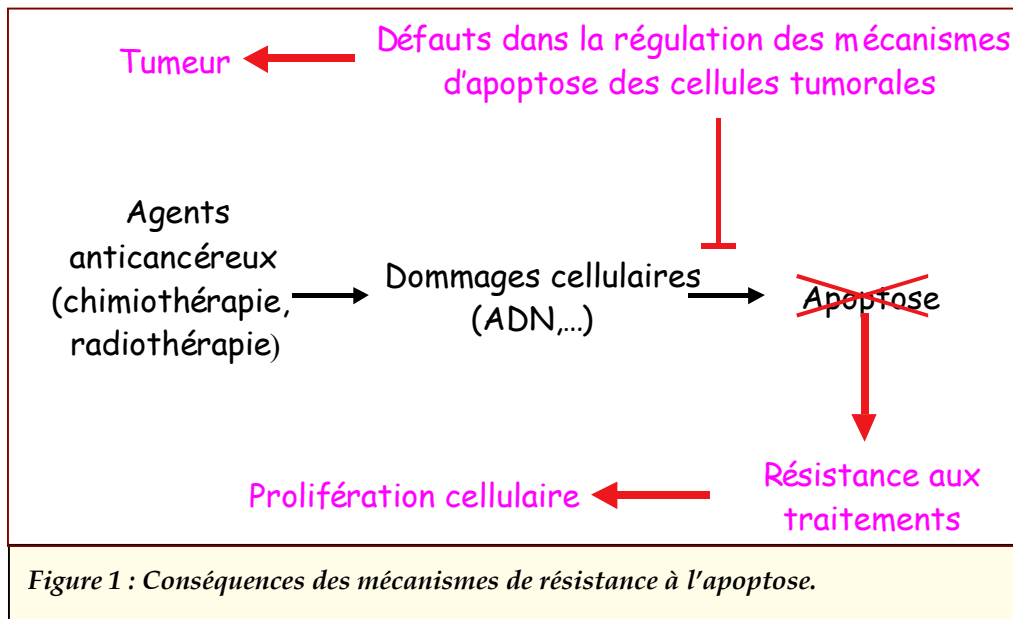
L'efficacité de ces radiations ionisantes repose essentiellement sur leur capacité à induire l'apoptose ou mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses. Ces rayonnements provoquent des dommages, plus ou moins complexes au niveau de l'ADN des cellules, qui vont conduire à un arrêt dans la progression du cycle cellulaire pour pouvoir réparer ces lésions ou induire la mort de la cellule le cas échéant. C'est ce dernier effet qui est recherché pour détruire les cellules cancéreuses. La radiothérapie est un traitement local, elle agit directement sur la zone du cancer. Mais les rayonnements ionisants tuent également les cellules saines situées à la

périphérie de la tumeur. L'efficacité de ce traitement est donc limitée car de trop fortes doses sont dangereuses pour les tissus sains péri-tumoraux.

En outre, certains cancers ont développé des mécanismes de résistance aux processus d'apoptose, soit par l'inactivation de certains gènes activant l'apoptose, soit par la sur-expression de protéines anti-apoptotiques (Tableau 2, Evan et Vousden 2001, Reed 1999).

Sous-expression ou inactivation par mutation de gènes pro-apoptotiques	- p53 (inactivé dans 50 % des can
	- Récepteurs Fas (carcinome du co
	- Bax (cancer de l'estomac, leucé
	- PTEN (glioblastome, ostéosarcom
Sur-expression ou activation de gènes anti-apoptotiques	- Bcl-2 (lymphomes non Hodgkinien
	- Bcl-xL (cancer de la prostate,
	- FLIP (mélanome)
	- IAP : survivin (lymphomes, méla
<b>Tableau 2 : Mécanismes de résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose.</b>	

Ces mécanismes qui empêchent l'induction d'apoptose sont responsables de la résistance à la radiothérapie (Figure 1).



Pour accroître l'efficacité de la radiothérapie envers ces cancers plus résistants, de nouvelles techniques d'irradiation telles que l'hadronthérapie ont été introduites, permettant de délivrer des doses de rayonnement plus élevées sur la tumeur.

L'hadronthérapie regroupe l'utilisation de particules de la famille physique des hadrons, des éléments constituant le noyau des atomes : protons, neutrons et noyaux atomiques chargés (constitués de neutrons et de protons). Certains de ces rayonnements présentent un transfert d'énergie linéique (TEL) élevé par opposition aux rayons X ou  $\gamma$ . Ils induisent des dommages plus complexes et moins facilement réparables. De même, la masse élevée de ces particules, ainsi que leur type d'interaction avec la matière leur confèrent des caractéristiques spécifiques dont on peut tirer parti en radiothérapie. Cependant, si les effets biologiques des rayons X ou  $\gamma$  sont très étudiés, peu d'informations sont disponibles quant aux mécanismes mis en oeuvre par la cellule en réponse aux radiations à TEL élevé, en particulier en ce qui concerne l'induction de l'apoptose. Or, la compréhension des mécanismes apoptotiques induits par les différents types de radiations est essentielle pour l'amélioration des traitements existants et pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à détruire les cellules malignes radiorésistantes.



Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à définir les effets de radiations à TEL élevé, plus particulièrement les neutrons rapides et les ions carbone, sur des cellules lymphoblastoïdes humaines.

- Nous avons tout d'abord étudié de manière quantitative, l'induction d'apoptose par ces types de rayonnements ainsi que l'influence de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans l'apparition de ce phénomène, en utilisant deux lignées qui diffèrent par leur statut p53.
- Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation activées dans ces mêmes lignées, suite à une irradiation, afin d'identifier les différents mécanismes impliqués dans le déclenchement du processus apoptotique. Nous avons déterminé la séquence d'activation des caspases. Nous avons notamment étudié le rôle de la mitochondrie ainsi que celui des récepteurs membranaires dans l'initiation de l'apoptose.

## Chapitre 1

# LES RADIATIONS IONISANTES ET LEURS EFFETS BIOLOGIQUES

Le but de la radiothérapie est d'utiliser des rayonnements ionisants pour induire la mort des cellules cancéreuses. Les rayonnements utilisés le plus communément dans la lutte contre le cancer sont les rayons X et  $\gamma$ . Mais d'autres radiations sont également utilisées ou sont en cours de développement comme les protons, les neutrons rapides ou les ions lourds. Les conséquences biologiques d'une exposition à un rayonnement ionisant restent encore aujourd'hui mal connues. Pourtant, il est important pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie, de mieux comprendre comment ces radiations ionisantes interagissent avec la matière vivante, et en particulier quels sont les mécanismes qu'elles activent dans la cellule pour conduire à la mort cellulaire par apoptose. Les effets de ces rayonnements sont complexes et dépendent des particules constituant le rayonnement et du milieu rencontré. Les radiations induisent dans la matière vivante des dépôts d'énergie qui sont à l'origine des effets biologiques. Cependant, entre l'interaction proprement dite du rayonnement avec la cellule et l'apparition de ces effets biologiques, il se produit toute une suite d'événements que l'on peut répartir en 3 grandes phases (Figure 2) :

- une phase physique très courte de l'ordre de  $10^{-12}$  secondes, qui correspond aux collisions des rayonnements avec les atomes de la matière vivante,
- une phase physico-chimique qui dure quelques microsecondes, où les molécules ionisées et excitées lors de la phase physique vont diffuser et interagir entre elles et avec les molécules voisines,
- une phase biologique divisée elle-même en une étape cellulaire de quelques secondes à quelques jours et une étape tissulaire de quelques jours à une ou plusieurs années. Pendant l'étape cellulaire, les radiations, par les mécanismes induits lors des premières phases, altèrent la structure des macromolécules

(ADN, protéines, lipides membranaires) ce qui perturbe les principales fonctions de la vie cellulaire. Les lésions produites sont prises en charge par les systèmes de réparation ou conduisent au déclenchement de l'apoptose. Une mauvaise réparation de ces dommages ou une induction massive d'apoptose peuvent se traduire par l'apparition de lésions au niveau des tissus, ce qui constitue l'étape tissulaire.

Après une description des différents types de rayonnements existants et quelques définitions, les différentes phases d'interaction des radiations ionisantes avec la matière vivante seront expliquées dans ce chapitre. Les conséquences biologiques des rayonnements seront abordées en détails. J'insisterai surtout sur les effets des rayons X (ou gamma) ainsi que sur ceux des neutrons et des ions lourds, qui sont les rayonnements que j'ai utilisés dans mes expériences. Les avantages de ces deux derniers types de rayonnements par rapport aux rayons X seront mis en évidence, tout au long des différentes parties constituant ce chapitre.

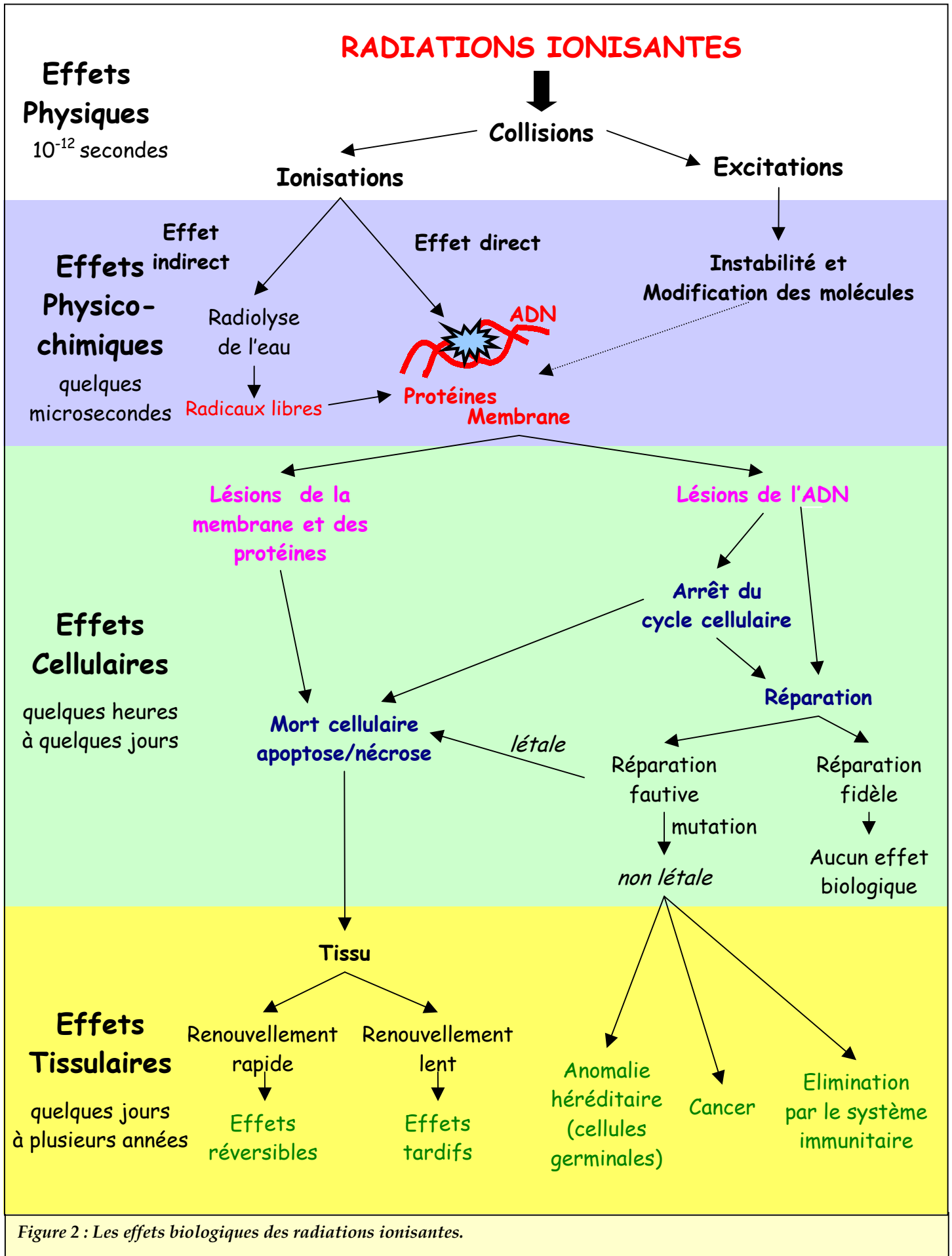


Figure 2 : Les effets biologiques des radiations ionisantes.

## **1. Définitions**

### **1.1. Les radiations ionisantes**

Lorsqu'un rayonnement ionisant interagit avec la matière, il lui transfère une partie de son énergie, produisant des excitations ou ionisations des atomes ou molécules constituant cette matière. L'excitation d'un atome se caractérise par le passage d'un de ses électrons d'un niveau d'énergie donné à un niveau d'énergie supérieur sans éjection de celui-ci. Le phénomène d'ionisation, quant à lui, se produit lorsque l'énergie échangée par le rayonnement est suffisante pour éjecter un ou plusieurs électrons d'un atome (Hall 1978).

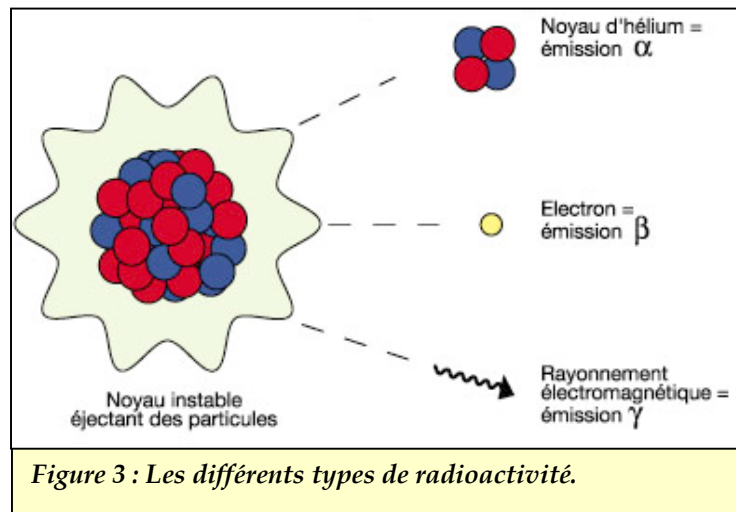
L'énergie absorbée lors de ces deux mécanismes va induire des lésions au niveau des molécules : ruptures de liaisons moléculaires, créations de radicaux libres, déclenchements de réactions chimiques, génération de défauts dans des structures cristallines, ...

De l'altération de ces molécules biologiques découlent les effets cellulaires et tissulaires des radiations ionisantes.

### **1.2. Origine des radiations ionisantes**

En radiothérapie, les radiations ionisantes ont deux origines distinctes :

- la radioactivité, c'est-à-dire l'émission spontanée d'un rayonnement par le noyau de certains atomes radioactifs, lors de leur désintégration.



Ces atomes radioactifs ont des noyaux instables, ce qui est dû soit à un excès de protons ou de neutrons, soit à un excès des deux particules. Ces noyaux vont se transformer en d'autres noyaux plus stables, en émettant différents types de rayonnements : alpha, bêta ou gamma (Figure 3).

- les générateurs de radiations : ce sont des appareils construits en vue de la production de radiations, telles que les rayons X, les neutrons, les protons et les ions lourds.

### 1.3. Les différents types de radiations ionisantes

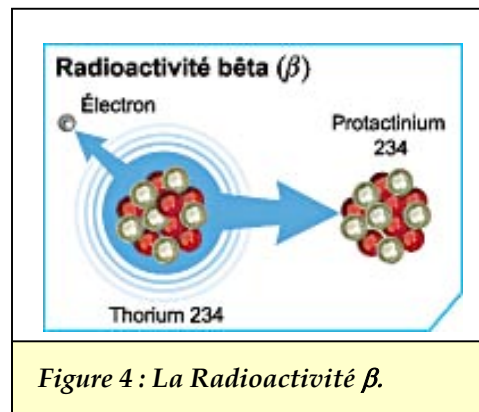
Les rayonnements peuvent être différenciés selon qu'ils sont directement ou indirectement ionisants. Toutes les particules électriquement chargées sont directement ionisantes : les électrons, les particules  $\alpha$ , les protons et les ions lourds. Elles possèdent suffisamment d'énergie cinétique pour directement arracher des électrons (perturber la structure atomique) de la matière qu'elles traversent et produire des changements chimiques et biologiques. Les radiations indirectement ionisantes ne produisent pas elles-mêmes les dommages, mais lorsqu'elles sont absorbées, cèdent leur énergie pour produire des particules rapides chargées, lesquelles vont ioniser les atomes et induire les effets biologiques. C'est le cas des rayons X, des rayons  $\gamma$  et des neutrons.

### 1.3.1 Les radiations directement ionisantes

#### ➤ Le rayonnement bêta moins $\beta^-$ et les électrons

Le rayonnement  $\beta^-$  est constitué d'électrons chargés négativement, qui agissent en mettant en mouvement les électrons des milieux traversés. Il est émis par certains noyaux radioactifs qui sont trop chargés en neutrons (Figure 4). Un des neutrons de ces noyaux se transforme spontanément en proton et provoque l'émission d'un électron.

Le parcours de ces électrons est long et sinueux et ils sont assez pénétrants. Ils interagissent avec la matière par répulsion électronique. Leur énergie est déposée sur une longue distance, ils sont donc moins ionisants que d'autres rayonnements comme les particules  $\alpha$ .



Les électrons accélérés produits par les accélérateurs en radiothérapie possèdent les mêmes caractéristiques que les électrons dus au rayonnement  $\beta^-$ .

Il existe également un rayonnement  $\beta^+$  qui est constitué de positons (particule de même masse que l'électron mais de charge positive). Ces rayonnements  $\beta^+$  ne sont pas utilisés en radiothérapie. Ils le sont en revanche en diagnostic (PETscan).

#### ➤ Le rayonnement alpha ( $\alpha$ )

Le rayonnement  $\alpha$  est constitué de particules lourdes, chargées positivement qui sont des noyaux d'hélium comprenant deux protons et deux neutrons. Il est émis lors de la désintégration de noyaux radioactifs très lourds (Figure 5). Ces noyaux émettent

un noyau d'hélium léger pour devenir moins volumineux et se rapprocher de la stabilité.

Les rayons  $\alpha$  sont fortement ionisants : ils arrachent beaucoup d'électrons aux atomes qu'ils rencontrent. Comme ce sont des particules de masse élevée, en comparaison avec les électrons et qu'ils sont éjectés du noyau à une vitesse très importante, les rayons  $\alpha$  ne sont pas déviés et leur trajectoire est rectiligne. Par contre, ils sont très rapidement arrêtés, donc peu pénétrants.

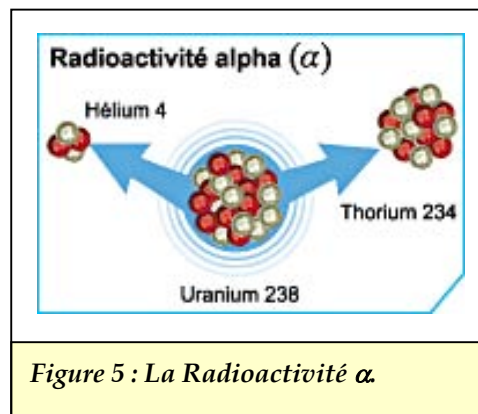


Figure 5 : La Radioactivité  $\alpha$ .

➤ **Les protons**

Les protons sont des particules élémentaires chargées positivement, de masse relativement élevée. En radiothérapie, ils sont produits par des cyclotrons. Ils vont agir en cédant leur énergie au cours de collisions avec les noyaux (interactions nucléaires) et surtout avec les électrons (interactions électroniques) des tissus traversés.

➤ **Les ions lourds**

Les ions lourds sont des noyaux d'éléments comme l'azote, le carbone, le bore, le néon ou l'argon, chargés positivement. Leur production nécessite la présence de synchrotrons qui permettent d'accélérer à énergie variable différents types d'ions. Ils sont les constituants des rayons cosmiques.



### 1.3.2 Les radiations indirectement ionisantes

#### ➤ Les rayons gamma ( $\gamma$ ) et rayons X

Ces rayonnements sont les plus utilisés en radiothérapie. Ce sont des ondes électromagnétiques, comme la lumière visible, mais plus énergétiques (Figure 6). Cette énergie électromagnétique est émise sous la forme de fragments élémentaires d'énergie appelés photons. Les photons n'ont ni masse, ni charge électrique et ils sont très pénétrants.

Les rayons X sont de même nature que les rayons  $\gamma$ . Ils présentent les mêmes propriétés. La seule différence est liée au mode de production :

- Les rayons  $\gamma$  sont d'origine nucléaire, émis par des noyaux radioactifs (Figure 6).

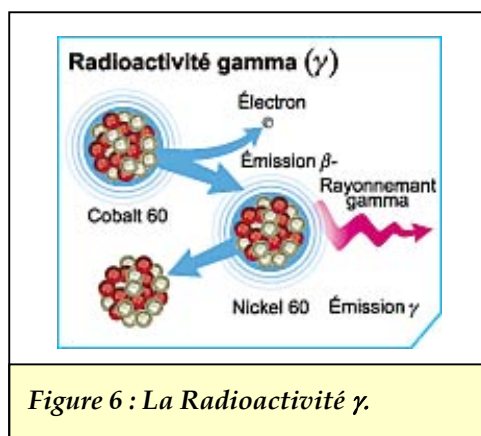
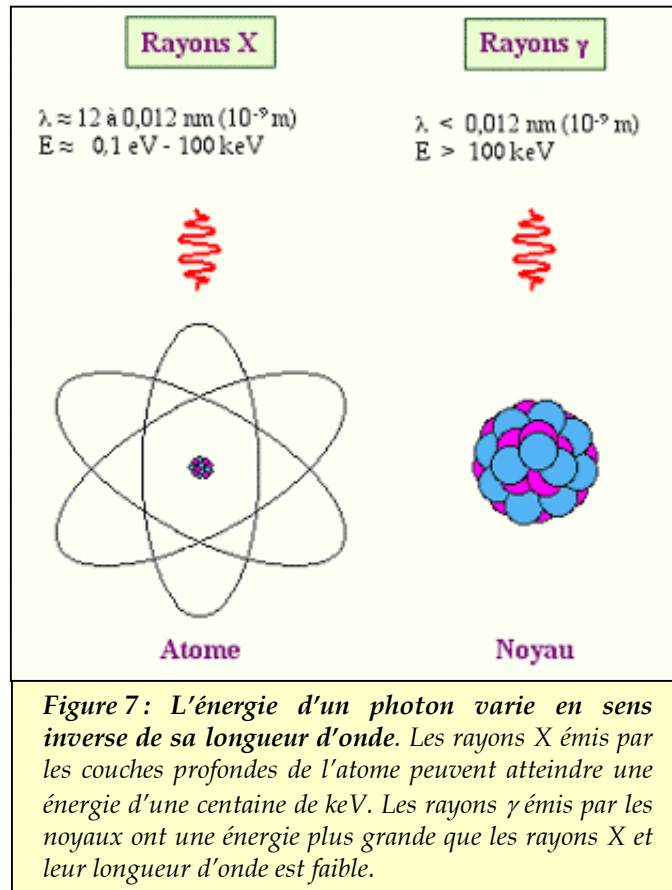


Figure 6 : La Radioactivité  $\gamma$ .

Ils représentent un excès d'énergie du noyau instable qui se désintègre pour atteindre une forme stable. En effet, après avoir émis des particules  $\alpha$  ou  $\beta$ , le noyau est dans un état excité, c'est-à-dire avec un supplément d'énergie, car ses protons et ses neutrons n'ont pas trouvé leur équilibre. Il se débarrassera de cet excès d'énergie en une ou plusieurs étapes, émettant à chaque fois un rayon  $\gamma$  (Figure 6). C'est le cas du cobalt 60, de l'iridium 192 ou du césium 137.

- Les rayons X proviennent du réarrangement des électrons, ils sont donc issus de la périphérie de l'atome (Figure 7). Ils sont produits de manière

électrique : des électrons sont accélérés dans le vide, à une haute énergie et stoppés par une cible (tungstène ou or). Une partie de l'énergie de ces électrons est alors transformée en rayons X.



### ➤ Les neutrons

Les neutrons sont des particules élémentaires non chargées, de même masse que les protons. Ils ne peuvent être accélérés par un champ électrique. La production des neutrons est basée sur des cyclotrons accélérant soit des protons soit des deutérons qui sont ensuite envoyés sur une cible de béryllium ce qui produit des rayonnements de neutrons. Ils sont aussi émis, en seconds produits, lorsque des atomes radioactifs lourds subissent une fission pour former deux atomes plus petits.

Le pouvoir de pénétration des neutrons dépend de leur énergie. Leur trajectoire est rectiligne. Ils interagissent uniquement avec les noyaux des atomes de la matière qu'ils traversent (Hall 1978).

## **2. Effets physiques des radiations ionisantes**

Les effets physiques des radiations sont de très courte durée, ils suivent directement l'irradiation. Ils correspondent aux collisions des rayonnements avec les atomes, c'est-à-dire aux ionisations et excitations moléculaires induites par le dépôt d'énergie dans la matière, lors de la traversée du faisceau. La manière dont cette énergie est absorbée par la matière dépend du type de rayonnement.

### **2.1. Notion de dose absorbée**

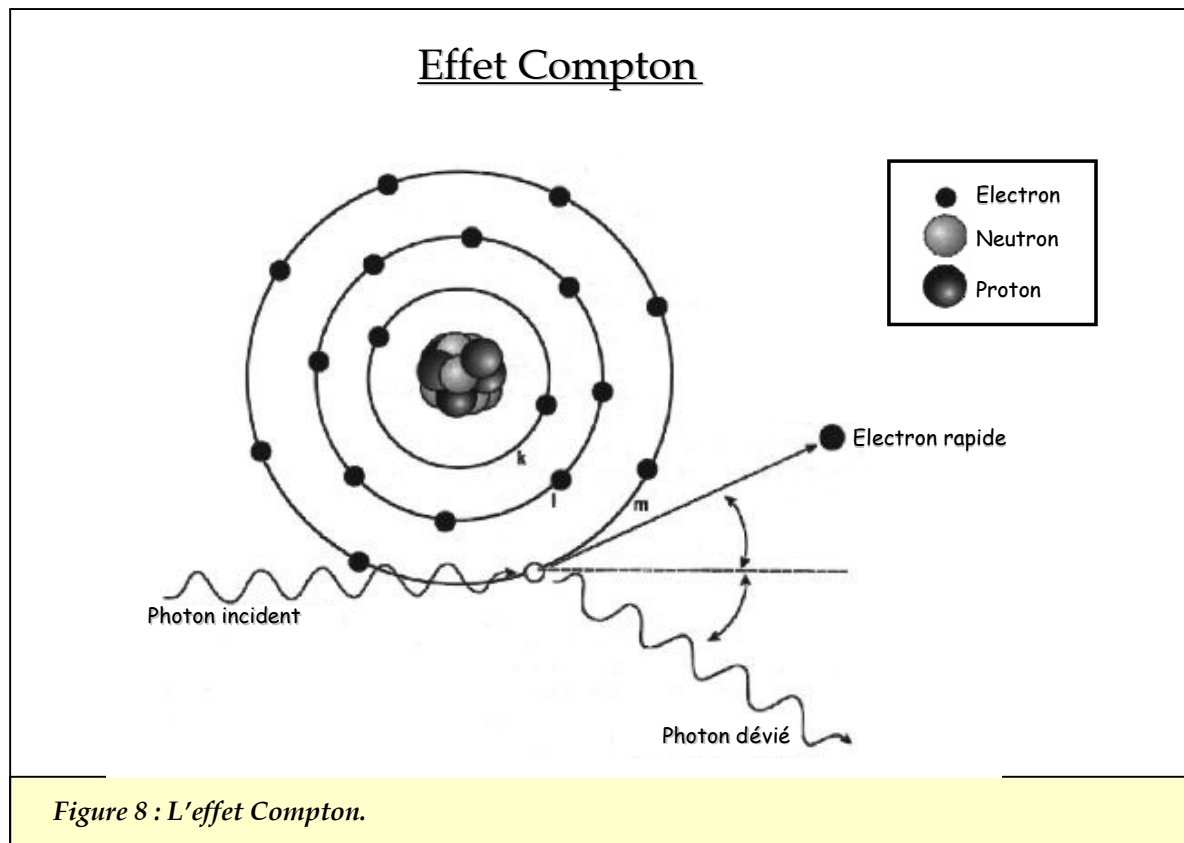
La dose absorbée représente la quantité d'énergie absorbée par unité de matière. Cette dose absorbée est différente de l'énergie émise. Elle est exprimée en Gray (Gy). 1 Gy correspond à un transfert à la matière d'une énergie de 1 joule par kilogramme.

### **2.2. Absorption des photons (rayons X ou $\gamma$ ) par la matière vivante**

Le comportement des photons dans la matière est fondamentalement différent de celui des particules chargées. En une seule interaction, le photon peut être complètement absorbé et disparaître. Mais, à l'inverse, il est susceptible de traverser des quantités importantes de matière sans interagir du tout.

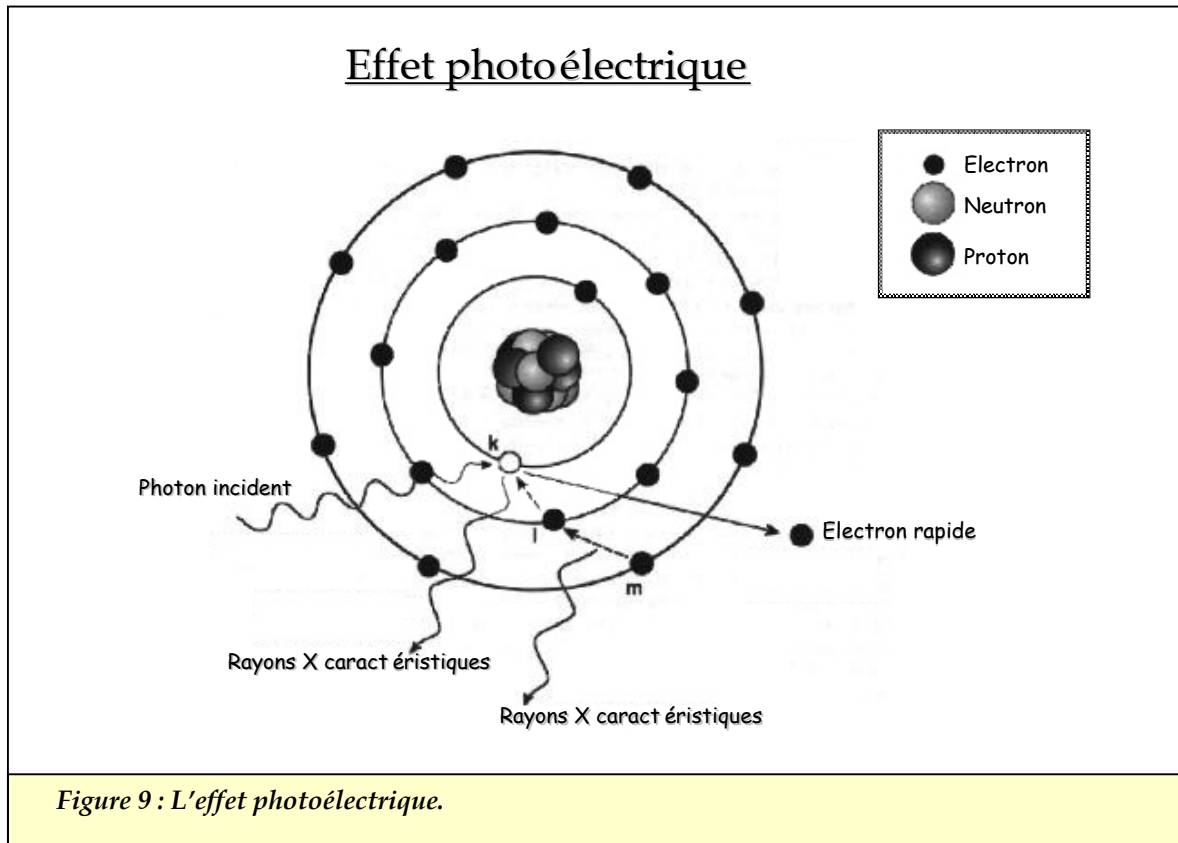
Les photons doivent mettre en mouvement des particules chargées pour transmettre leur énergie au milieu. Ils interagissent essentiellement avec les électrons de l'orbite des atomes qu'ils rencontrent. L'absorption des photons dépend de l'énergie de ceux-ci et de la composition chimique de la matière qui les absorbe. Les principaux mécanismes d'absorption de ces rayonnements sont l'effet Compton, qui domine à haute énergie, et l'effet photoélectrique. Lors de l'effet Compton, la collision d'un photon avec un électron d'un atome de la matière conduit au partage de l'énergie

initiale entre le photon et l'électron qui est éjecté de l'atome (Hall 1978, Pouget et Mather 2001). L'électron rapide produit va ensuite exciter ou ioniser d'autres atomes constituant les tissus adjacents. Le photon dévié de son chemin initial continue son parcours et va être à l'origine d'autres interactions, en fonction de son énergie (Figure 8). Le dépôt d'énergie dans la matière diminue en fonction de la distance parcourue par les photons.



A des énergies plus basses, l'effet photoélectrique prédomine. Le photon interagit alors avec un électron de la couche électronique K, L ou M d'un atome de la matière et va lui céder toute son énergie.

L'électron va utiliser cette énergie pour se libérer de son orbite et pour aller ioniser d'autres atomes. La place vide laissée par l'électron dans la couche électronique va être occupée par un autre électron d'une couche extérieure du même atome ou par un électron extérieur à l'atome (Figure 9). Ce mouvement d'une couche à une autre représente une perte d'énergie, qui se traduit par l'émission d'un photon avec une longueur d'onde caractéristique.



Pour l'effet Compton, l'absorption des photons est indépendante de la matière traversée. La dose absorbée est approximativement la même pour tous les tissus. Par contre lorsque l'effet photoélectrique est le plus important, les photons seront absorbés préférentiellement par les os car ils contiennent des éléments comme le calcium qui a une masse élevée. L'absorption varie donc selon le numéro atomique des atomes constituant la matière. C'est pourquoi les photons de faible énergie sont surtout utilisés en radiologie pour le diagnostic et les photons de haute énergie pour la radiothérapie.

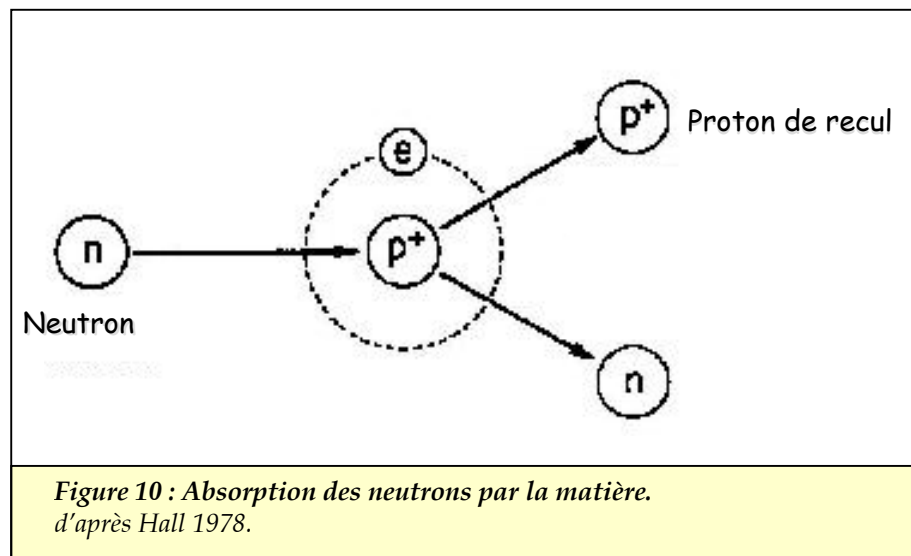
### 2.3. Absorption des neutrons par la matière vivante

Les neutrons traversent les couches d'électrons des atomes et interagissent avec leurs noyaux produisant des particules chargées secondaires : des protons rapides, des

particules  $\alpha$  et des fragments nucléaires lourds responsables des ionisations et excitations du milieu.

En fonction de leur énergie, les neutrons peuvent entrer en collision avec les noyaux avec lesquels ils interagissent et être ralentis ou ils peuvent être capturés par ces noyaux et provoquer des réactions nucléaires.

A des énergies entre 100 keV et 20 MeV, l'absorption des neutrons se fait par collision élastique avec les noyaux. Une partie de l'énergie des neutrons est cédée au noyau et va entraîner la formation de protons de recul qui vont exciter et ioniser d'autres molécules (Figure 10). Le neutron dévié avec une énergie réduite va entrer en collision avec d'autres noyaux. Le ralentissement des neutrons est assez rapide. Le dépôt de dose des neutrons est similaire à celui des photons avec une diminution de l'énergie déposée en fonction de la distance parcourue par les neutrons (Hall 1978).



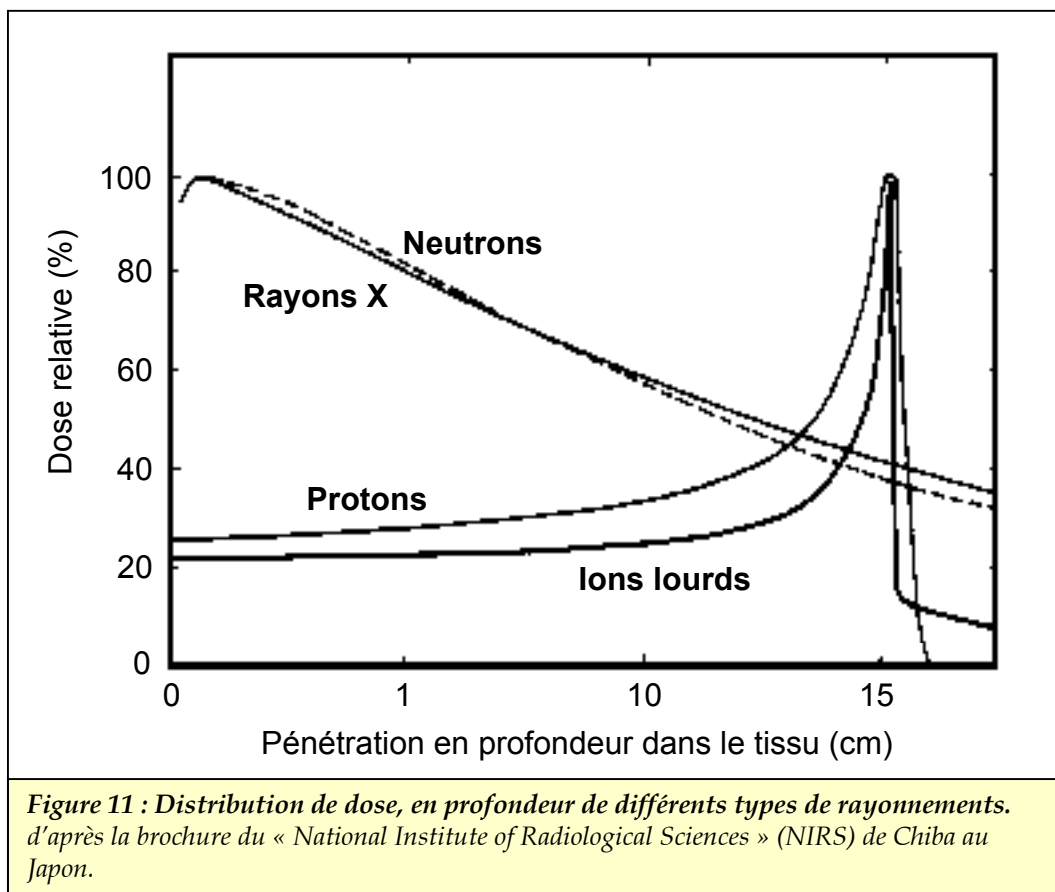
A des énergies supérieures à 6 MeV, des collisions inélastiques et des phénomènes de capture de neutrons peuvent survenir : les neutrons interagissent avec les noyaux et sont absorbés par ceux-ci. Ces noyaux sont alors dans un grand état d'excitation et peuvent produire des particules  $\alpha$ , des protons, des rayonnements  $\gamma$  et même d'autres neutrons. Ces dernières sont très ionisantes et peuvent induire des effets biologiques importants.

## 2.4. Absorption des ions lourds par la matière vivante

Les particules lourdes électriquement chargées telles que les ions lourds interagissent avec le milieu traversé par le biais de leur charge électrique. Ces particules cèdent immédiatement de l'énergie à un grand nombre d'électrons du milieu, dès qu'elles pénètrent dans ce milieu. Elles sont les seules à perdre leur énergie progressivement en arrachant des électrons aux atomes le long de leur parcours (Katz et Cucinotta 1999).

Au début de leur trajet, elles se déplacent vite et le temps d'interaction avec la matière est faible : les ionisations sont peu nombreuses. Puis à chaque ionisation, elles perdent progressivement de la vitesse et le dépôt d'énergie par unité de longueur augmente jusqu'à l'arrêt de la particule. Ainsi, la plus grande quantité d'énergie est déposée en fin de parcours (Kraft 1998, Orecchia *et al.* 1998). Ce dépôt d'énergie en profondeur est appelé pic de Bragg (Figure 11).

La profondeur de ce pic dépend de la nature de la particule (de son numéro atomique et de son énergie).



Le ralentissement des particules chargées lourdes s'effectue donc au cours d'un très grand nombre d'interactions et leurs trajectoires peuvent être considérées comme rectilignes.

La présence du pic de Bragg confère un avantage balistique à ces particules chargées qui peut être utilisé en radiothérapie. En effet, le dépôt en profondeur de l'énergie permet de concentrer la dose au niveau de la tumeur et de réduire les dommages au niveau des tissus sains avoisinant la tumeur.

L'absorption des ions lourds peut donc être schématisée sous la forme d'une colonne d'ionisations qui augmente en densité quand les particules ralentissent. Les ions lourds provoquent aussi la formation de rayons delta, qui sont de simples électrons éjectés des atomes par les ionisations et qui forment une région d'ionisations moins denses en dehors du centre d'ionisations.

## **2.5. Notion de transfert d'énergie linéique (TEL)**

Tous les rayonnements décrits ci-dessus aboutissent à une perte d'énergie le long de leur trajet dans la matière. L'effet produit sur la matière vivante dépend de la quantité d'énergie cédée au milieu, et plus précisément de la densité d'énergie absorbée. Une manière de quantifier le transfert d'énergie d'une particule consiste à définir son transfert d'énergie linéique ou TEL qui représente l'énergie moyenne transférée à la matière par unité de longueur de la trajectoire de la particule. Il est exprimé en keV/ $\mu$ . Plus la perte d'énergie est importante, moins la distance traversée par la particule est grande, et plus la zone traversée va subir d'ionisations (Goodhead 1999).

Le TEL représente la distribution spatiale des ionisations et excitations produites le long de la trajectoire de la particule. Il joue un rôle important dans la compréhension des mécanismes des effets biologiques des radiations.



Types de radiations	Transfert d'énergie linéique (keV/μm)
<b>Photons</b>	
<sup>60</sup> Co	0.3
Rayons X de 200 kV	2.5
<b>Electrons</b>	
1 MeV	0.2
100 keV	0.5
10 keV	2
1 keV	10
<b>Particules chargées</b>	
protons de 2 MeV	17
particules alpha de 5 MeV	90
carbone de 100 MeV	160
<b>Neutrons</b>	
2,5 MeV	15-80
14 MeV	3-30

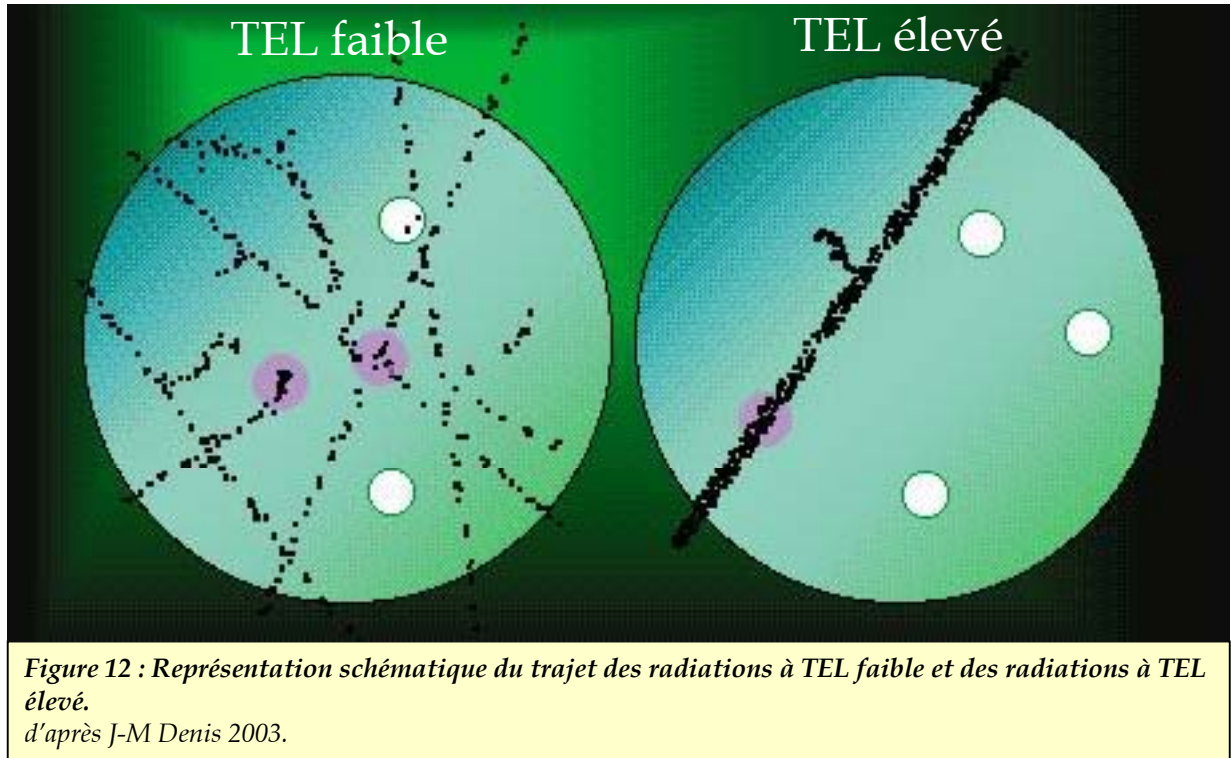
*Tableau 3 : TEL ou Transfert d'Energie Linéique de différents types de radiations.*

Le profil d'excitations et d'ionisations le long du trajet de la particule diffère selon le milieu traversé et selon la nature de la particule. Dans le Tableau 3, la valeur du TEL est donnée pour différents types de radiations.

La densité d'ionisation est plus importante pour les neutrons et les ions lourds que pour les rayons X ou  $\gamma$  et les électrons (Pouget et Mather 2001). En effet, les électrons rapides produits par l'absorption des photons ont des trajets bien séparés dans l'espace. Les ionisations et excitations dues à ces électrons sont diffuses dans la matière. Le TEL de ces rayonnements est faible.

Par opposition, les ions lourds ainsi que les particules  $\alpha$  sont des particules plus lourdes et plus lentes. Ils donnent lieu à des ionisations et excitations très proches les unes des autres, qui tendent à se superposer. Ces radiations sont « densément »

ionisantes. Leur TEL est élevé (Figure 12). De même, les particules secondaires induites par les neutrons sont plus lourdes et plus ionisantes que les électrons rapides produits par les rayons X ou  $\gamma$ . Les neutrons sont des rayonnements avec une densité d'ionisation intermédiaire. Ils ont également un TEL élevé.



### 3. Effets physico-chimiques des radiations ionisantes

Les effets physico-chimiques des radiations se produisent quelques microsecondes après l'irradiation. Ils sont la conséquence des effets physiques. Les molécules ayant subi des ionisations ou excitations interagissent entre elles et avec les molécules voisines.

#### 3.1. Action directe et indirecte des radiations

Lorsque les radiations sont absorbées par la matière biologique, elles peuvent interagir soit directement soit indirectement avec les cibles critiques de la cellule (Figure 13, Pouget et Mather 2001).

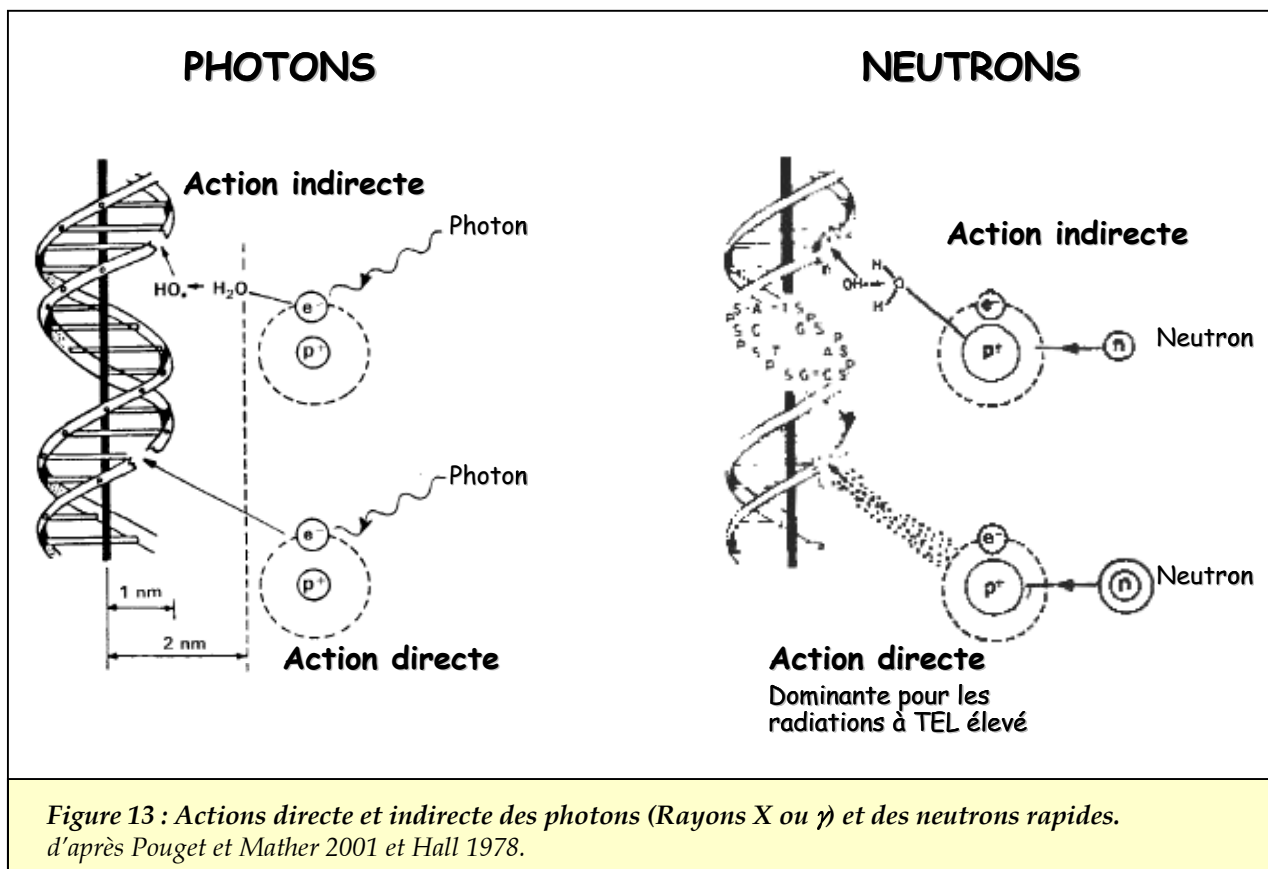


Figure 13 : Actions directe et indirecte des photons (Rayons X ou  $\gamma$ ) et des neutrons rapides. d'après Pouget et Mather 2001 et Hall 1978.

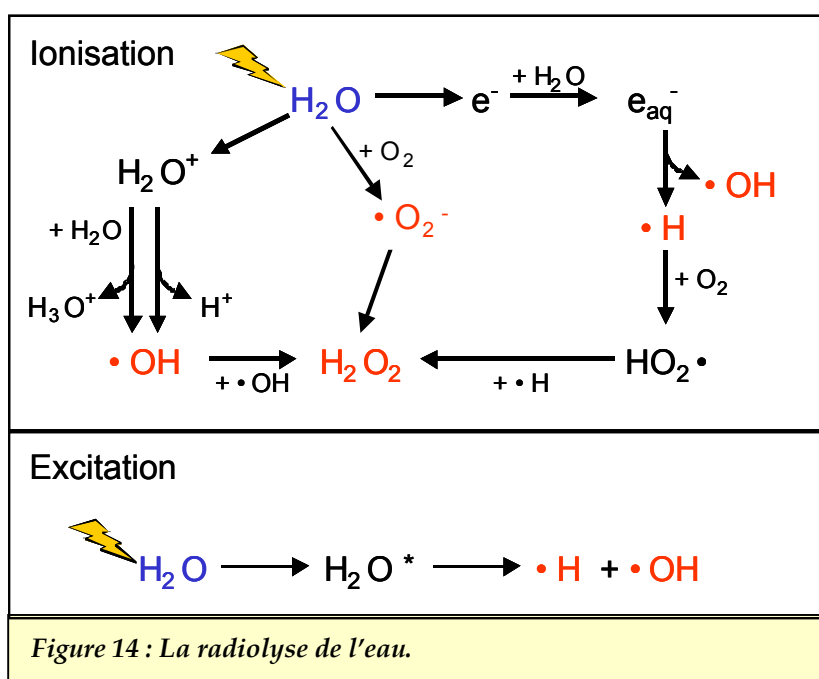
➤ **Action directe**

Les radiations agissent directement sur les cibles cellulaires comme l'ADN. Les atomes de ces cibles sont directement ionisés ou excités par le rayonnement lui-même, induisant la chaîne d'évènements conduisant aux effets biologiques. Cette action directe est prédominante pour les radiations à TEL élevé (Goodhead 1989).

➤ **Action indirecte**

Les radiations peuvent interagir avec d'autres atomes ou molécules dans la cellule pour produire des radicaux libres, qui sont capables de diffuser assez loin pour atteindre et endommager les cibles cellulaires majeures. Un radical libre est un atome ou une molécule portant un électron célibataire, non apparié, très instable, qui va tenter de s'associer avec d'autres atomes. C'est la raison pour laquelle ces radicaux sont très réactifs.

L'essentiel de la cellule (80%) étant constitué d'eau, les radicaux libres induits par les radiations ionisantes sont surtout produits lors de la dégradation de la molécule d'eau. Ce processus, appelé radiolyse de l'eau (Figure 14), génère des radicaux libres oxygénés (ROS). L'ionisation de la molécule d'eau libère un électron rapide et forme l'espèce  $H_2O^{•+}$  dont l'instabilité conduit à  $H^+$  et au radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  (LaVerne 2000).



L'électron libéré se solvate (c'est-à-dire s'entoure de plusieurs molécules d'eau) et va réagir avec d'autres molécules pour former le radical hydroxyle et d'autres radicaux. Ces radicaux peuvent se recombinaer entre eux de plusieurs manières et former, entre autres, le dihydrogène H<sub>2</sub> ou le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un autre radical libre qui peut diffuser dans la cellule sur de longues distances.

Ces radicaux libres oxygénés sont de puissants oxydants, ils attaquent les macromolécules de la cellule comme l'ADN et sont ainsi responsables de l'action indirecte des radiations ionisantes (Figure 13).

Les radicaux libres induits par l'irradiation sont semblables à ceux produits en temps normal dans la cellule par la chaîne respiratoire dans les mitochondries. Mais la production de ces espèces réactives par l'irradiation se distingue de la production respiratoire par le nombre de radicaux générés, par leur nature et leur localisation dans la cellule. Contrairement à la chaîne respiratoire, les radicaux oxygénés produits par les radiations se retrouvent dans tous les compartiments cellulaires et en très grand nombre. L'attaque oxydante intense ne peut alors être contrée de manière efficace par les systèmes de défense contre le stress oxydatif, présent dans les cellules et surtout au niveau des mitochondries (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, différents agents antioxydants comme les vitamines E et C,...).

Les radicaux libres vont attaquer non seulement l'ADN mais aussi les acides gras poly-insaturés des membranes cellulaires qui vont être peroxydés et les acides aminés des protéines.

### **3.2. Influence du TEL sur les effets physico-chimiques des radiations**

La prédominance de l'effet direct ou de l'effet indirect est fonction du TEL des radiations. En effet, l'action directe prédomine lorsque le TEL est élevé, pour les neutrons et les ions lourds. Par contre, pour les radiations à TEL faible comme les photons, l'action indirecte par production de radicaux libres est plus importante que

l'action directe (Schaefer *et al.* 1992). Ceci s'explique par la forte densité d'ionisations et d'excitations des radiations à TEL élevé par comparaison à la distribution plus diffuse de ces événements pour les radiations à TEL faible qui ont donc une probabilité plus importante d'ioniser des molécules d'eau.

En outre, même si l'action directe est dominante pour les TEL élevés, ces radiations produisent aussi des radicaux libres et les proportions des différentes espèces radicalaires générées diffèrent de celles produites par les TEL faibles. En effet, le pourcentage de radicaux simples comme le radical hydroxyle diminue lorsque le TEL augmente, à cause des recombinaisons et réactions de ces radicaux qui se produisent à proximité du trajet de la particule. Par opposition, le taux de « biradicaux » comme le peroxyde d'hydrogène ou le dihydrogène augmente légèrement avec le TEL.

### 3.3. Effet oxygène

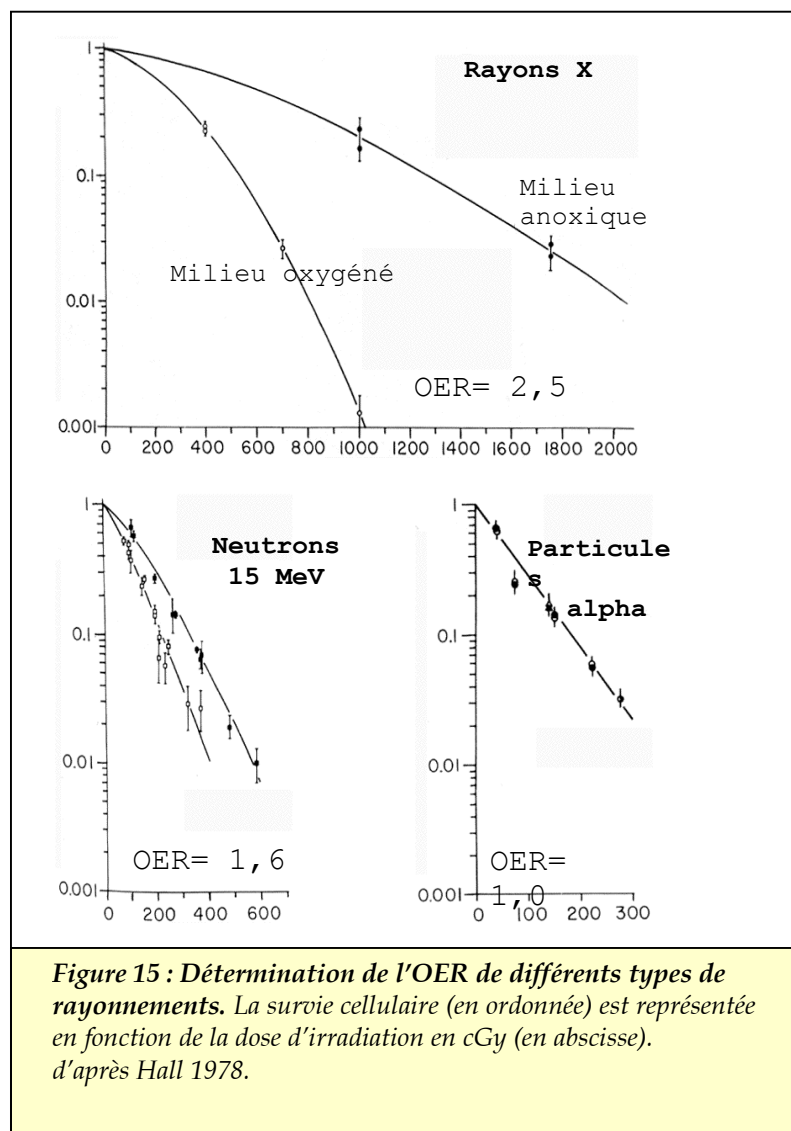
Les radicaux libres produits lors de l'effet indirect des radiations ionisantes sont sensibles à l'oxygène présent dans les cellules. L'oxygène est capable d'interagir avec ces radicaux et d'augmenter leur quantité. Il modifie dans le sens de l'aggravation les réactions d'oxydation des biomolécules.

Les produits de réaction de l'oxygène avec les radicaux libres sont nombreux et très stables : l'oxygène peut, lorsqu'il réagit avec un radical libre  $R^\bullet$ , produire des radicaux peroxydyles  $ROO^\bullet$  ou des radicaux peroxyles  $RO_2^\bullet$ , comme le  $HO_2^\bullet$ , qui peut conduire au peroxyde d'hydrogène (Figure 14). L'oxygène va ainsi contribuer à fixer les lésions des macromolécules cellulaires induites par les radicaux libres, puisque sans oxygène, ces lésions auraient été réparées.

L'oxygène peut aussi induire la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , par réaction des radiations sur la molécule d'eau (Figure 14).

Cet effet, appelé « effet oxygène » varie en fonction du TEL des radiations ionisantes. En effet, comme il repose sur la production de radicaux libres, il sera peu important suite à une irradiation par des particules de TEL élevé, puisque pour ces rayonnements, l'action directe prédomine (Schaefer *et al.* 1992).

Par contre, la présence d'oxygène lors de l'irradiation joue un rôle important pour les effets des radiations à TEL faible. La molécule d'oxygène est un radiosensibilisateur puissant. Les cellules riches en oxygène seront plus sensibles à ces radiations que les cellules hypoxiques où le niveau d'oxygène est faible (Murray *et al.* 2003).



L'augmentation de la radiosensibilité due à l'oxygène est caractérisée par le facteur OER ou « oxygen enhancement ratio », qui correspond au rapport entre la dose

absorbée nécessaire pour obtenir un effet sur des cellules hypoxiques (sans ou avec peu d'oxygène) et la dose absorbée nécessaire pour obtenir le même effet sur des cellules oxygénées. L'OER diminue lorsque le TEL des radiations augmente (Furusawa *et al.* 1998, Prise *et al.* 1990). En ce qui concerne la survie des cellules, l'OER est de 2,5 - 3 pour les rayons  $\gamma$  ou X et de 1,5 - 1,7 pour les neutrons (Figure 15). Cet effet oxygène tient une place importante en radiothérapie puisque les quelques cellules hypoxiques présentes dans une tumeur peuvent être résistantes aux rayons  $\gamma$  ou X et faire échouer le traitement. La faible dépendance des neutrons ou ions lourds vis à vis de l'oxygène représente donc un réel avantage pour l'utilisation de ces types de radiation.



## **4. Effets biologiques des radiations ionisantes**

Que ce soit par action directe ou indirecte, les radiations ionisantes interagissent avec les macromolécules biologiques produisant ainsi des lésions au niveau de divers constituants cellulaires. Ces lésions entraînent des dysfonctionnements cellulaires, qui peuvent, dans certains cas, induire la mort de la cellule. Ces effets biologiques peuvent survenir quelques secondes après l'irradiation.

### **4.1. Effets induits au niveau des constituants cellulaires par les radiations ionisantes**

#### 4.1.1. Cibles cellulaires des radiations ionisantes

##### ➤ **Dommmages au niveau des membranes cellulaires**

Au niveau des membranes cellulaires, les radiations agissent soit sur les protéines, soit sur les phospholipides constituant les membranes. Les dommages causés par les rayonnements ionisants peuvent conduire à des modifications fonctionnelles de la membrane ou même à une dégradation de celle-ci (Benderitter *et al.* 1999).

##### *Effets sur les protéines membranaires*

Les altérations au niveau des protéines proviennent de modifications de leur structure induites par les rayonnements. Elles peuvent entraîner des dysfonctionnements ou inactivations de certaines protéines, conduisant à des perturbations de la physiologie cellulaire. Les radiations ionisantes peuvent notamment induire une modification de la perméabilité membranaire, en agissant sur les pompes ioniques : des altérations des canaux Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup> ont été reportés (Prishchep *et al.* 2002, Todd et Mikkelsen 1994, Kuo *et al.* 1993). Ces effets sont surtout induits par les radicaux libres. Une diminution de la communication intercellulaire

par perturbation des protéines composant les jonctions de type gap, a également été observée après exposition aux radiations (Edwards *et al.* 2004, Azzam *et al.* 2003). Cette modification des jonctions intercellulaires serait responsable de la perte de l'effet « bystander » c'est-à-dire de l'effet biologique observé chez les cellules non irradiées, causé par les cellules irradiées situées à proximité (Mitchell *et al.* 2004).

De plus, les radiations ionisantes peuvent également induire l'activation de certaines protéines membranaires et entraîner des voies de signalisation spécifiques. C'est le cas des récepteurs membranaires. En effet, dans la membrane cellulaire, sont situés de nombreux récepteurs qui répondent à des stimuli précis (TNF, EGF, FAS, TRAIL). Certains peuvent être activés lors de l'irradiation. Cette activation est induite par un ligand lui-même induit par l'irradiation, par des signaux nucléaires activés après lésions de l'ADN ou directement par les rayonnements par des mécanismes encore inconnus. Ces récepteurs activés sont à l'origine de différents processus cellulaires.

Les sphingomyélinases sont un autre exemple d'activation de protéines membranaires par les radiations ionisantes. Ces enzymes, une fois activées, hydrolysent les sphingomyélines et conduisent à la production de céramides (Vit et Rosselli 2003). Les céramides sont d'importants seconds messagers jouant un rôle dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose. L'hydrolyse de la sphingomyéline peut être induite par effet direct des rayonnements sur la membrane ou par suite de signaux nucléaires (Haimowitz Friedman *et al.* 1994).

#### *Effets sur les lipides membranaires*

La dégradation des membranes résulte essentiellement de l'attaque des acides gras polyinsaturés des phospholipides par les radicaux libres produits par l'irradiation (Albanese et Dainiak 2003). Ces radicaux libres provoquent des peroxydations lipidiques, qui sont à l'origine d'une diminution de la fluidité membranaire. Il y a formation de malondialdéhyde et de 4-hydroxynonanal à partir des acides gras membranaires. Ces composés altèrent les propriétés du système membranaire et peuvent aussi induire des lésions de l'ADN (Benderitter *et al.* 2003).

➤ **Lésions de l'ADN**

Les dommages au niveau des protéines cellulaires et de la membrane plasmique ne représentent qu'une partie des effets causés par les radiations. Celles-ci induisent également des altérations de la molécule d'ADN.

Les lésions de l'ADN auront des conséquences plus graves pour la cellule que les lésions des protéines ou de la membrane. En effet, lorsque l'ADN est altéré, l'information génétique qu'il contient peut être modifiée et ces dommages peuvent être transmis à la descendance. De plus, les protéines endommagées par les radiations peuvent être remplacées, alors que les lésions de l'ADN mettent en oeuvre pour leur réparation, des mécanismes d'une complexité extrême.

Il existe différents types de lésions induites par les radiations ionisantes au niveau de l'ADN (Figure 16) :

*Altérations des bases des nucléotides*

Les dommages aux bases résultent surtout de l'attaque des radicaux libres (OH•) mais l'effet direct des radiations peut aussi induire ces dommages (Pouget *et al.* 2002). Les bases, surtout la thymine, peuvent être hydroxylées avec formation d'hydroperoxydes en présence d'oxygène. Des pertes de base peuvent aussi se produire. Ces lésions sont en général réparées rapidement.

*Ruptures de brins d'ADN*

Les ruptures de brins sont de deux types :

- les cassures simple brin (CSB) qui ne concernent qu'un seul brin de l'ADN et sont produites par rupture des liaisons phosphodiester.
- les cassures double brin (CDB) constituées de deux cassures, chacune d'elles étant située en vis-à-vis sur un brin différent de l'ADN. Ces cassures sont séparées l'une de l'autre, d'une distance inférieure ou égale à une dizaine de paires de bases. Elles peuvent résulter d'un

évènement ionisant touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple brin indépendantes.

Les CDB sont les lésions les plus délétères et une large proportion de ces dommages ne peut être réparée par la cellule suite à l'irradiation. En cas de non réparation, elles sont souvent létales pour la cellule. Le nombre de CDB non réparées peut être corrélé avec la radiosensibilité cellulaire (Dikomey et al. 1998).

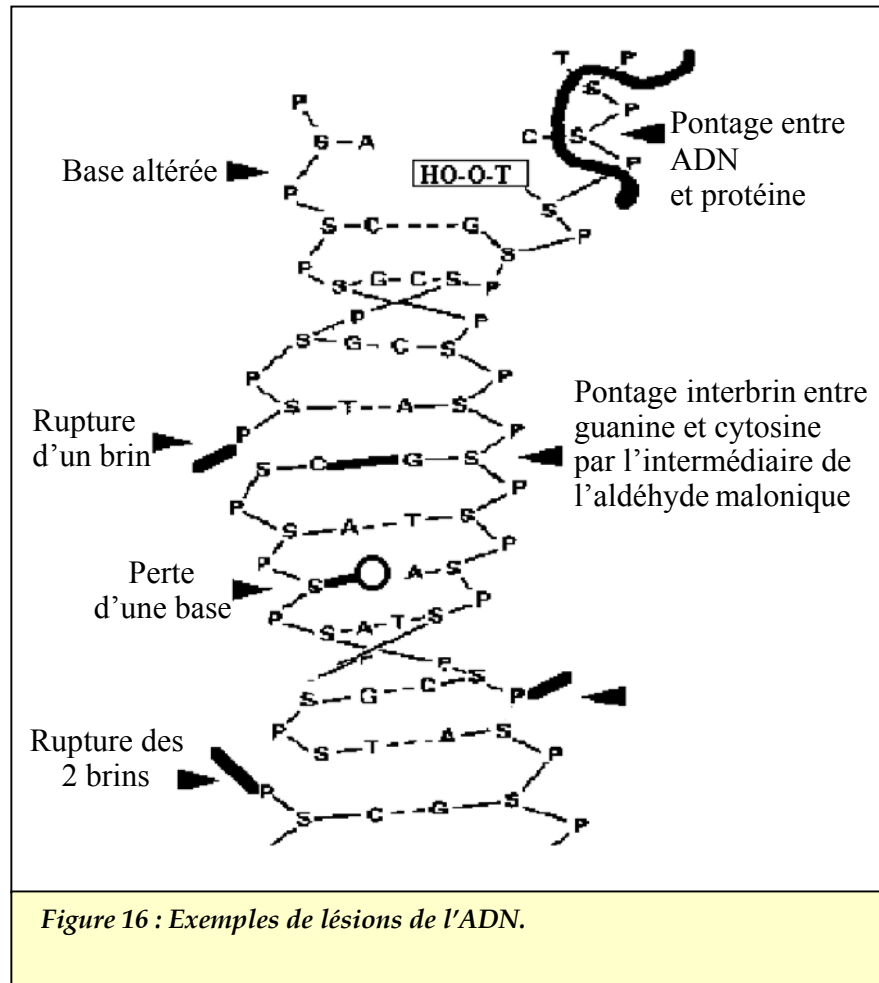
*Formation de pontages entre les brins de l'ADN ou avec les protéines*

Les radiations ionisantes peuvent former des pontages intra- ou inter-brins sur l'ADN, par fusion entre deux ruptures de brins. Ces ponts d'ADN aboutissent à des aberrations chromosomiques.

Les radiations induisent également des associations de protéines avec l'ADN (Jenner *et al.* 1998). Ces associations ADN/protéine impliquent surtout la thymine et la tyrosine mais d'autres bases ont aussi été identifiées. De plus, certains composés, comme le malondialdéhyde provenant de la peroxydation de la membrane plasmique après irradiation, peuvent également induire ces pontages de protéines sur l'ADN. Ces ajouts de protéines modifient la structure de la molécule et donc son fonctionnement.

*Sites de dommages multiples (LMDS locally multiply damages sites)*

Les LMDS consistent en un grand nombre de lésions simples (dommages aux bases, CSB, CDB et associations ADN/protéine ou ADN/ADN), produites à proximité les unes des autres, sur une courte séquence de la molécule d'ADN (Goodhead 1994 ; Sutherland *et al.* 2001). Ces associations ou « clusters » de dommages sont la conséquence d'une accumulation de plusieurs lésions sublétales individuelles. Plus ils sont complexes, moins ils sont réparables par la cellule.



### Aberrations chromosomiques

Les aberrations chromosomiques induites par les radiations ionisantes sont de différents types : translocations, délétions, inversions, anomalies génétiques (anneaux dicentriques, centriques et acentriques). Elles proviennent soit de la liaison de deux extrémités de chromosomes résultant d'une CDB (pontages), soit de l'association d'une extrémité chromosomique libre avec d'autres molécules empêchant la réparation. Mais ce sont surtout les CDB qui sont à l'origine de ces aberrations : il a été montré que les cellules déficientes en système de réparation des CDB ont une fréquence plus élevée d'aberrations chromosomiques (Kemp et Jeggo 1986).

La nature des réarrangements chromosomiques produits dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvait la cellule au moment de l'irradiation. Si les cassures de brins surviennent pendant la phase G<sub>0</sub> ou G<sub>1</sub> et ne sont pas réparées,

elles peuvent être répliquées : les chromatides soeurs qui en résulteront seront affectées toutes les deux et une aberration chromosomique est produite. Par contre, si l'irradiation a lieu après la synthèse d'ADN, seulement une chromatide est affectée et une aberration chromatidienne sera formée.

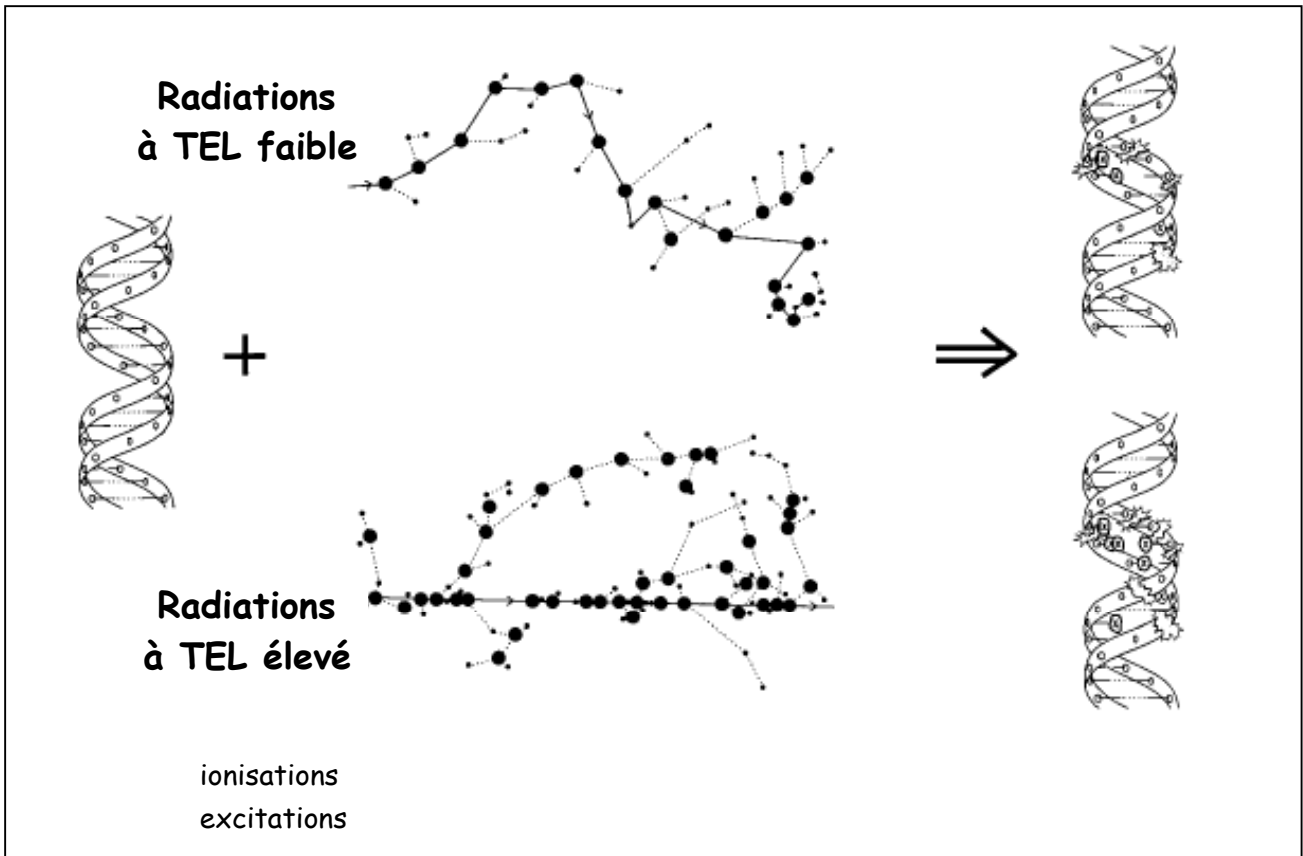
Plusieurs de ces aberrations sont létales pour la cellule et ne sont pas transmises durant la division cellulaire, tandis que d'autres sont plus stables (inversions, translocations) et peuvent persister dans les cellules après plusieurs divisions.

#### 4.1.2. Importance du TEL dans les dommages induits par les radiations

Le choix entre la survie et la mort de la cellule dépend de l'efficacité des systèmes de réparation et surtout de la complexité des dommages de l'ADN. Or la nature des lésions induites par les radiations ionisantes, surtout celles induites au niveau de l'ADN, dépend du TEL des rayonnements.

Les radiations à TEL élevé, -neutrons ou ions carbone -, induisent surtout, au niveau de l'ADN, des dommages en « grappes » (LMDS) qui sont faiblement réparables (Mustonen *et al.* 1999, Goodhead 1999, Blakely et Kronenberg 1998). Ces LMDS sont plus nombreux et plus complexes après exposition aux radiations à TEL élevé qu'après exposition aux radiations à TEL faible (Figure 17).

Comme les CDB sont les lésions de l'ADN les moins réparables, il a été avancé que ces lésions étaient induites en plus grand nombre par les radiations à TEL élevé et participaient ainsi à la formation des dommages en « grappes ». Or, certains chercheurs ont montré que le TEL n'agit pas sur le nombre total de CDB produites mais qu'il augmente leur complexité (Goodhead *et al.* 1999, Kysela *et al.* 1993, Heilmann *et al.* 1995).



**Figure 17 : Illustration des dommages complexes, en « grappes », de l'ADN, induits par les radiations à TEL faible et par les radiations à TEL élevé. Le trajet des particules est également représenté. Dans le cas des radiations à TEL élevé, les ionisations et excitations sont plus concentrées le long de la trajectoire des particules. Au contraire, elles sont plus diffuses pour les radiations à TEL faible. d'après Goodhead 1999.**

En revanche, d'autres études ont mis en évidence la formation, par les rayonnements à TEL élevé, de nombreux fragments d'ADN de petite taille ou de taille moyenne (< 200 kpb) (Lobrich *et al.* 1996, Stenerlow *et al.* 2002, Rydberg *et al.* 2002). Ces fragments résultent de la formation de CDB. Les rayons X et  $\gamma$  sont moins efficaces que les radiations à TEL élevé pour produire ces fragments (Lobrich *et al.* 1996). Si ces fragments sont pris en compte dans la détermination du nombre de CDB produites après irradiation, il apparaît que les radiations à TEL élevé induisent plus de CDB que les radiations à TEL faible. Avec le TEL augmente donc non seulement la complexité mais aussi le nombre de CDB (Lobrich *et al.* 1996, Hoglund *et al.* 2000).

En outre, les CDB induites par les rayonnements à TEL élevé sont concentrées dans une même région de l'ADN, très proches les unes des autres, ceci du fait de l'organisation de la chromatine. Les CDB produites par les rayons X ou  $\gamma$  sont par

contre, distribuées de manière plus uniforme dans toute la molécule d'ADN (Radulescu *et al.* 2004, Kraxenberger *et al.* 1998). Ces dommages sont non seulement plus sévères mais aussi plus difficilement réparables : les fragments non réparés sont plus élevés après les radiations à TEL élevé qu'après les rayons X (Sternelov *et al.* 2000). La réparation est par ailleurs plus lente et moins efficace du fait de la complexité des lésions (Hendry 1991, Pinto *et al.* 2002).

L'influence du TEL dans les altérations des bases n'a pas été clairement déterminée, mais ces altérations de bases participent également à la complexité des lésions.

En conclusion, les radiations à TEL élevé induisent une proportion plus importante de CDB que les radiations à TEL faible. Ces CDB participent à la formation de sites de dommages multiples qui sont plus complexes, plus nombreux et moins facilement réparables que les dommages induits par le rayons X ou  $\gamma$ .

Les radiations à TEL élevé induisent aussi un plus grand nombre d'aberrations chromosomiques, le taux d'aberrations chromosomiques étant directement lié au nombre de CDB. Les radiations à TEL élevé sont également caractérisées par des dommages chromosomiques plus sévères (Sabatier *et al.* 1987). Le nombre de cassures de chromosomes est plus élevé par réarrangement. Certains types de dommages induits par ces radiations ne sont pas observés après les radiations à TEL faible (Smith *et al.* 2003).

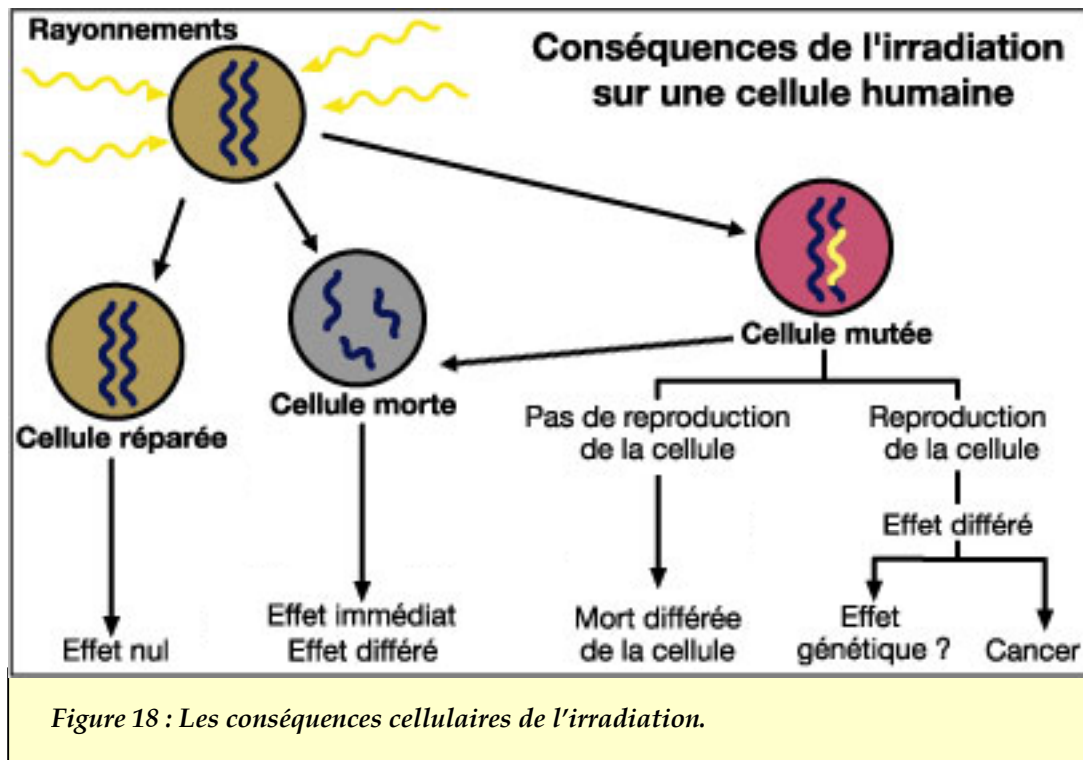
## **4.2. Effets cellulaires des radiations ionisantes**

### **4.2.1. Conséquences des lésions dues à l'irradiation**

Afin d'adapter leur réponse à l'irradiation, les cellules doivent détecter les dommages de l'ADN, de la membrane ou du cytoplasme et émettre des signaux cellulaires qui vont induire un arrêt dans la progression du cycle cellulaire. Cet arrêt du cycle peut se faire durant les phases G1, S ou G2. Puis, suivant la gravité des lésions, leur étendue et leur position sur les brins d'ADN, les conséquences pour la cellule seront différentes (Figure 18) :



- Si les lésions sont peu importantes, la cellule va réparer ces dommages. Différents systèmes de réparation sont possibles selon le type de lésion. Si la réparation est fidèle, l'effet de l'irradiation est nul. Par contre, une absence de réparation ou une réparation incorrecte conduisent à une accumulation des lésions dans l'ADN. Ces lésions, si elles touchent la partie codante d'un gène, peuvent être à l'origine d'une mutation. D'autres lésions plus graves et plus nombreuses ou induites par la réparation peuvent également modifier la morphologie des chromosomes et induire des aberrations chromosomiques. Les conséquences des mutations ou aberrations chromosomiques non réparées sont de trois types :
  - Les mutations sont trop importantes et entraînent des dommages graves pour la cellule, incompatibles avec sa survie. La cellule sera alors éliminée soit par apoptose soit par le système immunitaire.
  - Les mutations ou aberrations chromosomiques entraînent chez la cellule une perte de la faculté de division. Les mutations ne sont pas transmises à la descendance. La mort de la cellule est différée.
  - La cellule mutée va se diviser et transmettre les mutations à ses cellules filles. Il y aura modification du patrimoine héréditaire transmis et induction à long terme d'une instabilité génétique qui peut conduire à un processus de cancérogénèse (Little 2000). Il reste à étudier si cette instabilité génétique peut également induire des effets génétiques (Figure 18).
- Si les lésions sont très importantes, non réparables, la cellule va mourir par apoptose ou, si la dose d'irradiation est très élevée, par nécrose. Les cellules endommagées ne meurent pas nécessairement immédiatement après irradiation mais peuvent entreprendre plusieurs cycles de division avant d'atteindre un seuil critique de dommages (Les lésions dues à l'irradiation sont à l'origine d'autres dommages pendant la division cellulaire).



Les différents mécanismes moléculaires conduisant la cellule, de la détection des dommages après irradiation, à la réparation ou l'apoptose seront traités dans le chapitre 2, intitulé « L'apoptose radio-induite ».

#### 4.2.2. Effets cytotoxiques des radiations ionisantes

##### ➤ Mort clonogénique - Apoptose

Les premières études consacrées à la mort cellulaire radio-induite différenciaient la mort interphasique de la mort mitotique ou reproductive (Hall 1978). La distinction entre ces deux phénomènes est basée sur le moment de la survenue de la mort cellulaire. La mort interphasique est le résultat des lésions irréversibles des structures cellulaires et intervient avant la première mitose suivant l'irradiation. Au contraire, la mort mitotique survient lors de la mitose ou après plusieurs divisions cellulaires. Aujourd'hui, on parle plutôt de mort immédiate et de mort clonogénique, pour définir la mort cellulaire radio-induite (Verheij et Bartelink 2000). La mort

proprement dite, immédiate est caractérisée par l'arrêt de toute fonction cellulaire et la perte de l'intégrité physique de la cellule. La mort clonogénique se définit comme la perte irréversible de la capacité de division de la cellule. Cette définition a surtout un sens, en radiothérapie où le but est de supprimer la capacité de reproduction et d'extension locale ou à distance des cellules tumorales. Cette perte de clonogénicité équivalente à une mort fonctionnelle de la cellule semble expliquer les différences de survie après irradiation pour un grand nombre de lignées cellulaires humaines, normales ou tumorales. La radiosensibilité des cellules est donc liée au taux de survie clonogénique. Les facteurs les mieux corrélés à l'induction de mort clonogénique sont le taux de cassures double brin de l'ADN résiduelles, non ou mal réparées, et le taux d'aberrations chromosomiques radio-induites (Dikomey *et al.* 1998).

Ces deux circonstances -mort immédiate et mort clonogénique- peuvent faire intervenir soit l'apoptose soit la nécrose (Nakano et Shinohara 1994). Il est généralement établi que les hautes doses d'irradiation sont à l'origine d'une mort immédiate par nécrose alors que les faibles doses induisent l'apoptose (Lennon *et al.* 1991). L'apoptose spontanée après irradiation peut être observée dans tous les tissus. En effet, le nombre de cellules apoptotiques augmente en fonction de la dose d'irradiation. De plus, certains travaux suggèrent qu'une apoptose tardive est responsable de la mort clonogénique (Yanagihara *et al.* 1995, Held 1997). En outre, l'apoptose survenant immédiatement après l'irradiation joue aussi un rôle dans la mort clonogénique puisque le nombre de cellules potentiellement clonogéniques diminue significativement si elles sont éliminées par apoptose avant la division cellulaire. Donc, l'apoptose intervient à la fois dans la mort immédiate et dans la mort clonogénique. La modulation de l'induction d'apoptose dans les cellules a d'ailleurs un effet sur la radiosensibilité. Radford *et al.* ont proposé que l'apoptose spontanée est induite par les cassures de brins tandis que l'apoptose retardée est due aux dommages chromosomiques (Radford *et al.* 1994).

La nécrose peut également contribuer à la perte de clonogénicité. Il a été montré que des lymphocytes de souris, irradiées aux neutrons présentent une perte de

clonogénicité due à l'induction de nécrose puisque les taux d'apoptose mesurés ne peuvent expliquer la diminution de la survie clonogénique (Holl *et al.* 2000)

➤ **Notion d'efficacité biologique relative (EBR)**

Pour évaluer les effets biologiques d'un type de rayonnement par rapport à un autre, la notion d'efficacité biologique relative (EBR) a été introduite. L'EBR d'un type de radiation donné est définie par le rapport entre la dose du rayonnement standard (rayons  $\gamma$ ) et la dose du type de radiation testé, nécessaires pour produire le même effet biologique. L'effet biologique considéré peut être la mort cellulaire, l'induction de lésions de l'ADN, les aberrations chromosomiques produites par les radiations, etc. L'EBR dépend de l'importance de la dose absorbée, mais aussi de la qualité du rayonnement et de l'effet biologique pris en considération (Gueulette 1997, Pouget et Mather 2001). Elle varie également selon le type cellulaire.

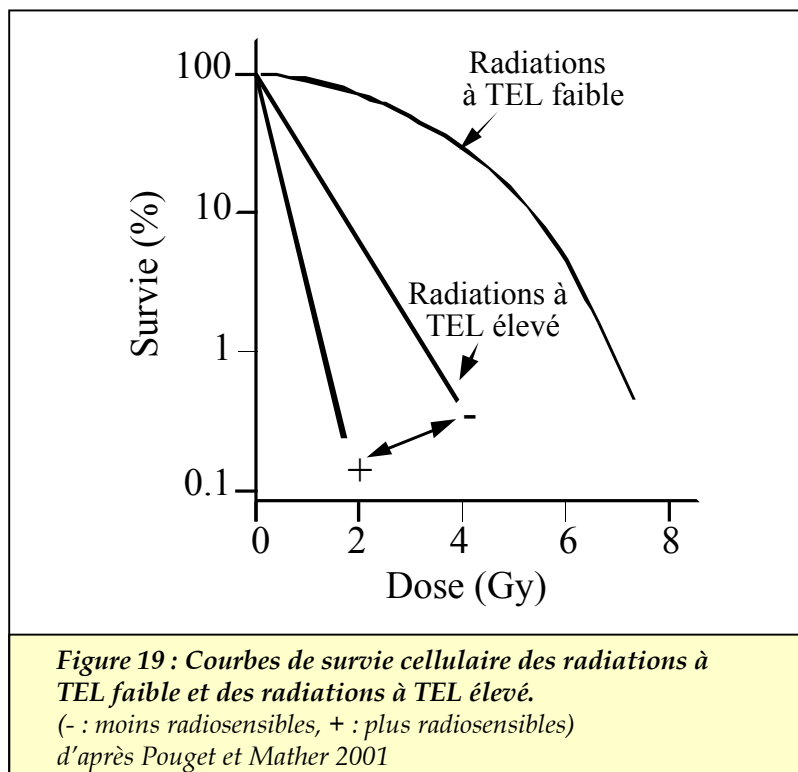
De plus, il est important de connaître l'EBR vis-à-vis des tissus sains si l'on veut évaluer l'avantage clinique d'un type de rayonnement. Pour qu'un rayonnement soit efficace, il faut une augmentation de l'effet différentiel : à la même dose, l'effet biologique doit être plus élevé sur les cellules tumorales que sur les cellules saines. L'EBR des radiations pour la tumeur doit être supérieure à celle pour les cellules saines. En effet, il n'y a pas de sélectivité des radiations ionisantes vis-à-vis des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Cependant, les cellules saines ont dans la majorité des cas, un pouvoir de réparation supérieur aux cellules tumorales.

➤ **Létalité cellulaire et TEL**

Plusieurs études ont mis en évidence une diminution de la survie des cellules tumorales plus importante après irradiation par des radiations à TEL élevé (Mustonen *et al.* 1999, Persson *et al.* 2002, Matsui *et al.* 2004). Ainsi Suzuki *et al.* ont

déterminé pour les ions carbone, une EBR de 2 - 3 en prenant comme critère une diminution de la survie de différentes lignées cellulaires de 10% (Suzuki *et al.* 2000). Pour le même effet biologique, l'EBR des neutrons est d'environ 2,5 pour des cellules de lymphomes (Aref *et al.* 1999).

Ces EBR peuvent être expliquées par le fait que les radiations à TEL élevé induisent pour une même dose, un plus grand nombre de lésions létales que les radiations à TEL faible (Radford 2002). Par conséquent les courbes de survie de ces rayonnements présenteront un profil différent (Figure 19). En effet, les radiations à TEL élevé ne présentent pas d'épaulement de la courbe pour les faibles doses d'irradiation par comparaison avec les radiations à TEL faible (Zoetelief et Barendsen 1983). Ces dernières induisent à des doses faibles d'irradiation, principalement des dommages sublétaux qui peuvent être réparés. A des doses plus élevées, plusieurs lésions sublétales sont produites. Elles peuvent aboutir à une lésion létale qui induit la mort de la cellule. L'épaulement de la courbe de survie correspond à la réparation des dommages sublétaux (Goodhead 1999, Pouget et Mather 2001).



Il a également été montré que les ions lourds ainsi que les neutrons induisent un taux d'apoptose plus important que les rayons X ou  $\gamma$  (Iwadate *et al.* 2001, Hendry *et al.* 1982, Tsuchida *et al.* 1998, Wang *et al.* 2001, Fujikawa *et al.* 2000). L'apoptose induite semble dépendre du TEL des radiations (Aoki *et al.* 2000). Toutefois, d'autres équipes ont obtenu des résultats opposés, notamment avec des lymphocytes normaux, où l'EBR des neutrons pour l'induction d'apoptose est proche de l'unité (Vral *et al.* 1998). Une EBR de 1 a également été mesurée pour l'apoptose induite par des neutrons dans des thymocytes de souris (Warenius et Down 1995). Ces études contradictoires ont toutes été réalisées avec des cellules saines du système immunitaire, qui sont connues pour leur radiosensibilité aigue. Ainsi, les radiations à TEL élevé ne vont pas conduire à une apoptose plus importante pour des cellules qui sont déjà très sensibles aux rayons X.

Par contre, vis-à-vis des cellules plus radiorésistantes, les rayonnements à TEL élevé ont montré leur efficacité. En effet, ils peuvent provoquer la mort des cellules tumorales résistantes à d'autres formes de traitement (Takahashi *et al.* 1998). De même, les tumeurs résistantes à la chimiothérapie présentent une résistance aux photons mais sont sensibles aux neutrons (Britten *et al.* 1990, Aref *et al.* 1999).

#### ➤ Influence du cycle cellulaire sur la mort cellulaire radio-induite

Le statut physiologique de la cellule change durant sa progression dans le cycle cellulaire. La phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule lors de l'irradiation va modifier sa sensibilité aux radiations ionisantes. Les phases M et G2 sont considérées comme étant les plus sensibles à l'irradiation, tandis que la phase S tardive est relativement radiorésistante (Rubin *et al.* 1989, Iliakis et Okayasu 1990). Les phases G1 et S précoce présentent des radiosensibilités intermédiaires.

Cependant, l'influence du cycle cellulaire dans la radiosensibilité diminue pour les radiations à TEL élevé. Ceci peut en partie expliquer l'efficacité des radiations à TEL élevé pour l'induction d'apoptose par rapport aux photons.

Comme l'irradiation affecte préférentiellement les cellules situées dans une phase radiosensible du cycle, la fraction survivante contiendra un nombre plus important de cellules en phase radiorésistante que la population initiale. Ce phénomène intervient lors d'irradiations fractionnées. Lorsque les cellules tumorales prolifèrent peu, les cellules ne pourront pas se redistribuer dans toutes les phases du cycle et retrouver la radiosensibilité de la population initiale. La population tumorale sera alors plus radiorésistante (Pawlik et Keyomarsi 2004). Plus le nombre de fractions d'irradiations est élevé, plus la radiorésistance acquise est importante, ce qui explique que certaines radiothérapies échouent sur des tumeurs à prolifération lente. Les radiations à TEL élevé, qui ont une moindre dépendance vis-à-vis du cycle cellulaire, peuvent dans ce cas apporter un bénéfice pour la destruction de ces tumeurs (Gueulette 1997).

### **4.3. Effets tissulaires des radiations ionisantes**

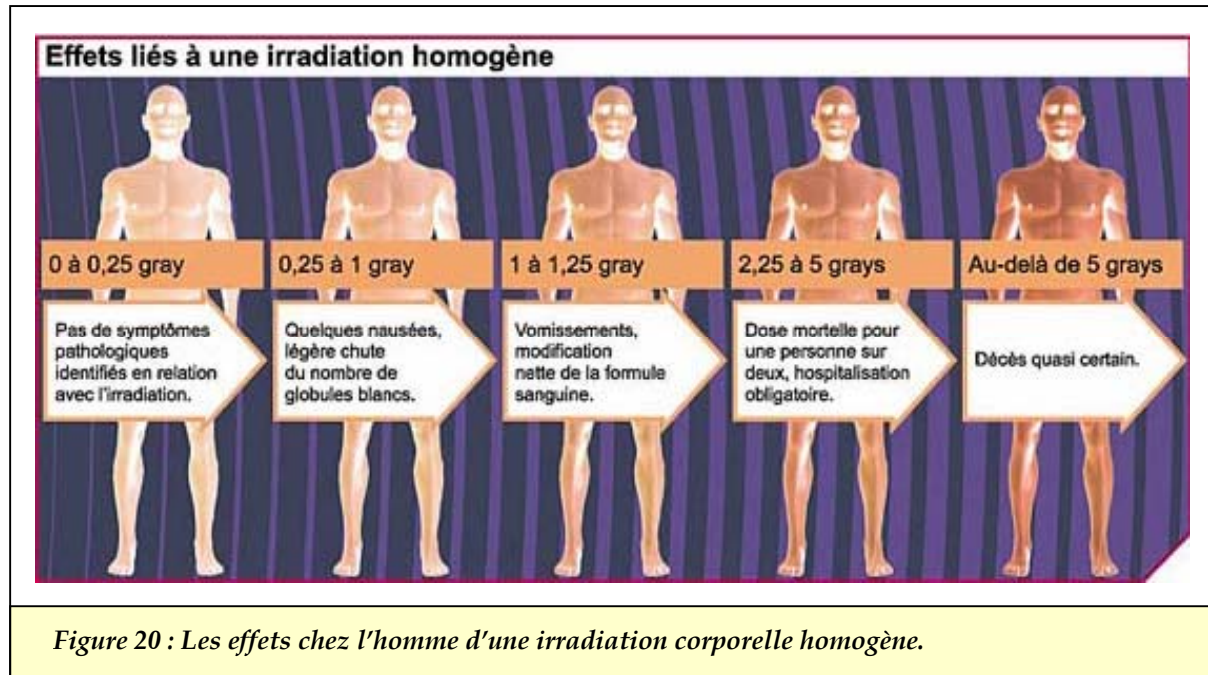
#### 4.3.1. Effets déterministes et probabilistes

Les effets tissulaires des radiations ionisantes et par conséquent les effets organiques et cliniques sont l'expression des dommages cellulaires. Les radiations ionisantes vont léser ou détruire les cellules. Plus le nombre de cellules endommagées dans le tissu est élevé, plus les effets tissulaires seront marqués (McBride *et al.* 2004). Ces effets dépendent donc de l'importance de la dose d'irradiation.

Après irradiation, les tissus peuvent être restaurés dans leur état initial, lorsque les dommages cellulaires sont réparés ou lorsque le tissu possède une réserve de cellules souches progénitrices, qui vont compenser les pertes du tissu. En revanche, à partir d'un certain seuil d'exposition, des lésions tissulaires peuvent survenir, lorsqu'une quantité importante de cellules disparaît par mort cellulaire radio-induite, perturbant les mécanismes d'homéostasie tissulaire. Ces destructions massives de cellules constituant le tissu vont se traduire par un défaut de fonction des tissus irradiés. (Johnston *et al.* 2004, O'Sullivan et Levin 2003).

Ces effets tissulaires, que l'on qualifie de « déterministes », sont liés à la mort cellulaire et leur survenue est immédiate après irradiation. A de très fortes doses d'irradiation et selon le type de tissu lésé, ils peuvent entraîner la mort de l'individu. La DL50 pour l'homme est de 5 Gy en irradiation unique (Figure 20).

Ce sont ces effets déterministes qui sont recherchés en radiothérapie pour la destruction des tissus tumoraux.



Les effets « probabilistes » des radiations ionisantes, observés habituellement à des doses plus faibles, sont tardifs et liés à des transformations cellulaires. Ils sont la conséquence de lésions initiales qui n'ont pas causé la mort des cellules mais qui ont conduit à des mutations cellulaires ou des aberrations chromosomiques après réparation défectueuse des lésions induites. Ces transformations cellulaires peuvent à long terme induire le déclenchement de cancers. L'apparition d'un cancer radio-induit survient généralement plusieurs années après l'exposition aux radiations (Wakeford 2004). Si les transformations cellulaires induites par les mutations touchent les cellules germinales, des effets génétiques sur la descendance peuvent être observés.



#### 4.3.2. Facteurs influençant les effets tissulaires

Les effets tissulaires induits par les radiations ionisantes dépendent de la radiosensibilité intrinsèque des tissus (Fertil *et al.* 1982). La proportion de cellules qui meurent par apoptose après irradiation est très variable selon le type cellulaire.

De manière générale, les tissus les plus sensibles sont ceux qui se divisent activement.

Dans un premier temps, il faut différencier les tissus sains des tissus tumoraux. La mort cellulaire apparaît surtout lors du déroulement du cycle de reproduction cellulaire. Ainsi, les cellules normales présenteront une radiosensibilité plus faible par rapport aux cellules tumorales, qui se divisent plus rapidement.

De plus, que les tissus soient sains ou tumoraux, des différences de radiosensibilité sont également observées selon le type de tissu concerné, en fonction de la vitesse de renouvellement des cellules du tissu. En effet, les tissus les plus sensibles aux radiations ionisantes sont les tissus à renouvellement rapide et comportant des cellules immatures progénitrices. Ces particularités tissulaires tiennent à deux paramètres : l'aptitude propre de chaque lignée cellulaire à réparer les lésions moléculaires induites et la capacité de chaque tissu à mobiliser ses réserves de cellules immatures ou à recruter des cellules d'origine extérieure pour assurer la fonction de cellules progénitrices.

L'apoptose radio-induite est fréquemment observée dans les tissus pour lesquels elle joue un rôle physiologique important, comme les cellules souches de la moelle osseuse, les cellules intestinales et les lymphocytes (Wilkins *et al.* 2002). A l'inverse, pour les fibroblastes, les cellules hépatiques ou les cellules nerveuses, la radiosensibilité intrinsèque est plus faible. De même, il a été rapporté que les cellules tumorales d'origine épithéliale ou les cellules de lymphome sont plus sensibles à l'irradiation que les cellules de mélanome ou de glioblastome.

Par ailleurs, la différenciation influence aussi la sensibilité des cellules aux radiations. Plus les cellules sont différenciées, plus leur radiosensibilité diminue.

Les radiations à TEL élevé modifient la radiosensibilité relative intrinsèque des tissus en comparaison avec les rayons X ou  $\gamma$ . L'équipe de Takahashi a mis en évidence une valeur d'EBR de 3 pour l'induction d'apoptose par les ions carbone dans des cellules de glioblastome résistantes aux rayons X (Takahashi *et al.* 1998). Ainsi la radiosensibilité intrinsèque de ces cellules est augmentée par l'utilisation des ions carbone.

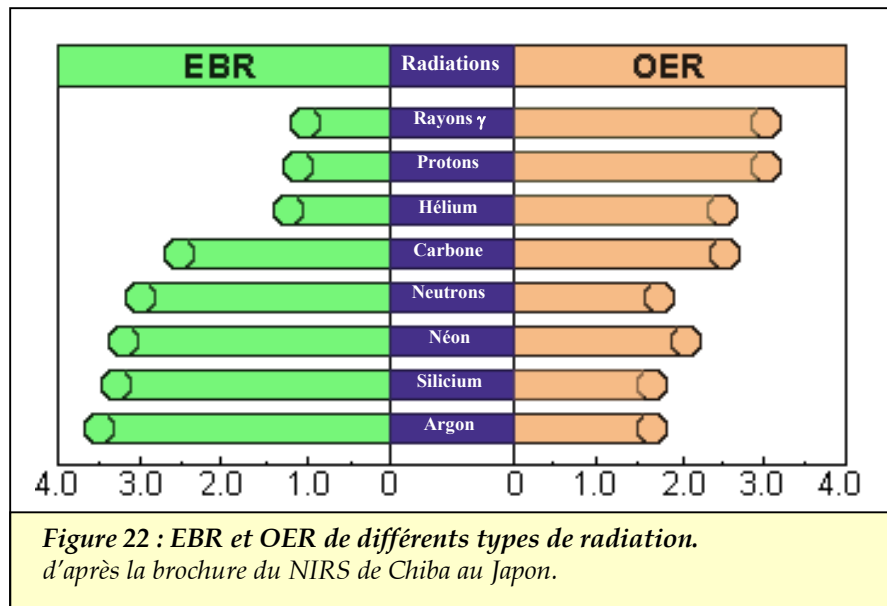
## 5. Hadronthérapie : avantages et clinique

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les effets des radiations ionisantes à TEL élevé diffèrent de ceux des radiations à TEL faible et ceci à tous les niveaux d'interaction des radiations avec la matière vivante : physique, physico-chimique, cellulaire et tissulaire. Ces radiations, et plus particulièrement les neutrons et les ions lourds, présentent par rapport aux rayons X ou  $\gamma$ , des avantages radiobiologiques variés qui sont récapitulés dans la Figure 21.

- ♦ Dommages induits plus complexes et moins facilement réparables → AUGMENTATION DE L'E<sub>BR</sub>
- ♦ Diminution de l'effet oxygène → REDUCTION DE L'O<sub>ER</sub>
- ♦ Baisse de la dépendance vis-à-vis du cycle cellulaire
- ♦ Modification de la radiosensibilité intrinsèque des tissus
- ♦ Pour les IONS LOURDS : meilleur ciblage de la tumeur et diminution des dommages des tissus sains avoisinants (Pic de Bragg)

Figure 21 : Avantages des radiations à TEL élevé par rapport aux radiations à TEL faible.

En conclusion, les radiations à TEL élevé sont donc plus efficaces que les rayons X ou  $\gamma$  pour induire la mort des cellules cancéreuses. Tous ces avantages, surtout l'augmentation de l'E<sub>BR</sub> ainsi que la réduction de l'O<sub>ER</sub>, montrent l'intérêt de l'utilisation de tels rayonnements en radiothérapie (Figure 22, Orecchia *et al.* 1998).



La radiothérapie qui utilise des protons, des neutrons rapides ou des ions lourds est qualifiée d'hadronthérapie, les hadrons étant les particules du noyau des atomes. Actuellement, la plupart des centres d'hadronthérapie traite les cancers par des protons. Mais l'utilisation des neutrons rapides et des ions lourds est en développement.

- La neutronthérapie

Les données sur la neutronthérapie sont peu abondantes. Aujourd'hui, seule une dizaine de centres traite des patients avec des neutrons rapides. Toutefois, des résultats probants ont été obtenus pour le traitement de certaines classes de cancers : des tumeurs des glandes salivaires (Douglas *et al.* 2003), des tumeurs des sinus paranasaux, des cancers avancés de la prostate (Scalliet *et al.* 2001) et certains sarcomes (Schwarz *et al.* 1996). La neutronthérapie vise plus particulièrement les tumeurs inopérables et très résistantes aux autres traitements (Breteau *et al.* 1996, Noel *et al.* 2003).

- L'hadronthérapie avec des ions lourds

La production d'ions lourds nécessite la présence de synchrotrons, qui sont des installations lourdes et de grande taille. L'HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) au Japon est le premier accélérateur d'ions lourds médical dédié au traitement

des cancers, avec plus de 1400 patients irradiés depuis 1994 exclusivement par ions carbone (Figure 23). Le GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung) de Darmstadt en Allemagne traite également des patients avec les ions carbone.

Les résultats obtenus confirment le gain thérapeutique des ions lourds, qui combinent à la fois les propriétés balistiques des particules chargées et des propriétés radiobiologiques analogues aux neutrons (Orecchia *et al.* 2004, Kraft *et al.* 1998). Ils justifient les projets européens actuels de création de centres médicaux dédiés au traitement des cancers par hadronthérapie, et notamment en France, le projet ETOILE (Pommier *et al.* 2002, Heeg *et al.* 2004). Les indications de la radiothérapie par ions lourds sont : les cancers de la région tête et cou, du fait de la haute précision balistique nécessaire : les tumeurs de la base du crâne comme les chondrosarcomes et les carcinomes (Schulz-Ertner *et al.* 2004), les tumeurs méningées non opérables, les tumeurs des sinus de la face, les cancers de l'oesophage (Sudhamshu *et al.* 2003), les tumeurs de la thyroïde, et les cancers des glandes salivaires, mais aussi d'autres tumeurs radio-résistantes comme les cancers de la prostate (Akakura *et al.* 2004), les cancers du poumon et les sarcomes des os.

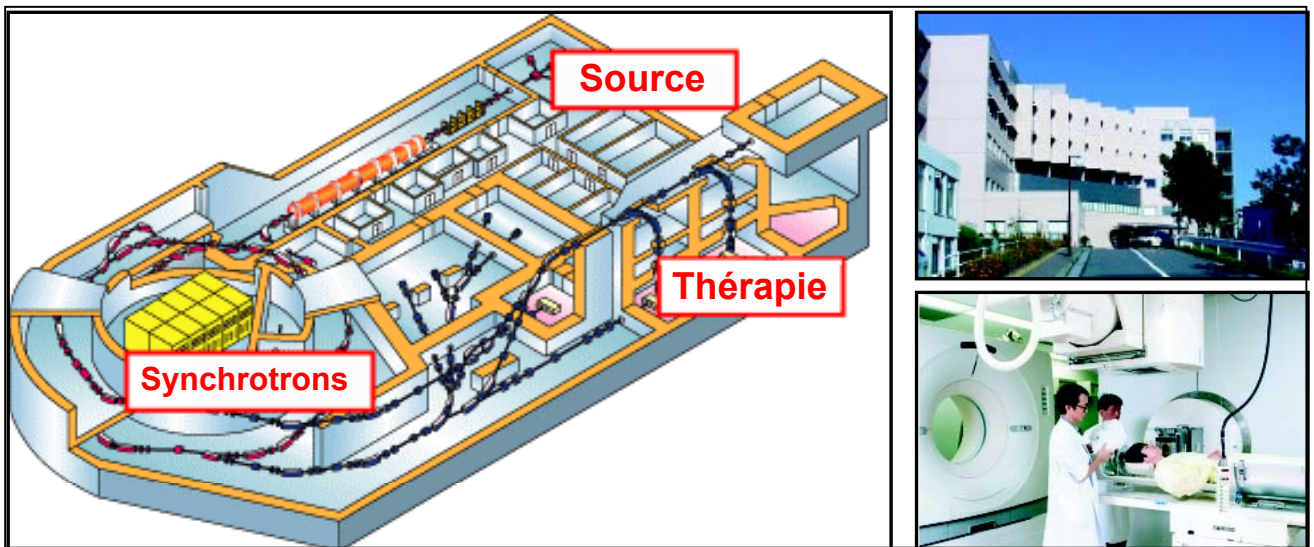


Figure 23 : L'HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) du NIRS (National Institute of Radiological Sciences) de Chiba au Japon. A gauche : Schéma de l'accélérateur de particules. A droite : Vues de l'hôpital du NIRS où les patients sont traités par des ions carbone. d'après la brochure du NIRS de Chiba au Japon.

En conclusion, les radiations ionisantes à TEL élevé sont plus efficaces pour induire la mort des cellules, à cause des dommages complexes qu'ils induisent au niveau de l'ADN. Ces dommages étant qualitativement et quantitativement différents de ceux induits par les radiations à TEL faible, on peut s'attendre à ce que les mécanismes cellulaires conduisant à l'apoptose diffèrent suite à une irradiation par des rayonnements à TEL élevé (Wang *et al.* 2001). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation apoptotique induites par les neutrons rapides et les ions carbone.

## Chapitre 2

### **L'APOPTOSE RADIO-INDUITE**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus mettant en jeu un certain nombre de systèmes de régulation et jouant un rôle fondamental dans l'élimination des cellules superflues ou endommagées. Les radiations ionisantes peuvent provoquer la mort des cellules par apoptose. Les mécanismes biochimiques conduisant des dommages cellulaires infligés par les rayonnements à l'induction de cette mort cellulaire sont très complexes. De nombreuses études portent sur les différentes voies de signalisation apoptotiques activées suite à une irradiation. Cependant la plupart de ces travaux concerne uniquement les rayons X ou  $\gamma$ . Il existe peu d'informations sur l'induction d'apoptose par les radiations à TEL élevé.

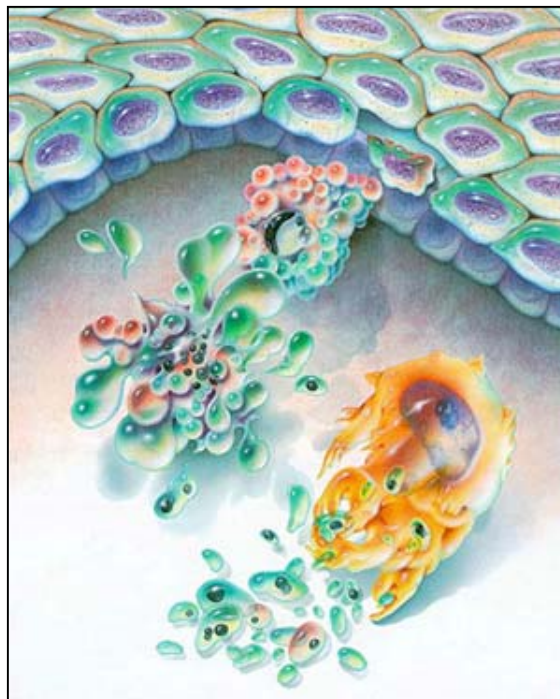
Aussi, dans ce chapitre, nous décrirons dans une première partie le processus de l'apoptose. Nous évoquerons les rôles physiologiques ainsi que les principaux effecteurs de la réponse apoptotique. Puis nous aborderons les mécanismes biochimiques et moléculaires, qui conduisent à l'apoptose après une exposition aux rayons X ou  $\gamma$ .

#### **1. Généralités sur l'apoptose**

##### **1.1. Définition**

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort.

L'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte, de façon opposée à la mitose. La mort cellulaire « normale » a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Weber 1964, Lockshin et Zakeri 2001). En 1972, Kerr *et al.* ont décrit une mort cellulaire du même type dans divers tissus et types cellulaires : ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (Kerr *et al.* 1972). Ils ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé « apoptose » (Figure 24). Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne. L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires (Steller 1995, Cikala *et al.* 1999).



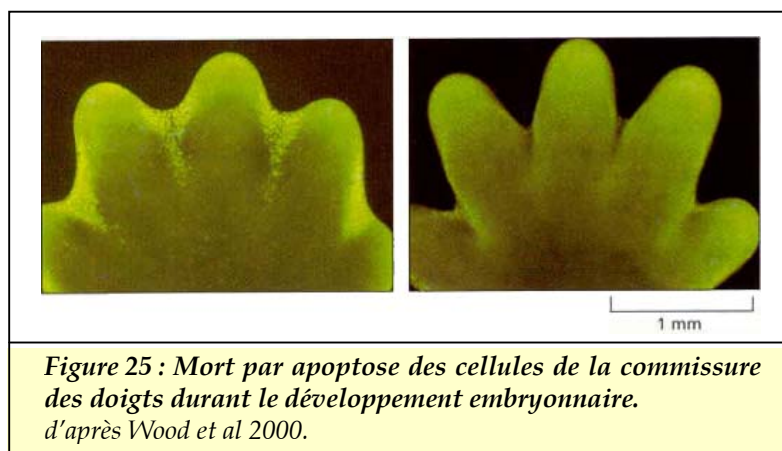
**Figure 24 : Cellules en apoptose.** Après la vésiculation du cytoplasme, il y a formation des corps apoptotiques qui sont phagocytés par un macrophage (en orange).

d'après [http://spacebio.net/modules/gs\\_teare.html](http://spacebio.net/modules/gs_teare.html)

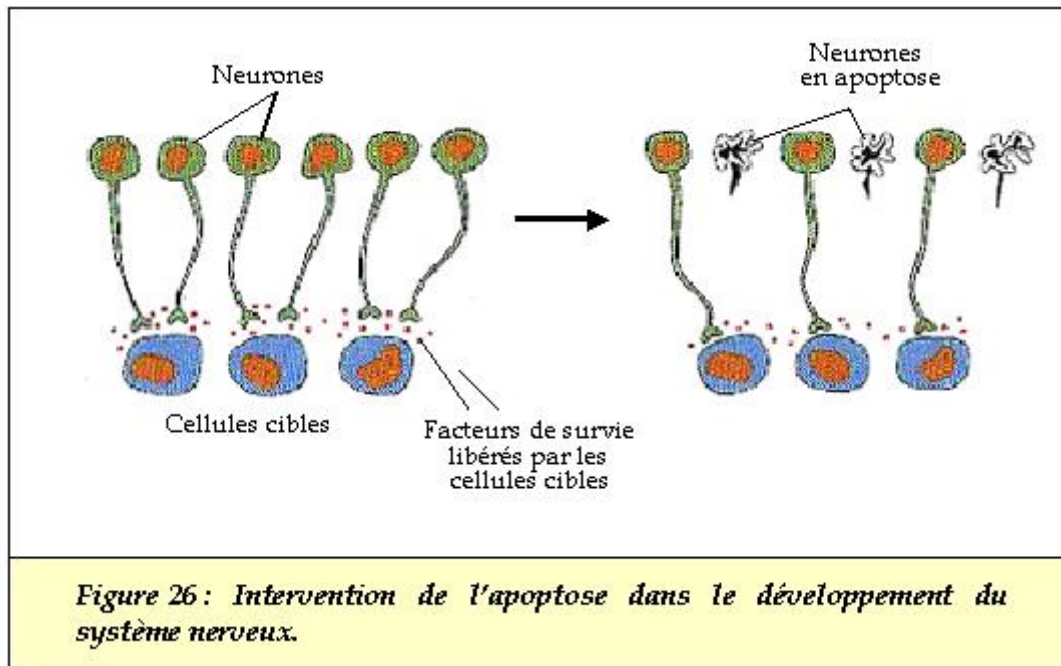


## 1.2. Rôles de l'apoptose

L'apoptose est essentielle au développement de l'organisme. Elle permet l'élimination de structures inutiles ou mal formées. Elle participe notamment à la morphogénèse des doigts : les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose (Figure 25, Wood *et al.* 2000). De même, au cours du développement des amphibiens, l'augmentation des quantités d'hormones thyroïdiennes circulantes induit l'apoptose des cellules de la queue et fait disparaître cet organe (Nishikawa et Hayashi 1995).



La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose, où elle assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencie. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès, 20 à 80% de ces cellules vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre ces neurones et les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (nerve growth factor), produit par les cellules cibles des neurones (Clarke *et al.* 1998). Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible. Les autres cellules, incapables de recevoir ce signal, vont mourir par apoptose en raison de leur mise en place incorrecte (Figure 26). De même, pour le développement du système immunitaire, seuls les lymphocytes portant des récepteurs aux antigènes spécifiques vont survivre. Le reste sera éliminé par apoptose.



L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil *et al.* 1999) ou à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent par apoptose, de même que les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs.

Donc, l'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques. En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif, par des altérations génétiques, par la maladie, par un choc thermique ou par l'exposition à des agents génotoxiques (chimiothérapie et radiothérapie). Elle permet le bon fonctionnement du système immunitaire, les cellules infectées par des virus ainsi que les cellules tumorales étant détruites par apoptose, par les lymphocytes T cytotoxiques.

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, on comprendra aisément que des dérèglements de ce processus ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies (Follezou *et al.* 1999).

Ainsi, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson 2004), la sclérose latérale amyotrophique (Sathasivam *et al.* 2001) ou la maladie de Parkinson (Tatton *et al.* 2003). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale. De même, le virus de l'immunodéficience humaine active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (TH) nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus (Roshal *et al.* 2001).

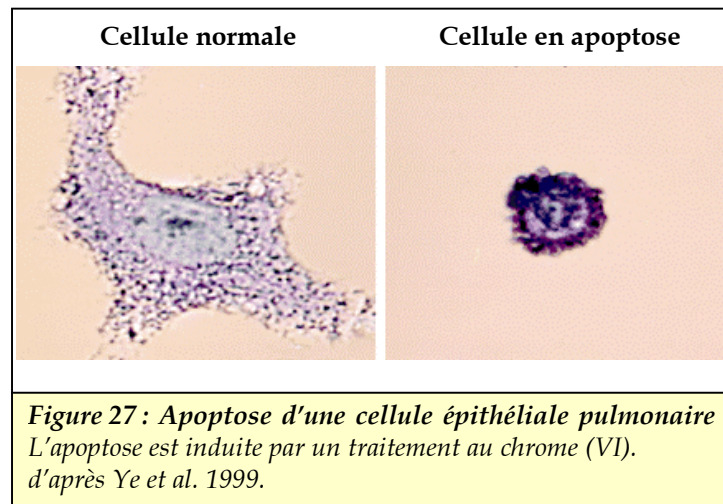
Un déficit de l'apoptose peut aussi causer diverses affections telles que les maladies autoimmunes (arthrite rhumatoïde) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules autoimmunes réactives. Une absence d'apoptose peut également favoriser la survie et la croissance de cellules anormales, normalement destinées à mourir, et ainsi induire des processus de cancérogénèse (Thompson 1995, Reed 1999). Certaines cellules cancéreuses ont d'ailleurs développé des mécanismes de résistance aux processus physiologiques de l'apoptose (Igney et Krammer 2002).

### **1.3. Description de l'apoptose**

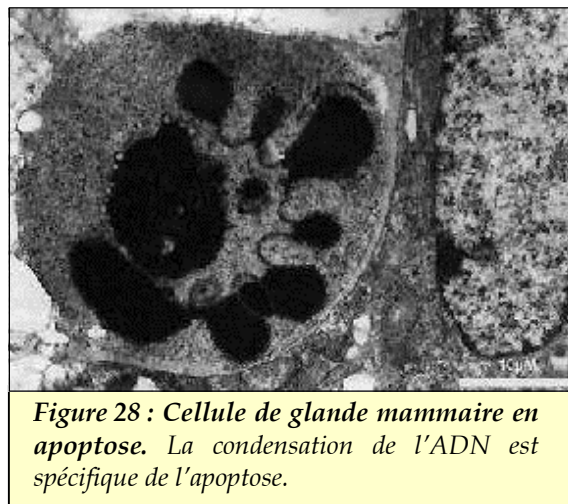
#### **1.3.1. Caractéristiques morphologiques**

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire.

Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire : la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui résulte en une modification de la forme et de la taille cellulaire (Figure 27). Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose.



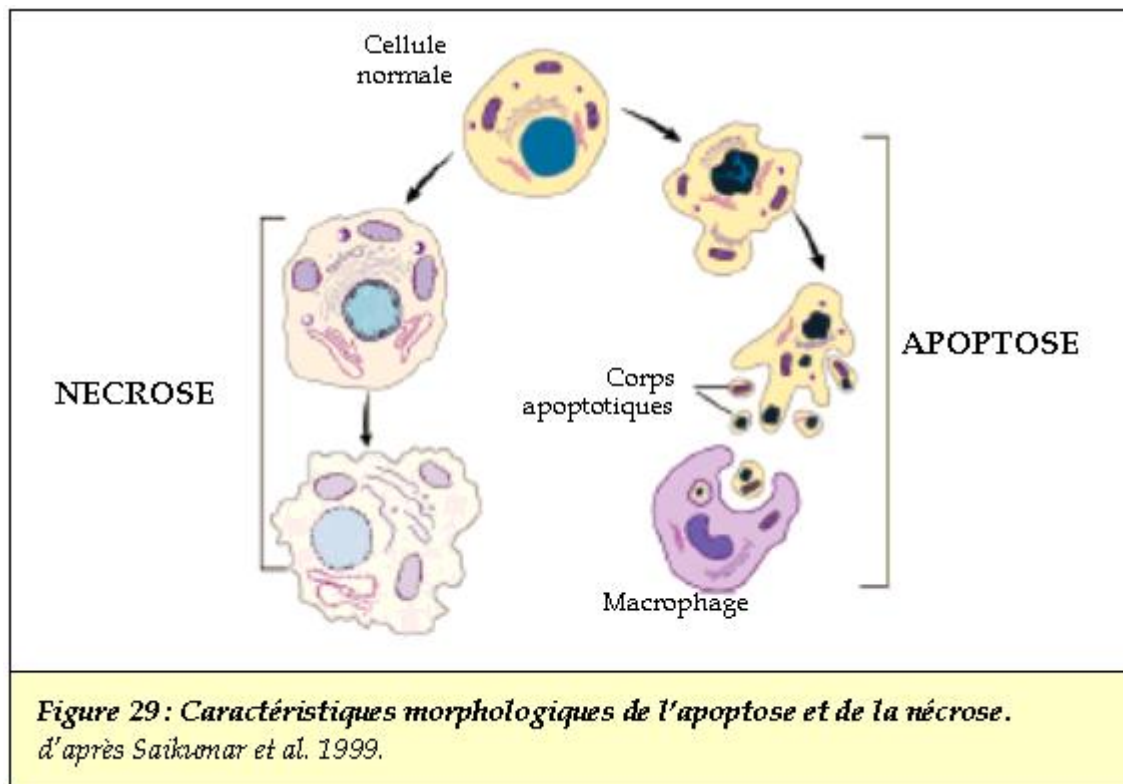
Le noyau présente lui aussi des modifications : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire (Figure 28). Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes.



Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques, entourés de membrane plasmique (Figure 29). Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques, qui sont libérés dans le milieu.

Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus

(Figure 24). En effet, la formation de corps apoptotiques avec une membrane plasmique intacte prévient le relargage des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire.



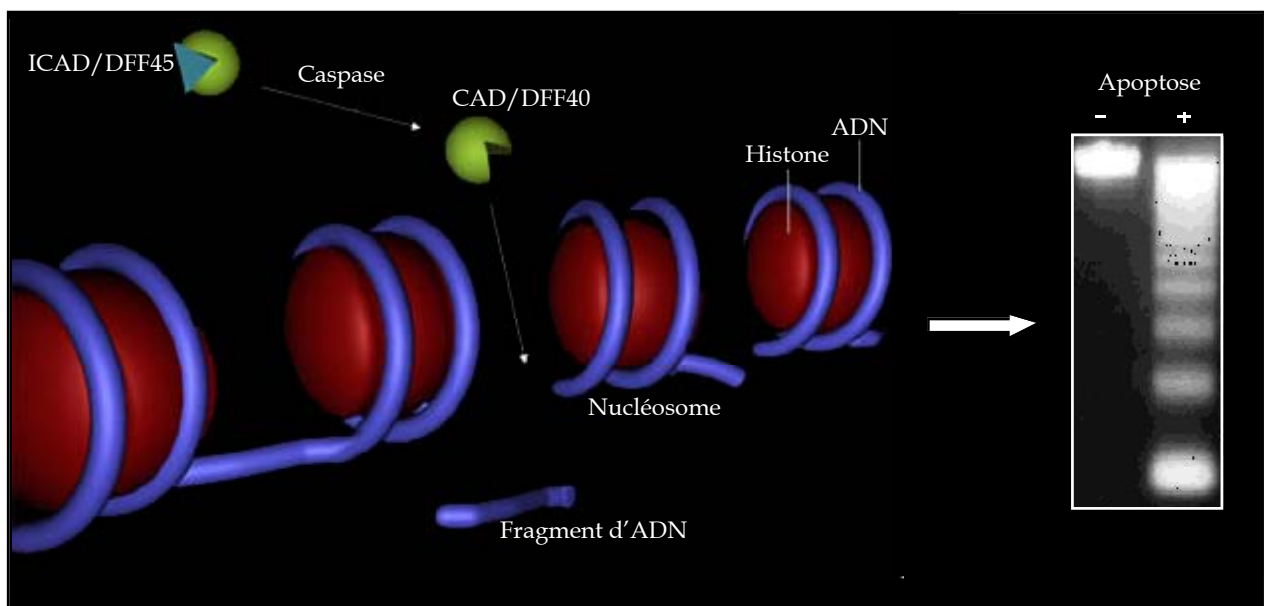
Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, qui aboutit à un éclatement de la cellule (Figure 29, Ziegler et Groscurth 2004). La nécrose survient accidentellement lorsque la cellule a subi des dommages importants, qui peuvent être produits par l'exposition à de très fortes doses d'agents cytotoxiques.

La mort nécrotique est un phénomène passif et catabolique caractérisé par une perméabilisation membranaire précoce et un gonflement de la cellule, suivi par la rupture de la membrane plasmique. Les constituants cytoplasmiques sont alors déversés dans le milieu extracellulaire et sont à l'origine d'une réaction inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, au cours de la nécrose, la chromatine n'est pas fragmentée mais lysée (karyolysis). De plus, les organites cellulaires sont détruits.

### 1.3.2 Caractéristiques biochimiques

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la fragmentation de l'ADN, qui survient lors de la condensation de la chromatine. Cette fragmentation peut être mise en évidence en analysant, par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN isolé de cellules en apoptose. Les résultats d'électrophorèse obtenus montrent plusieurs bandes, de taille équivalente à des multiples de 180 paires de bases, qui forment une « échelle d'ADN » (Figure 30). Ce profil n'est pas retrouvé lors de la nécrose où la dégradation de l'ADN est moins importante et induit des fragments de tailles hétérogènes.

Les fragments d'ADN réguliers, générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes.



**Figure 30 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose.** L'endonucléase CAD/DFF40 clive l'ADN entre les nucléosomes (à gauche) et génère des fragments réguliers qui forment une échelle d'ADN sur le gel d'agarose après électrophorèse (à droite).

Plusieurs études ont démontré que l'endonucléase CAD/DFF40 est responsable de ce clivage internucléosomal (Enari *et al.* 1998, Liu *et al.* 1997). En effet, cette

fragmentation endogène n'est pas observée dans les cellules déficientes en CAD/DFF40. Dans les cellules normales, CAD/DFF40 forme un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD/DFF45. Lors de l'apoptose, ICAD/DFF45 est clivé par la caspase-3 et se dissocie de CAD/DFF40 ce qui libère l'endonucléase active, qui migre dans le noyau (Sakahira *et al.* 1998, Tang et Kidd 1998). Une autre nucléase responsable de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose, la DNase II, a été récemment identifiée. La DNase II est une enzyme lysosomale présente dans les macrophages (Ferri et Kroemer 2000). Elle interviendrait, avec d'autres enzymes du lysosome, comme les cathepsines, dans une voie auxiliaire de fragmentation de l'ADN, initiée par les macrophages, au moment de la phagocytose des corps apoptotiques (Wu *et al.* 2000, McIlroy *et al.* 2000).

D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines, phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules normales, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules. Ceci permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok *et al.* 2000). De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines cellulaires sont dégradées. C'est le cas des lamines formant la membrane nucléaire ou de certaines protéines comme la fodrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette. Cette perte du cytosquelette induit la vésiculation membranaire.

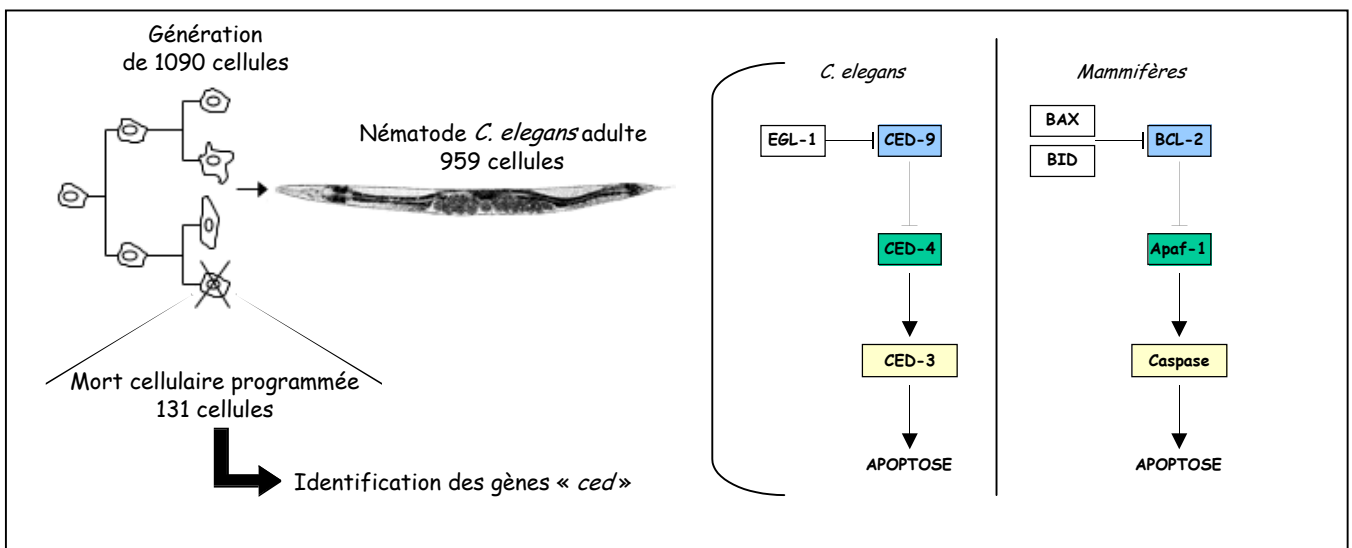
#### **1.4. Les principaux effecteurs de l'apoptose**

Les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose résultent de l'activation de mécanismes cellulaires complexes. Les différents gènes contrôlant ces mécanismes ont d'abord été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dont une partie des cellules est éliminée par apoptose durant le développement (Figure 31). L'analyse génétique de ces cellules a permis de mettre en

évidence trois gènes clés impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée : *ced-3*, *ced-4* et *ced-9*, *ced* pour *C. elegans death* (Hengartner et Horvitz (a) 1994). Les produits des gènes *ced-3* et *ced-4* sont requis pour le déroulement de l'apoptose, la protéine CED-3 étant une protéase et la protéine CED-4 une molécule pro-apoptotique pouvant se lier à CED-3.

Par contre, la protéine codée par *ced-9* a une fonction antagoniste à CED-3 et CED-4 et inhibe l'apoptose. Des homologues de ces gènes, ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose, ont été découverts chez les mammifères (Figure 31). Ainsi, l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 $\beta$  (ICE) des mammifères présente des homologies avec CED-3 et sa sur-expression est capable d'induire l'apoptose dans les cellules de mammifères (Yuan *et al.* 1993). Bien qu'elle ne semble pas jouer de rôle primordial dans l'apoptose et qu'elle soit plutôt impliquée dans le déroulement du processus inflammatoire, la protéine ICE a permis d'identifier une famille de protéases à cystéine, les caspases, qui sont responsables de l'exécution du processus apoptotique chez les mammifères.

De même, les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2, homologues de CED-9, sont des régulateurs de l'apoptose, ainsi que la protéine adaptatrice Apaf-1, homologue de CED-4, qui intervient dans l'activation des caspases (Hengartner et Horvitz, (b) 1994, Zou *et al.* 1997).



**Figure 31 : Apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et homologie avec les mammifères.**

Au cours du développement de *C. elegans*, 1090 cellules sont générées. Parmi ces cellules, 131 vont être éliminées par mort cellulaire programmée. Le ver « adulte » sera alors constitué de 959 cellules. La sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules pendant le développement a permis l'identification des gènes *ced* (*C. elegans death*). Des homologues de ces gènes ont également été découverts chez les mammifères.

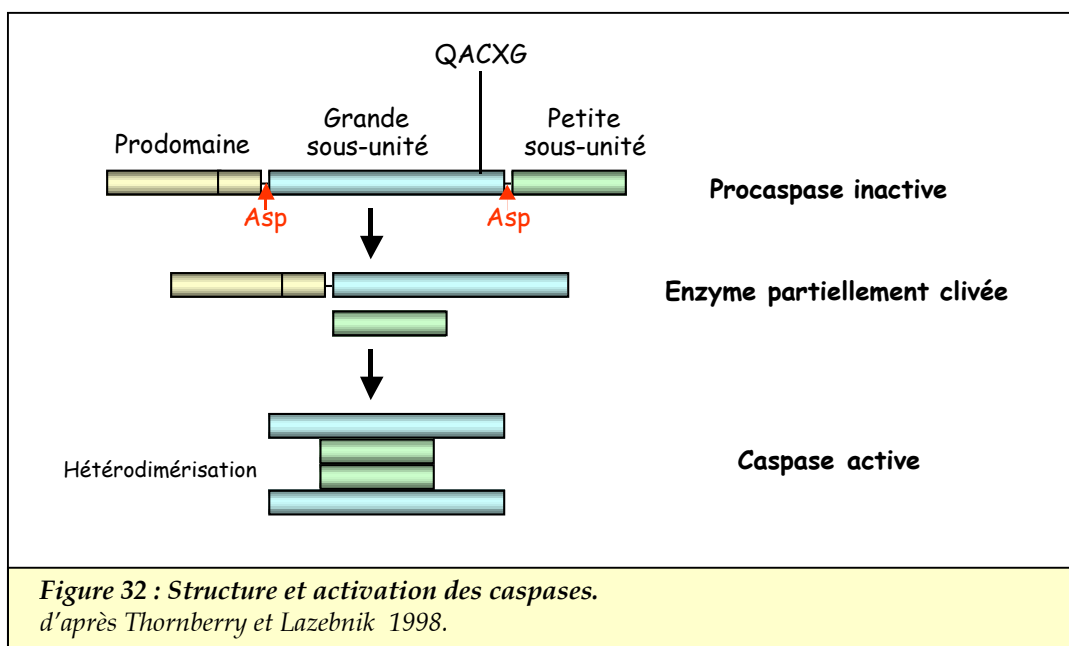


### 1.1.1. Les caspases

Les caspases sont les composants essentiels de la plupart des voies conduisant à la mort de la cellule par apoptose. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces (Boyce *et al.* 2004). A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14 ont été mises en évidence chez l'homme. Les caspases-11 et -12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris, et la caspase-13 est un homologue bovin de la caspase-4 (Koenig *et al.* 2001). Cependant, il existerait chez l'homme une « pseudo-caspase-12 » (Lamkanfi *et al.* 2004). Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat.

#### ➤ Principales caractéristiques et classification des caspases

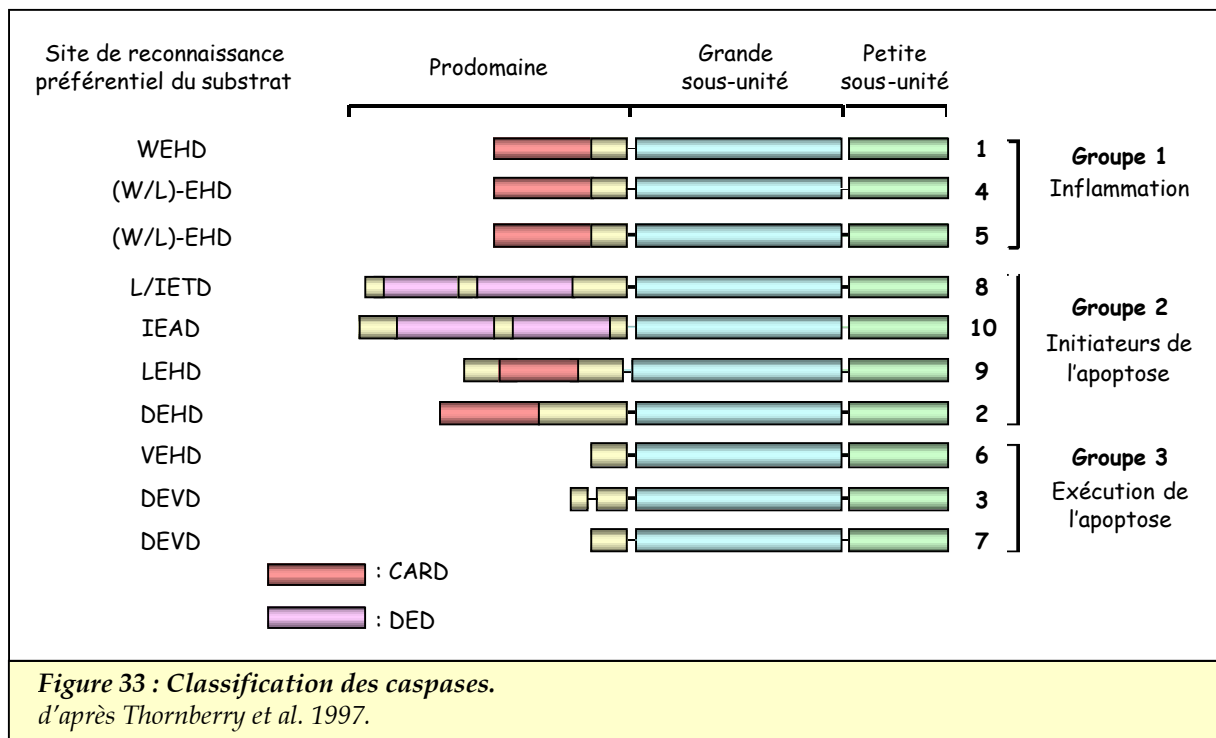
Les caspases sont exprimées sous forme de précurseurs inactifs ou procaspases, constitués de trois parties : un prodomaine à l'extrémité N-terminale, suivi d'une grande sous-unité p20 et d'une petite sous-unité p10 (Figure 32).



Le site actif de l'enzyme contenant la cystéine, au sein d'un motif très conservé QACXG, se situe au niveau de la grande sous-unité. L'activation des caspases nécessite un clivage entre les deux sous-unités et l'élimination du prodomaine suivis de l'assemblage des sous-unités en hétérodimère. Deux hétérodimères vont ensuite s'associer pour former la caspase active, qui possède deux sites actifs fonctionnant indépendamment l'un de l'autre. Les caspases sont des protéases hautement spécifiques, qui clivent leur substrat exclusivement après un résidu aspartate.

Parmi les protéases de mammifères, seul le granzyme B partage cette particularité. De plus, elles reconnaissent au niveau de leur cible une séquence consensus, constituée de quatre acides aminés situés en amont du site de clivage. Cette séquence de reconnaissance diffère selon les caspases et peut expliquer la diversité de leur fonction biologique (Thornberry *et al.* 1997). En outre, le propre site de clivage des caspases, séparant le pro-domaine de la grande sous-unité, contient également ce site spécifique de reconnaissance ainsi qu'un aspartate, ce qui leur permet de s'activer mutuellement.

Les caspases peuvent être subdivisées en trois grands groupes selon leur site spécifique de reconnaissance du substrat, selon leur structure ou selon leur fonction biologique. Cependant, mises à part les caspases-2 et -6, quel que soit le critère retenu, la classification obtenue reste la même (Figure 33).



Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5 qui contrôlent les réponses inflammatoires et ne jouent pas de rôle important dans l'apoptose. Leur substrat est caractérisé par la séquence WEHD. La caspase-14 est aussi une caspase « non apoptotique », puisqu'elle intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme (Mikolajczyk *et al.* 2004).

Les deux autres groupes sont constitués des caspases impliquées dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices et d'autre part les caspases effectrices. Les caspases initiatrices regroupent les caspases activées suite à des signaux extra- ou intracellulaires (-8, -9, -10). Elles possèdent généralement un long prodomaine contenant un des deux motifs caractéristiques : DED (caspases-8 et -10) ou CARD (caspases-9 et -2). Ces domaines permettent l'interaction avec d'autres protéines résultant ainsi en l'activation de ces caspases. Une fois activées, les caspases initiatrices vont à leur tour activer les caspases effectrices-3, -6 et -7. Ces dernières sont caractérisées par un prodomaine de petite taille et clivent un certain nombre de protéines dans la cellule.

Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices.

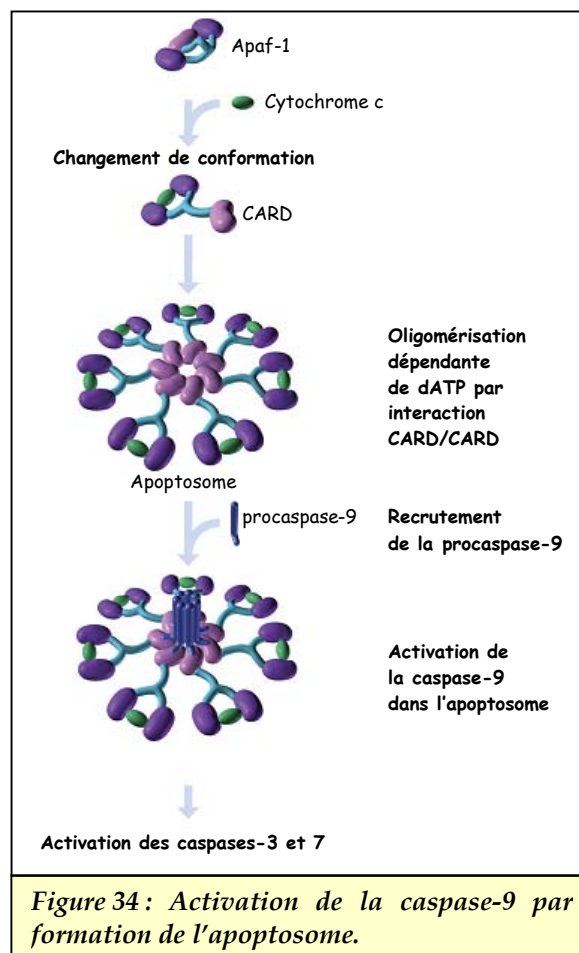
### ➤ L'activation des caspases

La cellule utilise plusieurs mécanismes distincts pour activer les caspases (Boatright et Salvesen 2003, Thornberry et Lazebnik 1998). Le plus simple appelé transactivation, consiste en l'activation des caspases par d'autres caspases. Ce mécanisme est utilisé pour l'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices et est à l'origine de la cascade de caspases, qui a également pour but d'amplifier le signal apoptotique. Les caspases effectrices peuvent aussi activer d'autres caspases, grâce à des systèmes de régulation rétroactifs (Van de Craen *et al.* 1999).

Les autres mécanismes d'activation concernent uniquement les caspases initiatrices. Ils sont provoqués par des interactions avec des protéines situées en amont dans la

signalisation apoptotique. Cette activation peut être due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs procaspases favorisant ainsi leur autoactivation (Muzio *et al.* 1998). Ceci a été observé pour la caspase-8 lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Algeciras-Schimmich *et al.* 2002). Ces récepteurs, une fois activés, sont à l'origine d'un regroupement de procaspases-8. Cette haute concentration locale de précurseurs ainsi que la présence d'une faible activité intrinsèque de ceux-ci leur permet de s'autoactiver. Les caspases-10 et -2 sont activées de façon similaire.

L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité régulatrice. C'est le cas de la caspase-9. Le clivage protéolytique de cette caspase n'est pas suffisant pour son activation. En effet, cette dernière nécessite l'interaction avec le cofacteur Apaf-1 (Rodriguez et Lazebnik 1999).



Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome, constitué de la caspase-9, d'Apaf-1 et du cytochrome c (Li *et al.* 1997,

Zou *et al.* 1999, Hill *et al.* 2003). La formation de ce complexe s'effectue en deux étapes et fait suite à la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme (Figure 34). On assiste d'abord à un changement de conformation d'Apaf-1, grâce à sa liaison avec le cytochrome c et à l'hydrolyse d'ATP (Hu *et al.* 1999, Purring-Koch et McLendon 2000). Puis, sept sous-unités d'Apaf-1 s'oligomérisent et recrutent par leur domaine CARD plusieurs procaspases-9 qui vont alors être activées (Srinivasula *et al.* 1998, Saleh *et al.* 1999, Acehan *et al.* 2002). En effet, Apaf-1 contient à son extrémité N-terminale, un domaine CARD qui est exposé lors de son changement de conformation (Zhou *et al.* 1999). L'apoptosome représente la forme active de la caspase-9 (Rodriguez et Lazebnik 1999).

### ➤ Les cibles des caspases

Les caspases-3, -6 et -7 clivent un certain nombre de protéines cibles ce qui est à l'origine des particularités biochimiques et morphologiques des cellules apoptotiques (Degterev *et al.* 2003). Plus de 100 substrats différents ont été découverts (Figure 35).

<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <b><u>Protéines régulatrices de l'apoptose</u></b>  <i>Pro-apoptotiques</i> : Caspases, BID, DFF45...  <i>Anti-apoptotiques</i> : BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, FLIP, XIAP, cIAP-1, RIP...</li> <li>◆ <b><u>Protéines de structure nucléaires ou cytoplasmiques</u></b>            Lamines A B et C, actine, kératine 18, β-caténine, gelsoline, fodrine...</li> <li>◆ <b><u>Régulateurs du cycle cellulaire</u></b>            p21, Rb, p27...</li> <li>◆ <b><u>Protéines de réparation</u></b>            PARP, Rad51, DNAPK, ATM...</li> <li>◆ <b><u>Protéines kinases et autres régulateurs intervenant dans différentes voies de signalisation</u></b>            AKT, MEKK1, FAK, APP...</li> </ul>
<p><i>Figure 35 : Les substrats des caspases.            Liste non exhaustive, d'après Degterev et al. 2003.</i></p>

Dans la plupart des cas, le clivage de la protéine cible conduit à son inactivation, avec une perte de son activité biologique. C'est le cas de protéines anti-apoptotiques

comme les inhibiteurs de caspases : FLIP et IAP (Liston *et al.* 2003) ou les protéines BCL-2 ou BCL-X<sub>L</sub>, dont le clivage résulte en la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques (Cheng *et al.* 1997).

Les caspases inactivent aussi des protéines de réparation comme la PARP ou Rad51 (Soldani et Scovassi 2002), des protéines de régulation du cycle cellulaire (Jin *et al.* 2000) et des protéines de transduction de signaux comme AKT qui une fois clivée, n'exerce plus sa fonction de facteur de survie (Widmann *et al.* 1998).

Les caspases peuvent également induire un gain de fonction de certaines protéines pro-apoptotiques, soit directement, comme les caspases elles-mêmes ou la protéine BID qui n'est active qu'après clivage, soit indirectement par dissociation de domaines régulateurs ou inhibiteurs comme le relargage de l'inhibiteur ICAD/DFF45, libérant l'endonucléase CAD/DFF40 active (Tang et Kidd 1998).

Enfin, les caspases sont à l'origine de la dissociation de certains constituants cellulaires par clivage de protéines de structure, comme les lamines nucléaires dont la dégradation par la caspase-6 conduit à l'altération de la membrane nucléaire (Ruchaud *et al.* 2002).

Ces protéases induisent également une désorganisation du cytosquelette, notamment par clivage des protéines constituant les filaments intermédiaires comme la kératine 18 (Schutte *et al.* 2004) ou par activation de la gelsoline. En effet, après clivage par la caspase-3, la gelsoline conduit à la dépolymérisation de l'actine (Kothakota *et al.* 1997). Des protéines des jonctions adhérentes, assurant les interactions entre les cellules sont aussi dégradées par les caspases ( $\beta$ -caténine) (Brancolini *et al.* 1998).

### ➤ La régulation des caspases

Le premier niveau de régulation des caspases est représenté par les mécanismes spécifiques et complexes de leur activation : disponibilité des cofacteurs (Apaf-1, cytochrome c), activation des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique (récepteurs).

Les caspases sont aussi régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus, par élimination des cellules infectées. Certains virus ont donc développé des systèmes de résistance qui agissent sur les caspases et inhibent l'apoptose comme CrmA ou p35. La protéine CrmA (cytokine response modifier gene) du virus de la vaccine interagit avec les caspases-1 et -8 et prévient leur clivage (Zhou *et al.* 1997). En revanche, p35, exprimée par le baculovirus, inhibe les caspases déjà actives : après clivage par ces caspases, p35 forme un complexe avec celles-ci, ce qui les inactive (Bump *et al.* 1995, Riedl *et al.* 2001).

Des homologues d'autres inhibiteurs de caspases, FLIP et les IAPs (Inhibitors of Apoptosis), mis en évidence chez les virus, ont été retrouvés chez l'homme. La protéine FLIP est un homologue inactif de la procaspase-8. De ce fait, elle va entrer en compétition avec celle-ci et bloquer soit le recrutement de la procaspase-8 au niveau du complexe du récepteur de mort, soit l'activation de la caspase-8 en inhibant son clivage (Tschopp *et al.* 1998). La famille des IAPs a été découverte initialement chez le baculovirus. Tous les membres de cette famille (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston *et al.* 2003). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (Yang et Li 2000, Suzuki *et al.* 2001). Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées de la mitochondrie dans le cytoplasme, lors de l'apoptose, se lient aux IAP et les inhibent (Du *et al.* 2000, Liston *et al.* 2003).

Les chercheurs ont également développé des inhibiteurs peptidiques pour les caspases (Thornberry *et al.* 1994). Ces inhibiteurs sont basés sur la spécificité du térapeptide du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase (Wei *et al.* 2000). L'introduction au niveau de l'extrémité C-terminale de ce térapeptide d'un groupement aldéhyde ou d'un groupement méthylcétone permet la synthèse d'un

inhibiteur respectivement réversible ou irréversible (Garcia-Calvo *et al.* 1998). Ces inhibiteurs sont largement utilisés pour démontrer l'implication des caspases et de l'apoptose dans certains processus.

#### 1.4.2. La famille BCL-2

La protéine BCL-2 a d'abord été identifiée comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de ce gène. Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire (Vaux *et al.* 1988). De plus, l'homologie de fonction entre BCL-2 et CED-9 de *C. elegans* ainsi que l'étude des souris déficientes en BCL-2, caractérisées par une apoptose massive des lymphocytes et des cellules rénales, ainsi qu'une perte accrue de mélanocytes (Veis *et al.* 1993), ont souligné l'importance de cette protéine comme régulateur de la mort cellulaire. La découverte d'autres protéines homologues de BCL-2 a permis l'identification de toute une famille de protéines pro- ou anti-apoptotiques (Cory *et al.* 2003).

##### ➤ Les différents membres de la famille BCL-2

Chez les mammifères, la famille BCL-2 compte environ vingt membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (BCL-2 homology domain). Selon leur fonction et la présence des domaines BH, on distingue les membres anti-apoptotiques, qui constituent la sous-famille BCL-2 et les membres pro-apoptotiques, subdivisés en deux groupes : la sous-famille BAX et la sous-famille BH3 (Figure 36).

La sous-famille BCL-2 est formée par BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, A1 et MCL-1, qui sont des homologues fonctionnels de CED-9 de *C. elegans*. Parmi ces derniers, BCL-2,



BCL-X<sub>L</sub> et BCL-W ont des structures très similaires et sont constitués des quatre domaines BH et d'un domaine C-terminal hydrophobe ou domaine transmembranaire (Figure 36, Petros *et al.* 2004). Ce domaine transmembranaire permet leur ancrage dans les membranes et plus particulièrement la membrane externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire. BCL-2 est une protéine membranaire alors que BCL-X<sub>L</sub> et BCL-W s'associent à la membrane uniquement après un signal apoptotique. Ces protéines sont à l'origine d'une inhibition de l'apoptose et chacune d'entre elles semble intervenir spécifiquement dans un type cellulaire donné (Droin et Green 2004). Ainsi BCL-2 est requis pour la survie des lymphocytes, des cellules rénales et des mélanocytes (Veis *et al.* 1993), BCL-W pour les cellules germinales (Ross *et al.* 1998), BCL-X<sub>L</sub> pour les cellules neuronales et érythropoïétiques (Gonzalez-Garcia *et al.* 1995) et A1 pour les neutrophiles (Orlofsky *et al.* 2002).

La sous-famille BAX comporte uniquement trois membres BAX, BAK et MTD/BOK qui présentent chacun une séquence et une structure similaires à BCL-2 mais avec seulement les domaines BH1, BH2 et BH3 (Petros *et al.* 2004). BAX et BAK sont exprimés dans de nombreux tissus alors que BOK est uniquement exprimé dans les

<b>Anti-apoptotiques</b>	
Sous-Famille BCL-2	BCL-2, BCL-X <sub>L</sub> , A1 BCL-W, MCL-1
<b>Pro-apoptotiques</b>	
Sous-Famille BAX	BAX, BAK, BOK
Sous-Famille BH3	BID  BIM, BIK, BAD, BMF, HRK, NOXA, PUMA

*Figure 36 : Les différents membres de la famille BCL-2 et leur structure. Les régions en hélices  $\alpha$  ainsi que la position des domaines BH sont indiquées. TM représente le domaine C-terminal hydrophobe ou domaine transmembranaire. d'après Cory et Adams 2002.*

tissus de reproduction (Hsu *et al.* 1997). Ces protéines favorisent la survenue de l'apoptose. L'inactivation de BAX entraîne une augmentation du nombre de cellules lymphoïdes et de neurones (Knudson *et al.* 1995, Droin et Green 2004). De plus, il a été montré que ces effets sont accentués si BAX et BAK sont inhibés simultanément dans les cellules alors que l'inactivation isolée de BAK n'a pas d'effet (Rathmell *et al.* 2002). Ceci suggère l'existence d'une coopération fonctionnelle entre BAX et BAK (Nechushtan *et al.* 2001, Mikhailov *et al.* 2003). BAX est une protéine monomérique cytoplasmique qui subit un changement conformationnel lors de l'apoptose, s'oligomérisent et s'intègre dans la membrane mitochondriale (Nechushtan *et al.* 2001). Suite à la translocation de BAX, BAK situé dans la membrane mitochondriale, change également de conformation et forme des agrégats membranaires (Mikhailov *et al.* 2003).

La sous-famille BH3 est constituée de plus de huit membres chez les mammifères, dont BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA, HRK, homologues de EGL-1 de *C. elegans* (Figure 36). Les protéines de cette sous-famille sont caractérisées par la présence dans leur séquence d'un seul motif BH, le domaine central BH3, qui est essentiel pour leur fonction pro-apoptotique. Certaines interviennent dans l'initiation du processus apoptotique durant le développement (Bouillet et Strasser 2002). En effet, les rôles physiologiques de BIM et de HRK ont été mis en évidence dans le développement et l'homéostasie tissulaire. BIM est essentiel pour l'élimination des lymphocytes auto-réactifs (Bouillet *et al.* 2002). Son absence induit une augmentation du nombre de leucocytes pouvant provoquer une maladie auto-immune.

Les membres de cette famille sont aussi impliqués dans le déclenchement de l'apoptose en réponse à certains stimuli cytotoxiques. Il semblerait que chaque protéine soit responsable de la transduction d'un signal de mort spécifique, dans un type cellulaire précis. Ainsi, BID contribue à l'apoptose des hépatocytes provoquée par les récepteurs de mort (Yin *et al.* 1999). De même, BAD est impliqué dans l'apoptose due à un manque de glucose (Danial *et al.* 2003). NOXA et PUMA interviennent dans l'apoptose induite par des agents génotoxiques (Oda *et al.* 2000, Yu *et al.* 2001).

➤ **Principaux mécanismes d'action**

La réponse cellulaire à un signal apoptotique dépend du ratio entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Toutes les protéines de la sous-famille BH3 se lient aux membres anti-apoptotiques et neutralisent ainsi leur fonction de survie. A l'exception de BID, cette possibilité de former des hétérodimères représente le seul mécanisme d'action des membres BH3.

La sous-famille BAX présente aussi cette particularité mais elle possède aussi une activité cytotoxique indépendante. Lors de l'apoptose, BAX s'intègre dans la membrane mitochondriale et contribue avec BAK à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, à la chute du potentiel mitochondrial et à la libération de protéines apoptogènes comme le cytochrome c dans le cytoplasme (Mikhailov *et al.* 2003). L'oligomérisation de BAX semble être nécessaire pour son activité (Antonsson *et al.* 2000). De plus, la protéine BID entraîne elle-aussi la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Une fois clivée, tBID la forme active de BID interagit avec la membrane mitochondriale où il forme des homotrimères et induit le relargage de protéines de l'espace intermembranaire par des mécanismes encore inconnus (Grinberg *et al.* 2002). BID pourrait former des canaux membranaires ou favoriser l'oligomérisation de BAX et de BAK (Eskes *et al.* 2000, Korsmeyer *et al.* 2000).

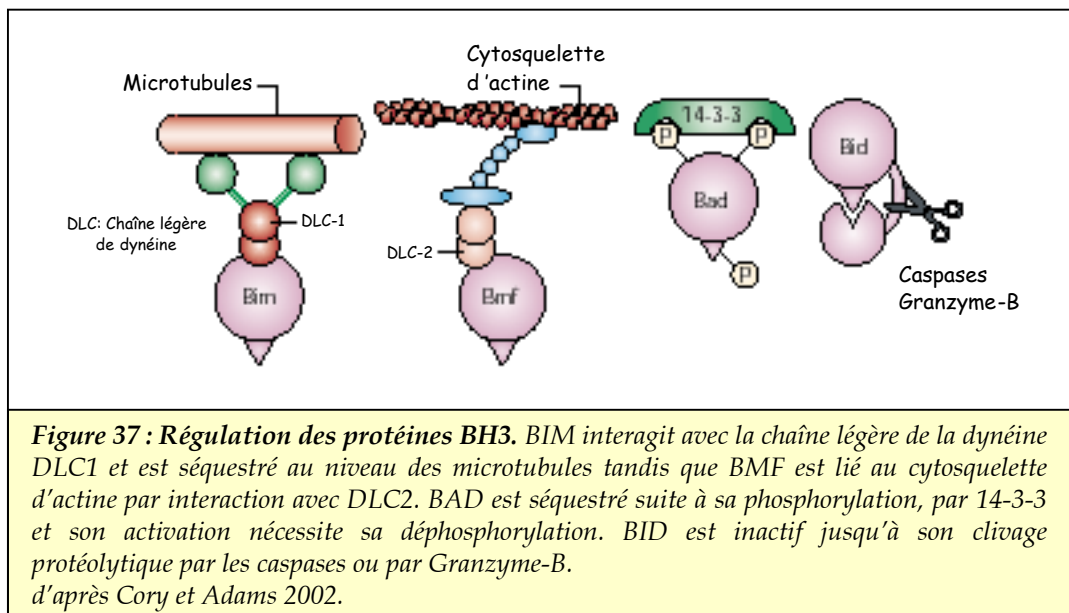
BAX et BAK sont également impliqués dans l'initiation de l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique où ils induisent la libération d'ions calcium qui peuvent conduire à l'activation des caspases (Zong *et al.* 2003).

Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 assurent la survie des cellules par différents mécanismes. Tout d'abord BCL-2 contrôle l'activation des caspases initiateuses, comme la caspase-2, probablement en sequestrant des activateurs ou adaptateurs de ces caspases. Cette protéine assure également le maintien de l'intégrité des organelles notamment la mitochondrie. En effet, elle empêche la libération de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie en inhibant

l'oligomérisation de BAX et de BAK (Cory et Adams 2002). Elle empêche aussi la chute du potentiel membranaire mitochondrial.

### ➤ Régulation de la famille BCL-2

Pour éviter une induction de l'apoptose dans les cellules normales, les protéines de la



famille BH3, exprimées constitutivement, sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes, illustrés par la Figure 37. Par exemple, BIM et BMF sont séquestrés au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine et suite à un signal de mort, ils sont libérés dans le cytoplasme (Puthalakath *et al.* 1999). BAD, quant à lui, est phosphorylé et va être fixé par la protéine 14-3-3 qui empêche son action. Un troisième mécanisme de régulation est l'expression d'un précurseur inactif qui nécessite pour son activation un clivage protéolytique. C'est le cas de BID, dont le clivage libère la forme active tBID.

Certaines protéines de la famille BCL-2 sont aussi régulées transcriptionnellement. L'expression de BAX, NOXA et PUMA peut être induit par p53 (Villunger *et al.* 2003). De même, HRK/DP5 est contrôlé transcriptionnellement suite à une absence de facteurs de croissance (Imaizumi *et al.* 1999).

## 2. Voies de signalisation induites par les radiations ionisantes

### 2.1. Mécanismes cellulaires activés par les dommages de l'ADN

#### 2.1.1. Détection des dommages

Les dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes sont détectés par les protéines ATM ("ataxia-telangiectasia mutated"), ATR ("ataxia-telangiectasia RAD3-related") et DNA-PK ("DNA-dependent protein kinase"). Ces protéines de 350 à 450 kDa appartiennent à la famille des phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (PI3Ks). Elles surveillent l'ADN, détectent les lésions et régulent les réponses cellulaires à ces dommages, en phosphorylant un certain nombre de protéines cibles, ce qui va déterminer la réponse cellulaire.

La déficience en protéine ATM est à l'origine de la maladie neurodégénérative ataxia-telangiectasia (AT) qui est caractérisée par une dégénérescence nerveuse, une immunodéficience et une prédisposition pour le cancer. Au niveau cellulaire, cette maladie se manifeste par une instabilité chromosomique et par une sensibilité accrue aux radiations ionisantes. La protéine ATM est recrutée et activée surtout au niveau des CDB (Kurz *et al.* 2004). Elle phosphoryle alors un grand nombre de substrats, incluant les protéines CHK1/CHK2, qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, p53, c-Abl, ainsi que les protéines RPA, BRCA1 et NBS1 impliquées dans la réparation, ce qui induit un arrêt du cycle cellulaire, suivi de l'activation soit de la réparation, soit de l'apoptose. La protéine ATR présente des homologies avec ATM et est aussi activée suite aux dommages de l'ADN (Yang *et al.* 2004). Elle phosphoryle les mêmes substrats que ATM mais elle répond à des lésions distinctes de celles qui activent ATM. Elle intervient surtout dans la signalisation des dommages de l'ADN survenant durant la phase S du cycle cellulaire. La sérine/thréonine kinase nucléaire, DNA-PK est un complexe multiprotéique constitué d'une sous-unité catalytique, la DNA-PKcs, codée par le gène XRCC7, et d'une sous-unité régulatrice Ku, composée de deux protéines Ku70 et Ku80 (Lee *et al.* 2002). Ku se lie aux extrémités libres de

l'ADN endommagé, lors d'une cassure, et active alors la DNA-PKcs. La DNA-PK a un rôle essentiel dans l'induction de la réparation des CDB mais elle phosphoryle aussi d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

La PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) intervient également dans la surveillance et la détection des dommages de l'ADN (Bouchard *et al.* 2003). Cette protéine nucléaire se lie rapidement aux CSB et aux CDB et synthétise des poly(ADP-ribose), qui recrutent d'autres protéines comme la topoisomérase, la DNA-PK, p53, p21 et la PARP elle-même. La PARP rend l'ADN endommagé accessible aux enzymes de réparation.

Ces différentes protéines assurant la détection des lésions de l'ADN peuvent conduire à l'activation de p53, suite à l'exposition aux rayonnements ionisants.

### 2.1.2. Rôle de p53 dans la réponse aux radiations ionisantes

La protéine p53 est une des protéines les plus importantes dans la réponse aux radiations ionisantes. Elle intervient dans le choix entre la survie cellulaire ou l'apoptose après irradiation (Slee *et al.* 2004, Fei et El-Deiry 2003). En outre, le gène de cette protéine est mutée dans plus de la moitié des cancers humains (Hollstein *et al.* 1991).

#### ➤ La protéine p53

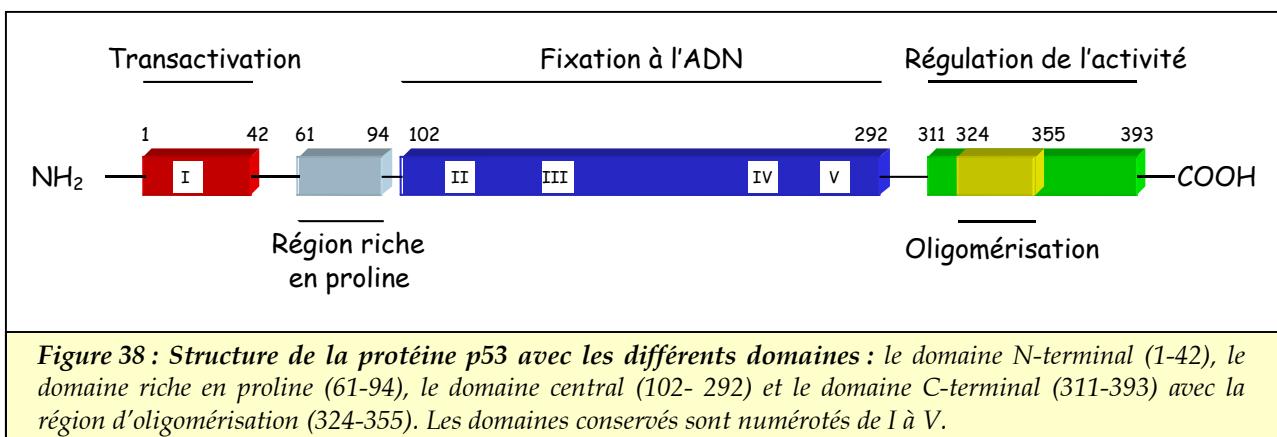
La protéine p53 a été découverte en 1979. Cette protéine, décrite comme le « gardien du génome », est un suppresseur de tumeur. En effet, des souris déficientes en p53 sont caractérisées par une grande incidence de développement de tumeurs (Donehower *et al.* 1996). La protéine p53 est présente dans toutes les cellules de l'organisme et est activée lorsqu'une cellule subit un stress comme les radiations ionisantes, les UV, le traitement par des drogues chimiothérapeutiques, l'hypoxie,

l'activation d'oncogènes, l'absence de facteurs de survie... Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'induction de l'apoptose. Sa capacité à induire l'apoptose est d'ailleurs responsable de son activité de suppresseur de tumeur. p53 intervient également dans le développement (Choi et Donehower 1999).

### Structure de p53

p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés (Somasundaram et El-Deiry 2000). Elle est constituée de quatre domaines fonctionnels principaux : un domaine de transactivation, situé à l'extrémité N-terminale et nécessaire pour la fonction d'activation transcriptionnelle de gènes, une région riche en proline, composée de cinq répétitions PXXP, un domaine central requis pour la fixation spécifique de p53 à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine C-terminal, qui intervient dans la régulation négative de la protéine (Figure 38). Le domaine C-terminal contient un signal de localisation nucléaire et une région de fixation non spécifique à l'ADN (Slee *et al.* 2004, Hulboy *et al.* 1994).

p53 agit principalement en activant transcriptionnellement l'expression de gènes cibles grâce à son domaine de transactivation. Par ailleurs, la protéine p53 native est un tétramère; le domaine d'oligomérisation est essentiel pour son activité de suppresseur de tumeur (Stenger *et al.* 1994, Jeffrey *et al.* 1995).



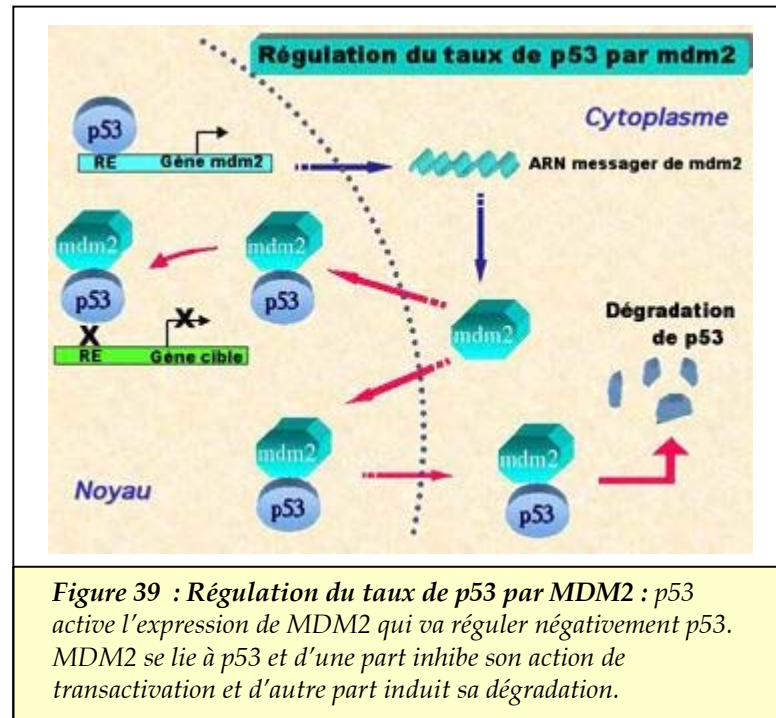
De plus, les domaines N-terminal et C-terminal contiennent également plusieurs sites d'acétylation et de phosphorylation. En C-terminal, ces sites de modifications jouent un rôle dans la régulation de la fixation du domaine central sur l'ADN. En N-terminal, les phosphorylations de certaines sérines contrôlent l'activité d'activation de la transcription et l'interaction de p53 avec d'autres protéines (Giaccia et Kastan 1998). En outre, le gène *p53* a été mis en évidence chez de nombreuses espèces. Les études phylogénétiques ont permis d'identifier cinq domaines d'homologies (notés I à V sur la figure) qui renferment des régions essentielles au fonctionnement de p53.

#### *Activation de p53*

Dans les conditions normales, p53 est maintenue à de faibles concentrations dans les cellules. En effet, sa demi-vie est faible (20 min), elle est rapidement dégradée. De ce fait, elle est indétectable dans les cellules et tissus normaux (Vogelstein *et al.* 2000). La dégradation de p53 est sous contrôle de la protéine MDM2 (Deb 2002). MDM2 se fixe à p53 et stimule sa dégradation protéolytique en favorisant l'addition de résidus ubiquitine au niveau de son extrémité C-terminale (Haupt *et al.* 1997). Cette dégradation par l'intermédiaire du protéasome est responsable du turnover rapide de p53 (Chowdary *et al.* 1994, Yang Y. *et al.* 2004). De plus, MDM2 lie le domaine N-terminal de p53 et inhibe son activité de transactivation (Figure 39). MDM2 favoriserait aussi le transport de p53 en dehors du noyau (Gu *et al.* 2001).

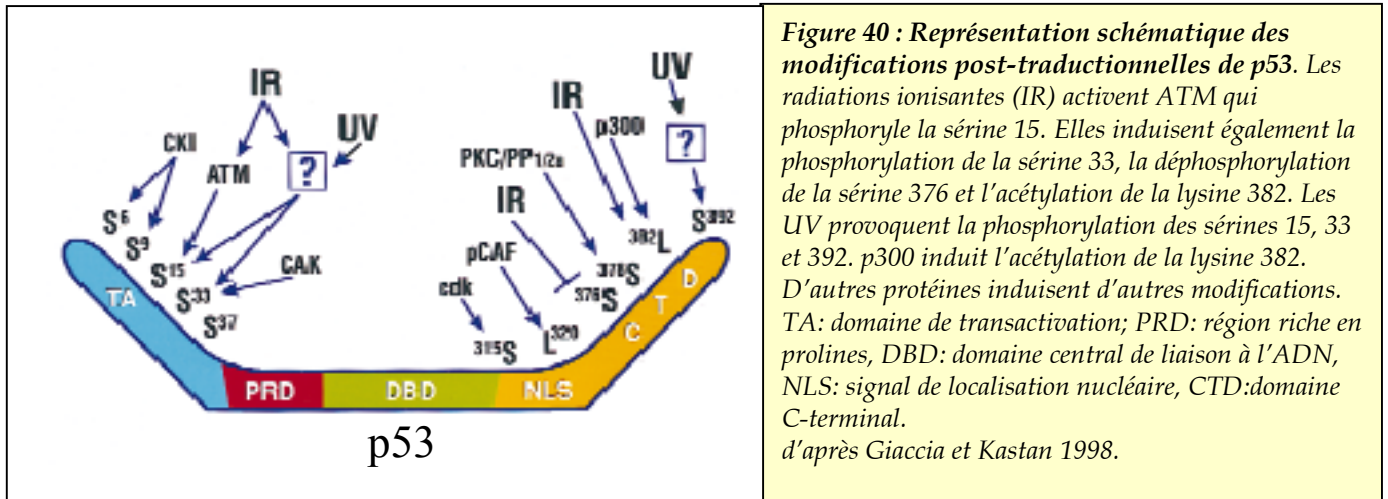
La protéine p53 intervient elle-même dans sa propre régulation, en activant l'expression du gène *mdm2* (Juven *et al.* 1993).





Suite à un stress, p53 est activé. En effet, en réponse aux dommages de l'ADN, p53 est phosphorylé ce qui bloque sa liaison avec MDM2 et résulte en une inhibition de sa dégradation (Shieh *et al.* 1997). Il y a alors stabilisation et accumulation de p53 dans la cellule. Cependant, l'augmentation du taux de p53 dans les cellules n'est pas suffisante pour son activité de facteur de transcription. En effet, l'extrémité C-terminale de p53 inhibe le domaine de liaison à l'ADN, localisée dans la partie centrale de la protéine. En outre, la phosphorylation du domaine N-terminal de p53, nécessaire pour l'inhibition de sa dégradation via MDM2, modifie uniquement son affinité pour MDM2 mais n'affecte pas le domaine de liaison à l'ADN (Shieh *et al.* 1997, Sakaguchi *et al.* 2000). Un changement de conformation de p53 est donc nécessaire pour son activité. Celui-ci résulte de modifications post-traductionnelles de la protéine (Figure 40), telles que des phosphorylations ou déphosphorylations, des acétylations, la fixation de protéines, ... (Takenaka *et al.* 1995, Appella et Anderson 2001, Sakaguchi *et al.* 1998, Giaccia et Kastan 1998). L'acétylation de résidus lysine ou la phosphorylation de résidus sérines, à proximité du domaine C-terminal améliorent la fixation spécifique de p53 à l'ADN (Luo *et al.* 2004). C'est le cas notamment de l'acétylation de la lysine 382 de p53 par l'acétyltransférase p300/CBP qui favorise l'activité transcriptionnelle de la protéine (Liu *et al.* 1999). De

même, l'interaction de p53 avec certaines protéines peut induire un changement de conformation et activer la fonction transactivatrice de la protéine (Zacchi *et al.* 2002, Giaccia et Kastan 1998).



L'activation de p53 peut être induite par les dommages à l'ADN, comme ceux causés par les radiations ionisantes, les drogues chimiothérapeutiques ou les UV. Dans ce cas, p53 est phosphorylé par les protéines kinases qui interviennent dans la détection des dommages : ATM (Khosravi *et al.* 1999), ATR (Tibbets *et al.* 1999), DNA-PK, les caséines-kinases I ou II, ou par des protéines elles-mêmes activées par ATM comme CHK1/CHK2 (Chehab *et al.* 2000). La PKC, activée par l'acide arachidonique libéré lors de l'hydrolyse des phospholipides peut elle-aussi phosphoryler p53.

p53 peut également être activé par une autre voie, déclenchée par des oncogènes cellulaires ou viraux. Ces oncogènes tels que c-myc, ras ou  $\beta$ -caténine stabilisent p53 en activant la transcription de p14/ARF (Lin et Lowe 2001, Zindy *et al.* 1998). p14 va alors lier MDM2 et empêcher son activité inhibitrice sur p53, notamment en séquestrant MDM2 dans le nucléole (Weber *et al.* 1999). L'activation de p53 par des oncogènes représente un mécanisme de protection de la cellule contre la cancérogénèse.

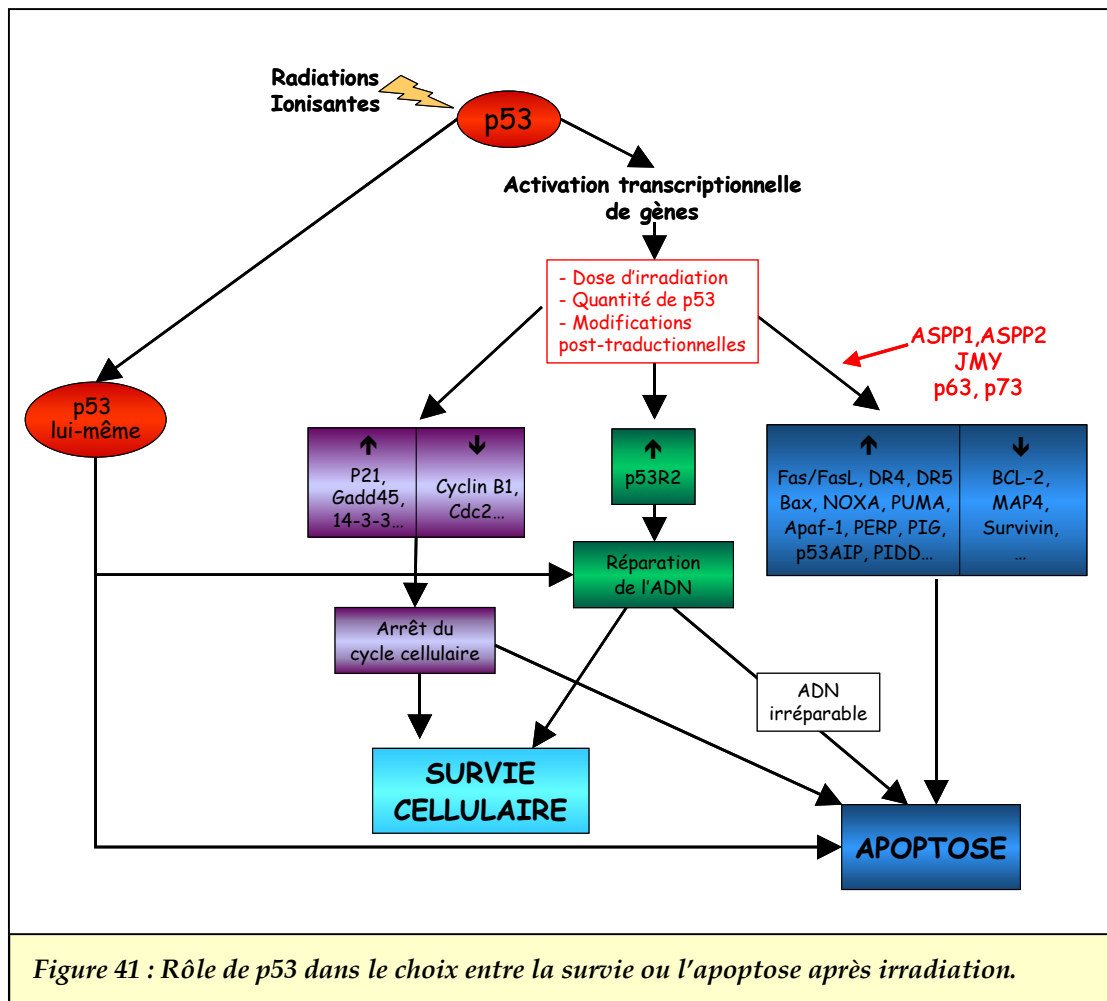
➤ **La protéine p53 et la réponse aux radiations ionisantes**

Comme nous l'avons vu précédemment, p53 est activé par les dommages à l'ADN et par conséquent par les radiations ionisantes. Plusieurs études ont mis en évidence une élévation de la quantité de p53 après irradiation (Hickman *et al.* 1994, Wang *et al.* 1996, Xia *et al.* 2004). D'autres ont montré que l'arrêt du cycle cellulaire observé après exposition aux radiations ionisantes, dans certains types cellulaires, notamment des fibroblastes, des cellules thyroïdiennes et des lignées de mélanome, fait intervenir p53 (Bae *et al.* 1996). Par ailleurs, l'accumulation de p53 suite à l'irradiation est aussi responsable de l'induction de l'apoptose dans de nombreux tissus (Lowe *et al.* 1993, Merritt *et al.* 1994, Hinata *et al.* 2003, Borges *et al.* 2004, Jiang *et al.* 2004). p53 semble donc jouer un rôle essentiel dans les mécanismes cellulaires activés après irradiation (Fei et El-Deiry 2003). Certains travaux ont mis en évidence le rôle déterminant de cette protéine dans la radiosensibilité des cellules cancéreuses (Fei *et al.* 2002, Nakano *et al.* 2001, Merritt *et al.* 1994, Lowe *et al.* 1993). D'autres études ont démontré que la perte de fonction de p53 n'est pas toujours associée à une résistance aux rayonnements ionisants (Yu et Little 1998) et que certaines cellules malignes déficientes en p53 sont sensibles à l'apoptose induite par les radiations (Concin *et al.* 2003, Zaffaroni *et al.* 1995). Ces données contradictoires suggèrent que la corrélation entre p53 et la radiosensibilité dépend du type cellulaire (Held 1997). Cependant, même s'il existe une voie d'apoptose-p53 indépendante induite par les radiations, la présence de p53 dans les tumeurs contribue à une induction d'apoptose plus importante après irradiation (Uberti *et al.* 1999) et représente dans la plupart des cas, un facteur de bon pronostic pour la radiothérapie.

- *Décision entre survie cellulaire (arrêt du cycle cellulaire et/ou réparation) et mort cellulaire après irradiation*

Suite aux lésions de l'ADN induites par les rayonnements ionisants, p53 est phosphorylé par ATM ou CHK1/CHK2 (Canman *et al.* 1998, Takai *et al.* 2002). De même, MDM2 est phosphorylé par ATM dans son domaine d'interaction avec p53, ce

qui aboutit à la stabilisation de ce dernier (Khosravi *et al.* 1999). Une fois activé, la fonction principale de p53 est de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes d'arrêt de la prolifération ou de mort cellulaire, ce qui conduit soit à un arrêt du cycle cellulaire et/ou une réparation des dommages, soit à l'apoptose. La nature des gènes activés ou réprimés par p53 va déterminer la réponse cellulaire à l'irradiation (Figure 41).



La réponse à l'irradiation varie selon les tissus. En effet, l'irradiation ne conduit pas à une activation de p53 dans tous les tissus. De même, l'accumulation de p53 ne résulte pas forcément en une induction d'apoptose. Par exemple, les cellules de l'intestin sont très sensibles à l'apoptose induite par p53 suite à une exposition aux rayons  $\gamma$ , alors que les cellules d'autres tissus comme le foie présentent une élévation de la quantité de p53 mais celle-ci résulte en un arrêt du cycle en G1 et non en une

induction de la mort cellulaire. Ceci s'explique par un profil d'expression des gènes cibles de p53 différent selon le type tissulaire (Fei *et al.* 2002, Burns et El-Deiry 2002, Yu *et al.* 1999). Dans l'intestin, il y a induction de gènes pro-apoptotiques alors que dans le foie, on observe l'expression de p21 qui provoque un arrêt du cycle cellulaire (Burns *et al.* 2001, Fei *et al.* 2002). De même, Zhao *et al.* ont montré que les gènes induits par p53 varient également en fonction de l'agent inducteur de cette protéine (Zhao *et al.* 2000).

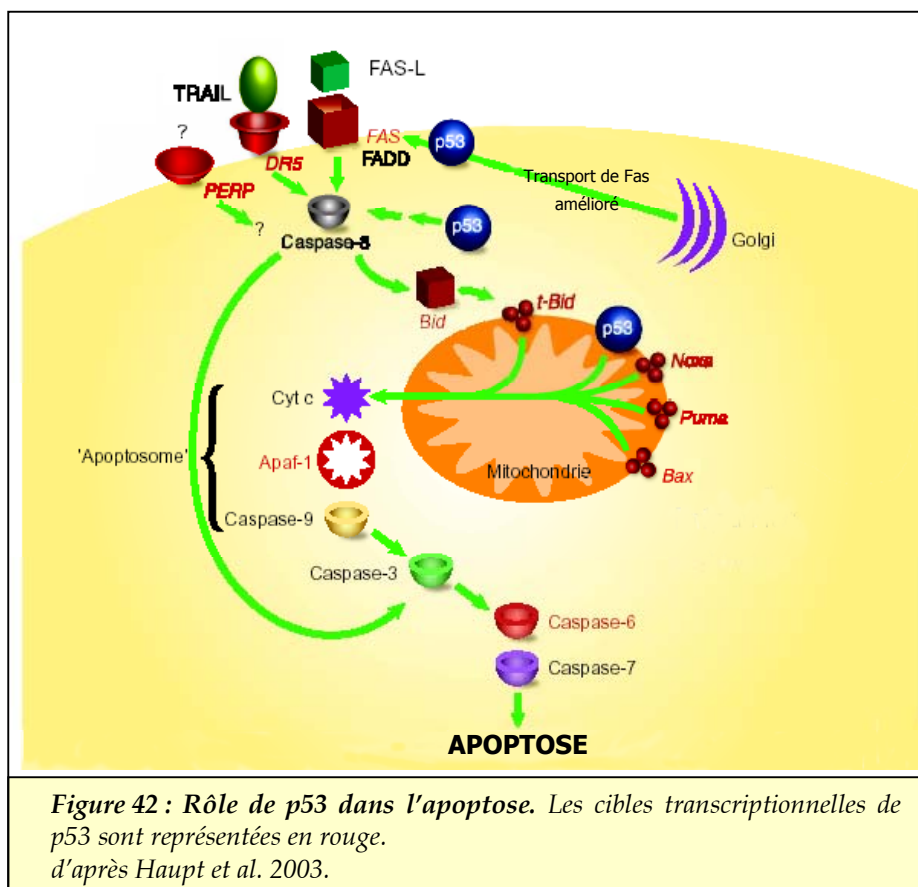
Suivant le tissu, p53 va induire sélectivement des gènes régulateurs du cycle cellulaire ou des gènes activant l'apoptose. Plusieurs paramètres semblent influencer le choix des gènes régulés par p53. Tout d'abord, la réponse cellulaire dépend de la concentration de p53 présente dans la cellule (Chen *et al.* 1996). En effet, Chen *et al.* ont démontré que lorsque la quantité de p53 est augmentée faiblement, l'arrêt du cycle cellulaire est induit alors qu'une augmentation forte de p53 entraîne la mort de la cellule. L'affinité pour les promoteurs des gènes serait responsable de cette différence : la concentration élevée de p53 permet l'interaction avec les promoteurs de faible affinité comme les gènes pro-apoptotiques alors que la liaison aux promoteurs de gènes de régulation du cycle cellulaire est plus spécifique et n'a lieu que lorsque p53 est présent en faible quantité. De plus, les modifications post-traductionnelles de p53 régule la spécificité pour le promoteur des gènes cibles ; c'est le cas de la phosphorylation sur la sérine 46 qui favorise l'activation du gène pro-apoptotique p53AIP1 (Oda *et al.* 2000). L'affinité de l'interaction de p53 avec un promoteur donné dépend aussi des interactions avec d'autres protéines cellulaires ou virales. Ainsi, il existe d'une part des régulateurs généraux de p53 (MDM2, E2F1, p300/CBP), qui augmentent l'activité de transactivation de tous les gènes cibles et d'autre part des protéines qui régulent spécifiquement la capacité de p53 à induire l'apoptose (ASPP1, ASPP2, iASPP, JMY, p63, p73) (Slee *et al.* 2004). La fixation de ASPP1 ou ASPP2 sur p53 augmente la transactivation des gènes cibles pro-apoptotiques comme *bax* et *PIG3* alors qu'elle a peu d'effet sur les gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Bergamaschi *et al.* 2004, Samuels-Lev *et al.* 2001). De même, JMY, cofacteur de p300, régule la fonction apoptotique de p53 en augmentant l'activation de BAX par p53 (Shikama *et al.* 1999). Par contre, iASPP inhibe

l'expression de gènes de l'apoptose (Bergamaschi *et al.* 2003). Donc, la quantité de protéine p53, ses modifications ainsi que son interaction avec d'autres protéines modifient la réponse cellulaire. Cependant, pour les radiations ionisantes, il semble que l'intensité des dommages à l'ADN est également un facteur déterminant pour le choix entre la survie ou la mort cellulaire. Offer *et al.* ont démontré qu'une dose d'irradiation faible induit la réparation par excision de bases de l'ADN, alors qu'une dose importante l'inhibe et induit l'apoptose (Offer *et al.* 2002). De plus, le génotype de la cellule, les altérations éventuelles qui affecteraient directement ou indirectement le statut fonctionnel de p53, ainsi que le contexte cellulaire c'est-à-dire la présence de facteurs de survie ou de molécules provenant d'interactions cellule/cellule influent également sur le choix de la réponse cellulaire (Oren 2003).

- *Induction de l'apoptose par p53*

Des études sur les mutations de p53 démontrent que la fonction de facteur de transcription de p53 est essentielle pour sa capacité à induire l'apoptose et inhiber le développement tumoral. Des mutations dans le domaine de transactivation entraînent une réduction de la réponse apoptotique chez des cellules ES ou des thymocytes suite à des dommages de l'ADN (Chao *et al.* 2000). Par ailleurs, il a été mis en évidence, grâce à des mutants p53, que la région riche en proline est nécessaire pour l'induction de l'apoptose. En effet, les mutants qui présentent une délétion de cette région, ont une expression de gènes pro-apoptotiques mais sont incapables de réprimer les gènes cibles de p53 et ainsi d'induire l'apoptose. La répression de gènes au même titre que l'induction de gènes, joue un rôle important pour l'apoptose induite par p53 (Venot *et al.* 1998). Donc, suite à l'irradiation, p53 induit l'apoptose en activant l'expression de certains gènes pro-apoptotiques et en inhibant l'expression de gènes anti-apoptotiques (Figure 42). Parmi les gènes induits par p53, certains codent pour des protéines situées dans la membrane plasmique, comme le récepteur Fas et/ou son ligand FasL, les récepteurs de TRAIL : DR5 (Takimoto et El-Deiry 2000) et DR4 (Guan *et al.* 2001) ou la protéine membranaire PERP (Ihrie *et al.* 2003). Les récepteurs membranaires Fas, DR4 et DR5 appartiennent aux récepteurs de mort et activés par leur ligand, ils vont conduire à l'apoptose par

l'intermédiaire de la caspase-8. p53 active aussi des gènes dont les produits sont localisés dans le cytoplasme comme PIDD (Lin *et al.* 2000). PIDD est induit par les radiations ionisantes dans une voie p53-dépendante, et déclencherait l'apoptose par activation de la caspase-2 (Tinel et Tschopp 2004). Les gènes PIG (p53-inducing-genes) et le gène de la ferredoxin-reductase sont également activés par p53 (Venot *et al.* 1998, Hwang *et al.* 2001). La protéine PIG3 entraîne la production de ROS, qui causent des dommages mitochondriaux et la ferredoxin réductase sensibilise les cellules aux radicaux oxygénés ce qui induit l'apoptose (Polyak *et al.* 1997).



D'autres gènes, dont l'expression est activée par p53, codent pour des protéines qui interagissent avec la mitochondrie, comme p53AIP (Matsuda *et al.* 2002) ou pour les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 : BAX, BOK (Yakovlev *et al.* 2004), PUMA (Nakano et Vousden 2001) et NOXA (Oda *et al.* 2000, Villunger *et al.* 2003). P53AIP induit la chute du potentiel membranaire mitochondrial et favorise ainsi le

relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. La protéine BAX va également permettre la libération du cytochrome c, après interaction avec la membrane mitochondriale, ce qui conduit à l'activation des caspases (Schuler *et al.* 2000). De plus, simultanément à l'expression de BAX, p53 induit en général une sous-expression de BCL-2, ce qui empêche la neutralisation de BAX par ce dernier (Miyashita *et al.* 1994). PUMA, suite à son activation par p53, se localise également au niveau de la mitochondrie, neutralise BCL-2 et induit le changement conformationnel de BAX (Nakano et Vousden 2001, Liu *et al.* 2003). NOXA induit aussi un dysfonctionnement mitochondrial en activant le pore de transition de perméabilité (Seo *et al.* 2003). Des cellules intestinales de souris déficientes en NOXA présentent une résistance à l'apoptose induite par les rayons X (Shibue *et al.* 2003). En outre, p53 surexprime le gène d'Apaf-1, qui s'associe au cytochrome libéré de la mitochondrie, et forme l'apoptosome (Robles *et al.* 2001). Par ailleurs, p53 provoque aussi l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique par augmentation de l'expression de la scotin, protéine de la membrane du réticulum (Bourdon *et al.* 2002). En plus de BCL-2 (Haldar *et al.* 1994), p53 régule négativement l'expression d'autres gènes anti-apoptotiques, notamment MAP4, protéine associée aux microtubules (Murphy *et al.* 1996) ou la survivin, qui est un inhibiteur de caspases de la famille IAP (Hoffman *et al.* 2002).

De plus, il a été démontré récemment que p53 peut entraîner l'apoptose indépendamment de sa fonction de transactivation de gènes (Figure 42). En effet, dans certains cas, l'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise pour induire la mort cellulaire (Marchenko *et al.* 2000). Suite aux dommages de l'ADN, p53 peut se localiser directement dans la mitochondrie et interagir avec BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> (Erster *et al.* 2004). Il peut aussi faciliter le transport de Fas des réserves intracellulaires jusqu'à la surface après l'avoir activé transcriptionnellement (Bennett *et al.* 1998).

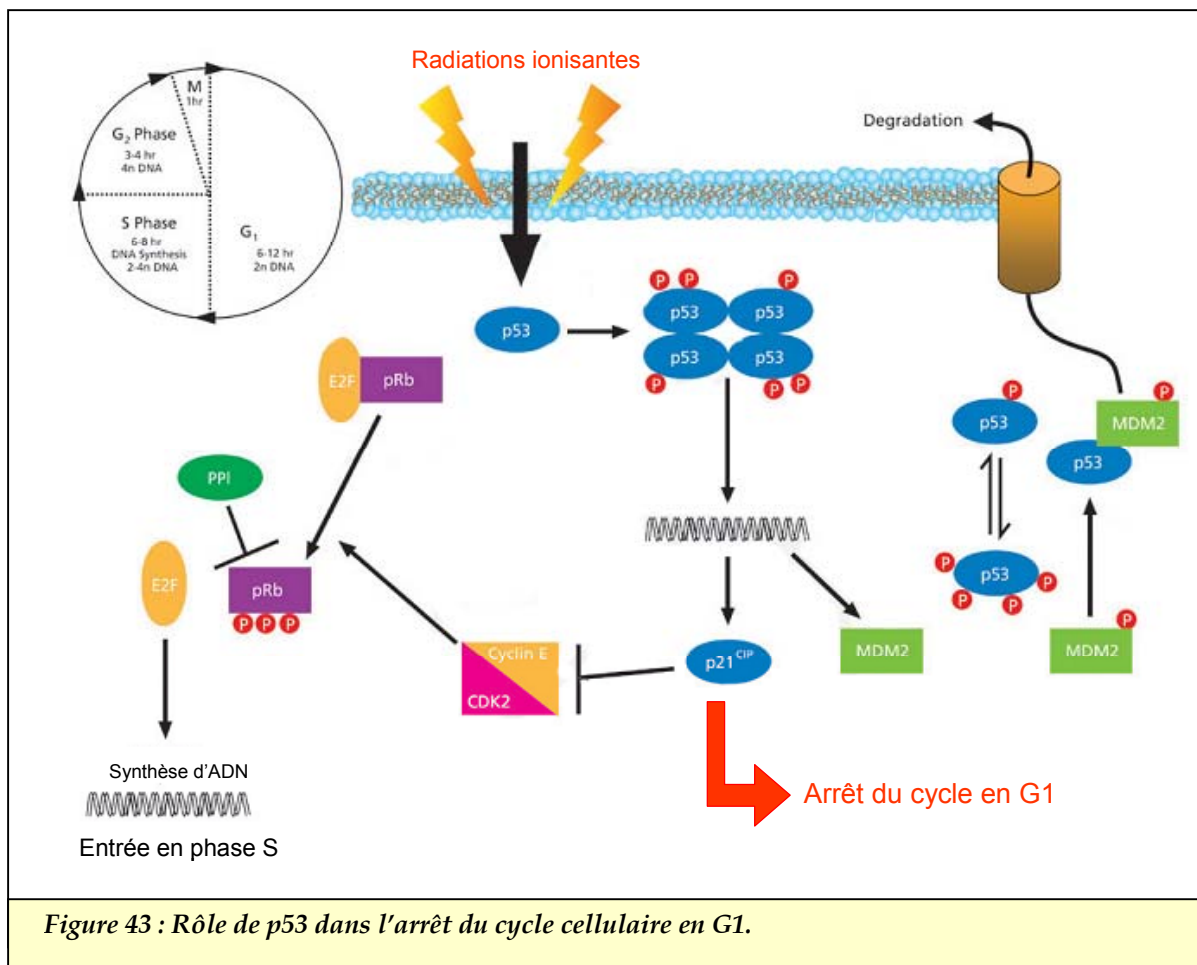
- *Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par p53*

Suite à l'irradiation, p53 peut induire dans certains types cellulaires un arrêt dans la progression du cycle cellulaire, soit en G1, soit en G2/M. L'arrêt du cycle en G1 empêche à l'ADN endommagé d'être répliqué et l'arrêt en G2 permet la suspension



du cycle avant la ségrégation des chromosomes (Teyssier *et al.* 1999). Il a été rapporté que p53 est également impliqué dans l'arrêt du cycle en phase S mais son rôle reste à préciser.

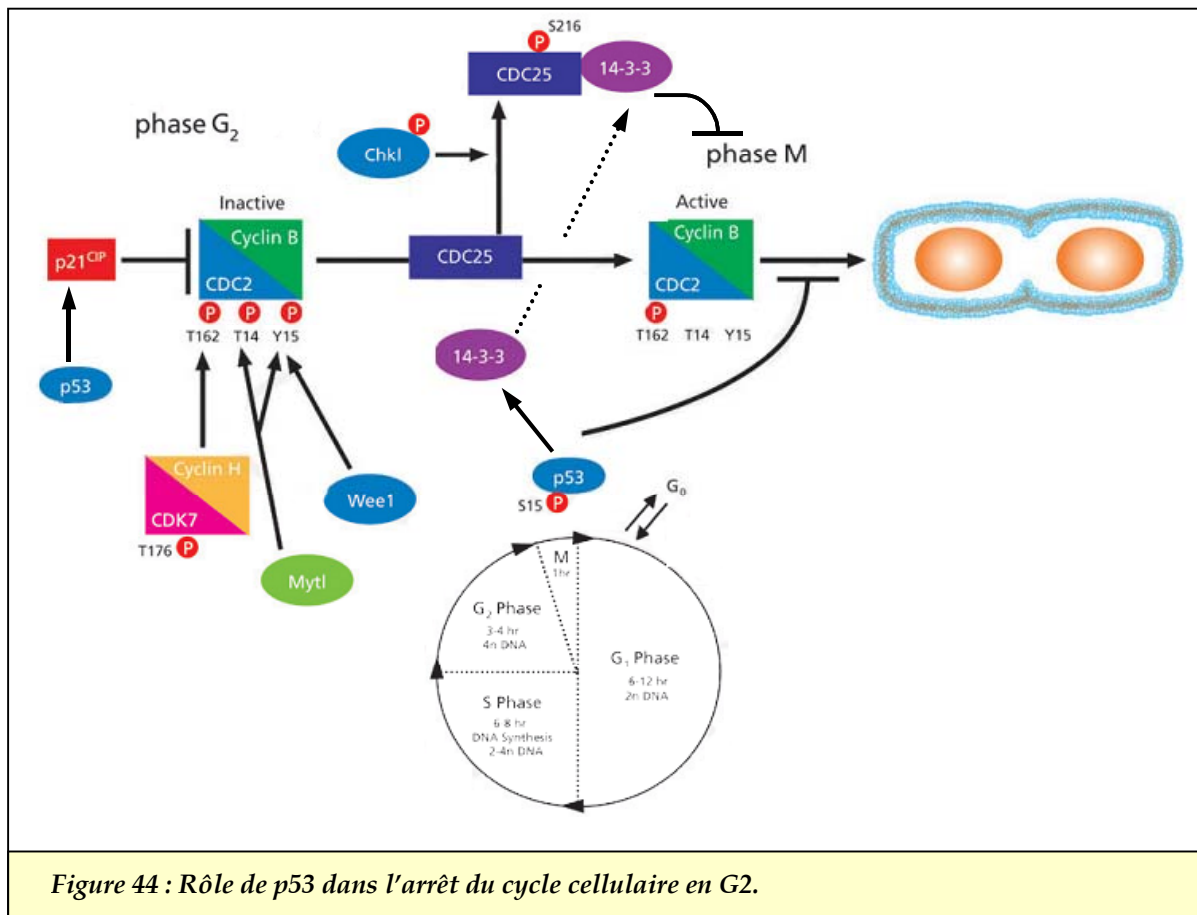
p53 stoppe le cycle cellulaire en G1 par deux mécanismes distincts. Le premier consiste en l'interaction directe de p53 avec les protéines jouant un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN telles que RPA (replicon protein A), ce qui inhibe l'initiation de la réplication et provoque un arrêt dans les minutes qui suivent l'irradiation.



La régulation de gènes cibles constitue le deuxième mécanisme par lequel p53 induit un arrêt en phase G1 (Figure 43). Ainsi l'irradiation conduit à la stimulation de p21 par p53. p21 est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK), surtout les cyclines A/E-CDK2. Ces CDK assurent la phosphorylation de la protéine Rb et dissocient ainsi le complexe E2F/Rb ce qui permet alors au facteur de transcription E2F d'activer l'entrée en phase S. p21 maintient donc ce complexe E2F/Rb et évite la

synthèse d'ADN. p21 se lie aussi au facteur PCNA et bloque son rôle dans la réplication de l'ADN (Li *et al.* 1994).

L'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub>/M par p53 s'effectue par répression du gène de la kinase cdc2 ou du gène de la cycline B1 (Figure 44), le complexe cycline B1-cdc2 étant



le régulateur clé du passage de la phase G<sub>2</sub> à la phase M (Innocente *et al.* 1999). p21 induit par p53 pourrait jouer un rôle dans cette répression. En outre, p53 active la transcription de la protéine 14-3-3 $\sigma$  qui fixe et séquestre cdc25, une autre protéine kinase chargée d'activer cdc2 (Hermeking *et al.* 1997). cdc2 alors inactivé ne peut assurer l'entrée de la cellule en mitose. Un autre gène, GADD45, également sur-exprimé par p53 en réponse à l'irradiation, intervient dans l'arrêt en G<sub>2</sub>/M, en déstabilisant le complexe cycline B1-cdc2 (Xiao *et al.* 2000).

- Rôle de p53 dans la réparation de l'ADN

p53 est directement impliqué dans la réparation de l'ADN après irradiation, par sa capacité d'interagir avec des composants de la machinerie de réparation et de recombinaison. Mise à part l'activation transcriptionnelle de p53R2, qui joue un rôle dans la réparation des CDB, les activités de p53 dans la réparation de l'ADN sont indépendantes de sa fonction transactivatrice. En effet, p53 intervient dans les deux mécanismes de réparation des CDB : la réparation par recombinaison homologue, HRR et la suture non homologue des extrémités, NHEJ en interagissant avec RAD51 et BRCA1. De plus, certains chercheurs ont mis en évidence une activité exonucléasique exercée par la partie C-terminale de p53 et impliquée dans la réparation de CDB suite à l'irradiation de lignées lymphoblastiques humaines (Mallya et Sikpi 1998). p53 réduit aussi le taux d'aberrations chromosomiques après irradiation (Akyuz *et al.* 2002).

En outre, p53 favorise également la réparation par excision de bases BER, *in vitro* et *in vivo* (Offer *et al.* 1999). La stimulation de ce mode de réparation par p53 est corrélée à son interaction avec l'endonucléase APE1 et avec l'ADN polymérase  $\beta$  constituants du système BER (Zhou *et al.* 2001).

### 2.1.3. Réponses cellulaires indépendantes de p53

Bien que p53 joue un rôle fondamental dans la réponse aux rayonnements ionisants, d'autres voies indépendantes de p53 peuvent conduire à un arrêt du cycle cellulaire ou à l'induction d'apoptose suite aux dommages de l'ADN provoqués par les radiations.

Deux protéines présentant de fortes homologies de structure avec p53 ont été récemment découvertes : p63 et p73. A la différence de p53, les gènes p63 et p73 expriment plusieurs isoformes qui résultent d'épissages alternatifs de leur ARNm. La sur-expression de certaines isoformes peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose (Rodicker *et al.* 2003). Ainsi, Melino *et al.* ont montré que p73 induit

l'apoptose en surexprimant BAX et PUMA (Melino *et al.* 2004). Ces protéines pourraient intervenir dans les mécanismes cellulaires activés après irradiation, dans une voie p53-indépendante. Notamment, il a été démontré que suite à l'irradiation, la tyrosine kinase c-ABL, phosphorylée par ATM en réponse aux dommages de l'ADN, induit l'activation de p73 (Yuan *et al.* 1999), ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire ou une induction d'apoptose, selon les gènes transactivés par p73 (Hamer *et al.* 2001, Agami *et al.* 1999, Costanzo *et al.* 2002)

De même, d'autres mécanismes peuvent être responsables de l'arrêt du cycle en G2 après exposition aux radiations ionisantes. A l'inverse de l'arrêt en G1 pour lequel p53 reste le principal régulateur, la présence de p53 accentue mais n'est pas indispensable pour arrêter le cycle cellulaire en G2 après irradiation. En effet, les dommages à l'ADN activent directement ou par l'intermédiaire d'ATM, la protéine CHK1, qui comme p53, phosphoryle cdc25 et permet sa liaison avec 14-3-3 $\sigma$ , ce qui l'inhibe.

#### 2.1.4. Les systèmes de réparation de l'ADN

Les lésions de l'ADN peuvent suite à l'irradiation, être prises en charge par les systèmes de réparation de la cellule. Les mécanismes de réparation des dommages induits par les radiations ionisantes sont mal connus et différent selon le type de lésion.

##### ➤ Réparation par excision de bases (BER, Base excision repair)

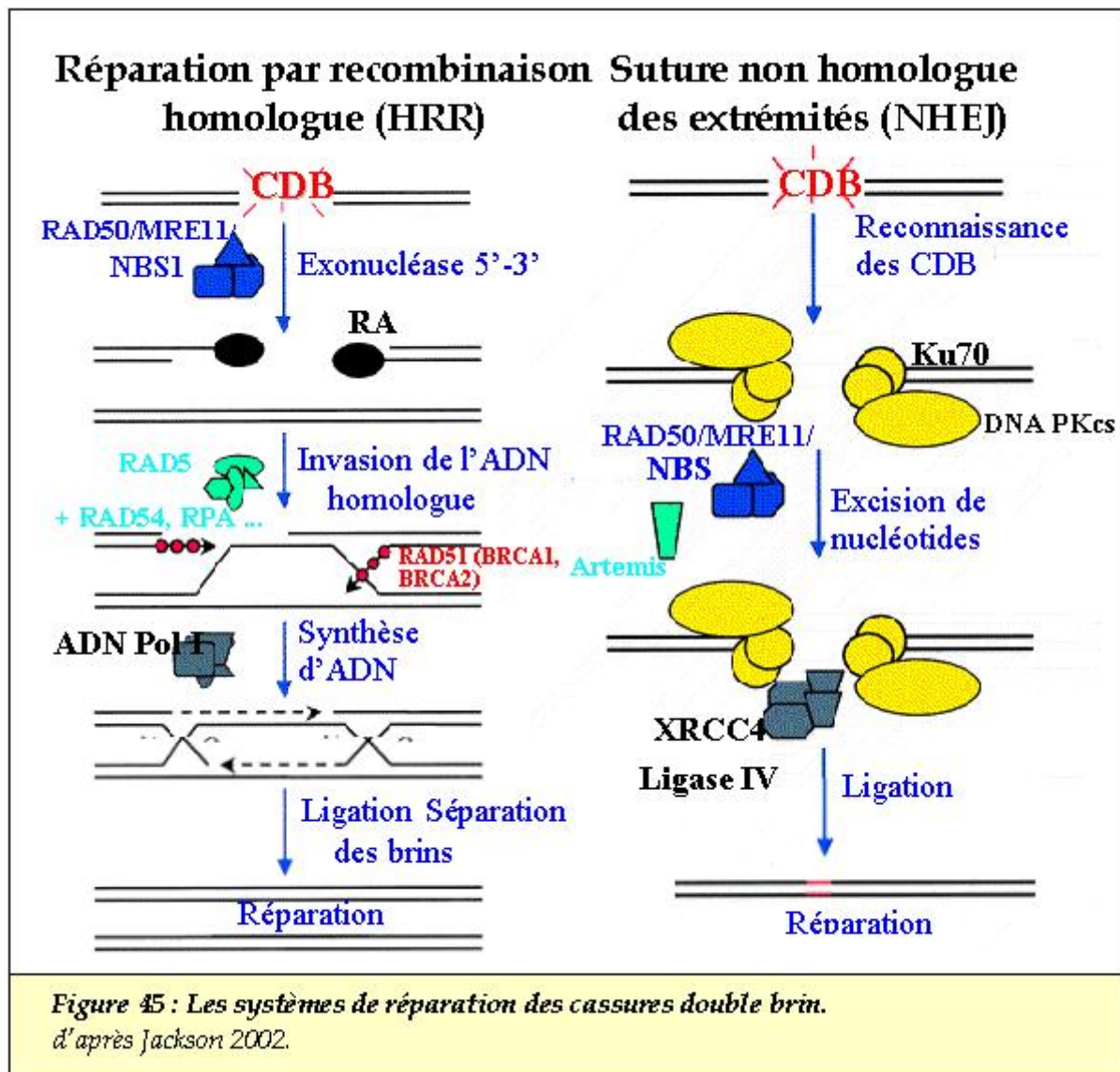
La réparation par excision de bases est un système hautement conservé à travers les espèces. Elle est activée suite aux dommages au niveau des bases et intervient aussi après induction des CSB (Wilson *et al.* 2003). Lorsque la lésion est détectée, il y a excision de la base endommagée par l'ADN-glycosylase, qui coupe la liaison glycosidique. Ce clivage conduit à un site « apurique » ou « apyrimidique » (AP).

L'endonucléase APE1 clive ensuite la liaison phosphodiester en 5' du site AP, résultant en une extrémité 3' et une extrémité 5' désoxyribose phosphate sans base, ce qui est équivalent à une cassure simple brin qui peut induire une brèche sur une distance de plusieurs bases. L'ADN-polymérase  $\beta$  enlève ensuite ce désoxyribose et insère le ou les nucléotides correspondants. Puis une ADN-ligase intervient pour lier les deux extrémités. La PARP qui détecte les dommages peut activer ce système de réparation et y jouer un rôle (Dantzer *et al.* 1999). Ces lésions n'impliquant qu'un seul brin d'ADN sont en général correctement et rapidement réparées par simple réplication du brin opposé via la complémentarité des bases impliquées dans la lésion. D'autres systèmes de réparation existent pour réparer les dommages n'affectant qu'un seul brin mais ils n'interviennent pas, ou peu, après des dommages de l'ADN induits par les radiations ionisantes. C'est le cas de la réparation par excision de nucléotides (NER) qui répare des dommages induits par les UV et la MMR (mismatch repair) qui corrige les erreurs de réplication.

### ➤ Réparation des CDB

Les CDB diffèrent des autres dommages car elles sont plus complexes et affectent les deux brins de l'ADN ce qui empêche l'utilisation du second brin comme modèle pour la réparation.

Il existe deux systèmes principaux de réparation des CDB (Figure 45) : la réparation par recombinaison homologue (HRR) et la suture non homologue des extrémités (NHEJ) (Valerie *et al.* 2003).



Le choix entre ces deux mécanismes de réparation semble être influencé par la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule lors de l'induction des dommages (Takata *et al.* 1998).

- la réparation par recombinaison homologue, HRR

Ce système de réparation prédomine en fin de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire, lorsque les chromatides soeurs sont disponibles (Haber 2000). Il corrige les CDB sans induire d'erreurs, en utilisant un mécanisme qui prend comme modèle l'ADN du chromosome homologue non endommagé pour réparer la perte d'information génétique par recombinaison homologue. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce système de réparation. Tout d'abord, il y a reconnaissance

des extrémités libres de la CDB par les protéines du complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) qui vont, par activité exonucléase, produire des extrémités terminales 3' simple brin (de Jager *et al.* 2002). A l'extrémité de ces simples brins se fixent des protéines RAD52 (Ristic *et al.* 2003). Puis les protéines RAD51 et RPA ("Replication protein A", protéine qui lie les simples brins chez l'homme) se lient à l'ADN simple brin, pour former un complexe nucléoprotéique qui favorise l'appariement avec l'ADN de la chromatide soeur sur le chromosome homologue. Suite à cet appariement, une ADN-polymérase synthétise et allonge chaque brin d'ADN puis l'ADN-ligase I lie les extrémités. Un échange de brins entre les deux chromosomes peut s'effectuer.

- la suture non homologue des extrémités, NHEJ

Ce mécanisme ne requiert pas le chromosome homologue pour la réparation. Il est important durant la phase G0/G1 et le début de la phase S (Lee *et al.* 1997). Il consiste à rejoindre les deux extrémités produites par la CDB, sans reproduire exactement le motif qui était celui de cet endroit. Malgré les erreurs que peut induire ce système, il intervient dans la réparation de la plupart des CDB.

La suture non homologue des extrémités est assurée par l'activité de la protéine hétérodimérique Ku70/Ku80. Cette protéine initie la réparation en se liant aux extrémités libres de l'ADN et en recrutant au niveau de ce site d'autres facteurs : la DNA-PKcs, la protéine XRCC4 et l'ADN-ligase IV. La DNA-PK possède une activité kinase qui s'active en se liant aux extrémités de l'ADN et phosphoryle un certain nombre de substrats dont Ku et XRCC4, ce qui favorise la réparation. Une nucléase enlève quelques nucléotides et l'ADN-ligase IV lie les extrémités. D'autres protéines XRCC (X-ray repair cross complementing genes) interviennent dans cette réparation mais leur rôle n'est pas clairement défini (Thacker *et al.* 2003).

Malgré ces systèmes de réparation, une grande proportion de CDB ne sont pas réparées et sont létales pour la cellule, surtout celles induites par les radiations à TEL élevé.

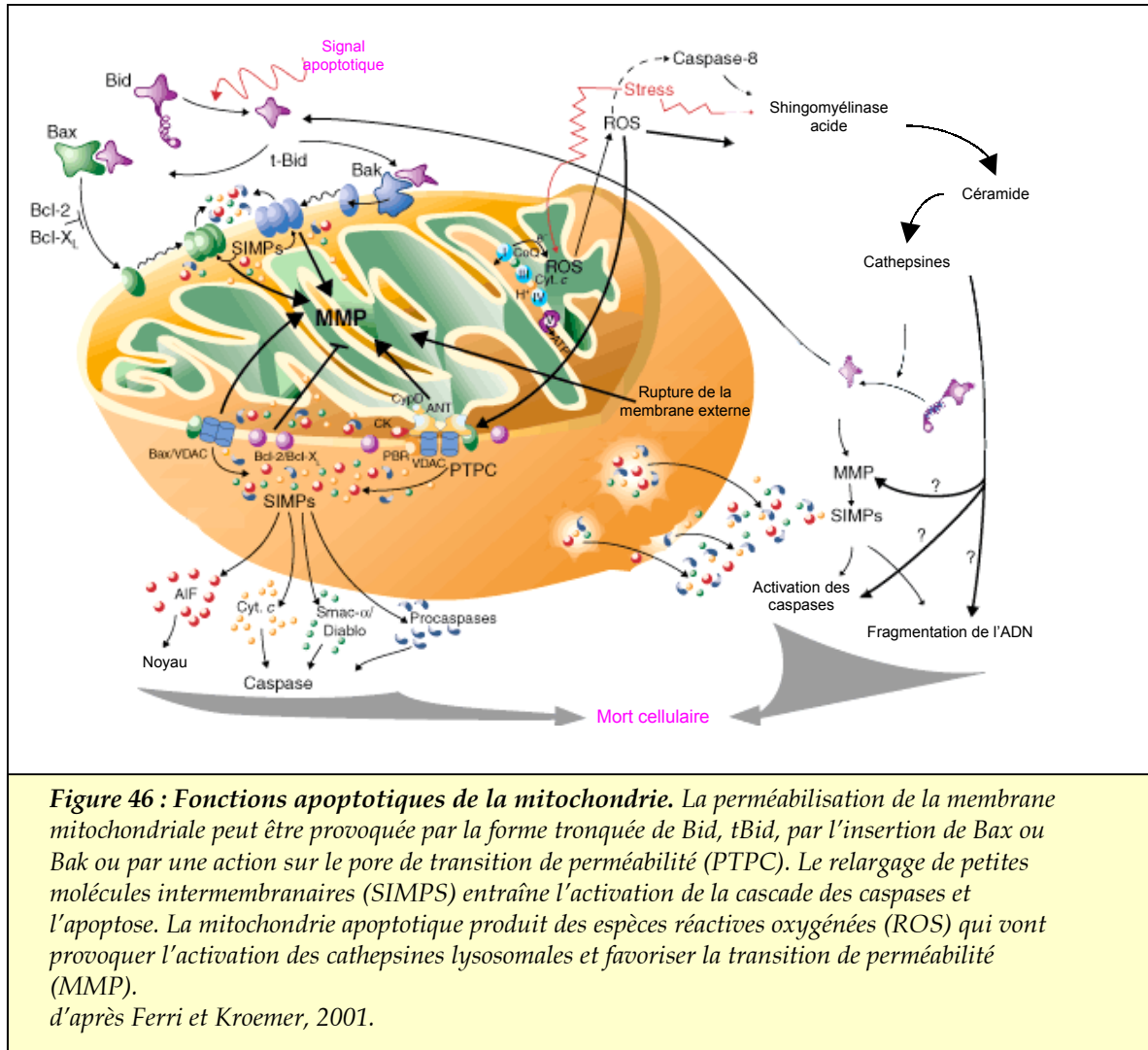
## 2.2. Voies de signalisation de l'apoptose radio-induite

### 2.2.1. Voie mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'apoptose (Orrenius 2004, Green et Kroemer 2004). De nombreux signaux pro-apoptotiques activés par divers stimuli comme les drogues chimiothérapeutiques, les récepteurs de mort, ou encore les radiations ionisantes, convergent vers cet organe cellulaire. La voie mitochondriale de l'apoptose est définie par un évènement majeur : la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, qui conduit à la libération dans le cytoplasme des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire (Figure 46). Le relargage de ces protéines est suffisant pour induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Zhivotovsky *et al.* 1998). Lors d'une irradiation, p53 est activé par les dommages de l'ADN et peut interagir lui-même avec la mitochondrie ou induire l'expression de protéines de la famille BCL-2 qui vont se localiser au niveau de la mitochondrie comme BAX, PUMA, NOXA pour induire la libération des protéines apoptogéniques.

Cependant, la mitochondrie exerce des fonctions essentielles pour la survie cellulaire, dans le métabolisme énergétique ou le maintien de l'homéostasie du calcium. Ainsi, la perte de fonction de la mitochondrie contribue également au déclenchement de la mort cellulaire. L'irradiation peut aussi causer des dommages directs aux mitochondries et induire l'apoptose par la voie mitochondriale (Battino *et al.* 1997).





### ➤ Perméabilisation membranaire

Les mécanismes responsables de l'augmentation de la perméabilisation membranaire et donc de la libération des protéines apoptotiques restent controversés. Cependant, le rôle des protéines de la famille BCL-2 est reconnu. Deux modèles ont été proposés selon l'implication de la membrane mitochondriale interne (Zamzami et Kroemer 2001).

Le premier fait intervenir le pore de transition de perméabilité (PTP). Ce pore est constitué de la translocase de nucléotides adényliques ANT dans la membrane interne et du canal anionique voltage-dépendant VDAC dans la membrane externe et

est impliqué dans l'échange d'ADP/ATP entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme. Dans une mitochondrie saine, l'imperméabilité de la membrane interne permet à la chaîne de transport des électrons de créer un gradient électrochimique appelé potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Lors de l'apoptose, la transition de perméabilité débute par une perméabilisation de la membrane interne permettant le passage de molécules de taille inférieure à 1.5 kDa. Ceci résulte en une chute du  $\Delta\Psi_m$  et à un gonflement de la matrice mitochondriale favorisant la libération des protéines apoptogéniques par le PTP (Ichas et Mazat 1998, Ly *et al.* 2003). Alternativement, la perméabilisation initiale de la membrane interne peut conduire à un gonflement important de la matrice mitochondriale et à la rupture de la membrane externe, libérant le contenu de l'espace intermembranaire (Feldmann *et al.* 2000). Les membres de la famille BCL-2, notamment BID, peuvent interagir avec le PTP et réguler sa perméabilité (Marzo *et al.* 1998, Vander Heiden *et al.* 2000, Rostovtseva *et al.* 2004). Par contre, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c peut se produire indépendamment du PTP. La libération de cytochrome c n'est pas toujours associée à la chute du potentiel mitochondrial (Kim *et al.* (b) 2000).

Le deuxième modèle de perméabilisation membranaire décrit est basé sur l'interaction directe des protéines de la famille BCL-2 au niveau de la membrane mitochondriale externe. BAX et BAK, qui présentent des similarités de structure avec les domaines d'insertion membranaire de certaines toxines bactériennes pourraient comme le font ces toxines, former des canaux dans la membrane mitochondriale. Cette hypothèse est soutenue par les travaux d'Antonsson *et al.* et de Saito *et al.* qui ont démontré la formation par BAX de pores permettant le passage du cytochrome c, dans des liposomes ou des mitochondries isolées (Antonsson *et al.* 2000, Saito *et al.* 2000).

BAX peut également s'oligomériser avec BID ou BAK et former un pore pour la libération du cytochrome c (Korsmeyer *et al.* 2000, Roucou *et al.* 2002, Mikhailov *et al.* 2003). Il a également été mis en évidence une coopération entre BAX et le canal VDAC afin de former un pore plus large (Shimizu *et al.* 2000).

Quel que soit le modèle, la perméabilisation des membranes mitochondriales est généralement considérée comme le point de non-retour dans le processus apoptotique.

➤ **Libération des protéines apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial**

L'espace intermembranaire mitochondrial regorge de protéines qui, une fois relarguées dans le cytoplasme, contribuent à l'exécution du processus apoptotique. Parmi ces molécules figurent le cytochrome c et la protéine Smac/Diablo qui interviennent au niveau de l'activité des caspases. Le cytochrome c joue un rôle clé dans l'activation de la caspase-9 par la formation de l'apoptosome. Smac/Diablo s'associe aux IAP et empêche l'inhibition des caspases (Du *et al.* 2000). Certaines procaspases (procaspases-2, -3 et -9) sont aussi séquestrées dans l'espace intermembranaire et libérées dans le cytoplasme lors de l'apoptose (Susin *et al.* (a) 1999). Le pool de procaspases mitochondriales semble dépendre du type cellulaire. D'autres protéines pro-apoptotiques, n'agissant pas sur les caspases sont également relâchées dans le cytoplasme : le facteur AIF et l'endonucléase G. L'AIF est une flavoprotéine qui après sa translocation dans le cytoplasme migre dans le noyau et induit la condensation de la chromatine et la dégradation oligonucléosomale de l'ADN (Susin *et al.* (b) 1999). Ce facteur affecte aussi la mitochondrie en provoquant une chute du potentiel membranaire mitochondrial et en favorisant la libération de cytochrome c (Candé *et al.* 2002). L'endonucléase G provoque également la dégradation de l'ADN nucléaire (Li *et al.* 2001).

➤ **Altération de la fonction mitochondriale**

La libération du cytochrome c peut conduire à une inhibition de la respiration et une dépolarisation mitochondriale. Les dommages au niveau de la chaîne respiratoire peuvent générer des radicaux oxygénés (ROS) qui sont excrétés de la mitochondrie (Pham et Hedley 2001). Ces ROS peuvent aussi être produits directement par

l'irradiation ou suite à l'activation de p53 par les dommages à l'ADN. p53 active alors des gènes entraînant la formation de ces composés au niveau de la mitochondrie (Hwang *et al.* 2001). Les espèces réactives amplifient le processus apoptotique en provoquant des lésions de la membrane mitochondriale (Fleury *et al.* 2002).

### 2.2.2. Voie des céramides

La membrane cellulaire est une cible des radiations. Les radiations ionisantes provoquent des dommages au niveau de la membrane plasmique et activent les sphingomyélinases. Ces dernières hydrolysent des phospholipides de structure de la membrane, les sphingomyélines et produisent les céramides (Figure 47). En effet, il a été clairement démontré que l'irradiation de cellules endothéliales d'aorte bovine active la dégradation enzymatique de la sphingomyéline membranaire en céramide (Haimovitz-Friedman *et al.* 1994).

Les céramides sont impliqués dans la réponse cellulaire à toute une variété de stimuli (UV, drogues chimiothérapeutiques...) (Pena *et al.* 1997). Les lymphoblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick, déficients en sphingomyélinases acides sont résistants à l'apoptose radio-induite (Santana *et al.* 1996). De même, la perte de sphingomyélinase neutre conduit également à une inhibition de la génération des céramides et de l'apoptose (Chmura *et al.* 2000). Les mécanismes responsables de l'activation des sphingomyélinases par les radiations ionisantes sont encore méconnus. Cependant, plusieurs travaux ont établi une relation entre le stress oxydatif et la production de céramides (Andrieu-Abadie *et al.* 2001). Par ailleurs, les radiations ionisantes induisent la production de céramides suite aux dommages à l'ADN. Les céramides sont alors produits par synthèse *de novo* grâce à l'activation de la céramide synthase. Récemment, il a été montré que ces deux voies de génération des céramides par les radiations ionisantes sont associées. En effet, quelques minutes après l'irradiation, les céramides sont produits par hydrolyse de la sphingomyéline des membranes. Plusieurs heures après irradiation, une seconde synthèse de

céramides se produit par un mécanisme dépendant de l'activation des céramides synthases, nécessitant la protéine ATM. Cette accumulation tardive de céramides est dépendante de la première (Vit et Rosselli 2003). Cependant, la deuxième phase de production des céramides semble être l'étape limitante pour l'induction du processus apoptotique.

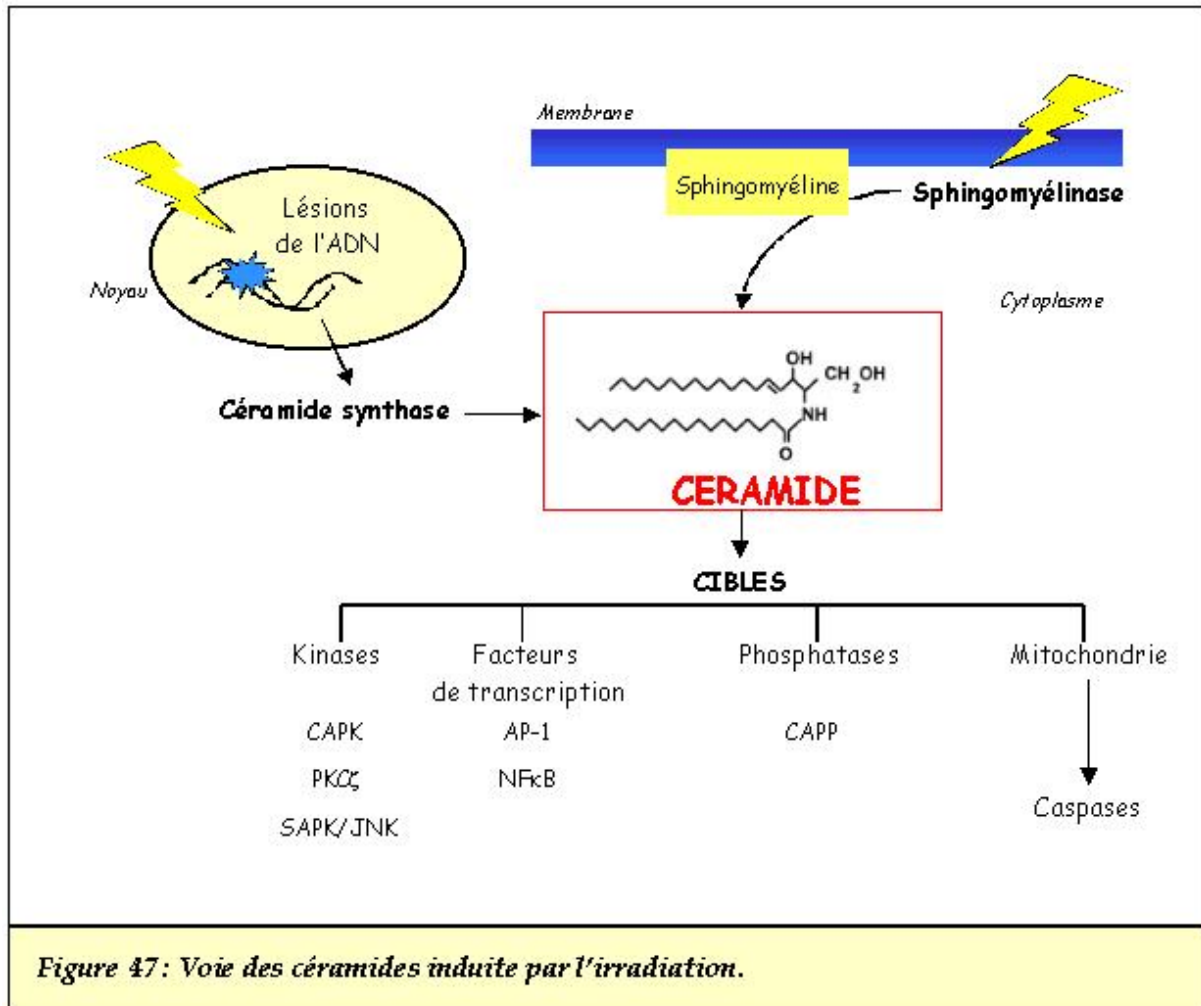


Figure 47: Voie des céramides induite par l'irradiation.

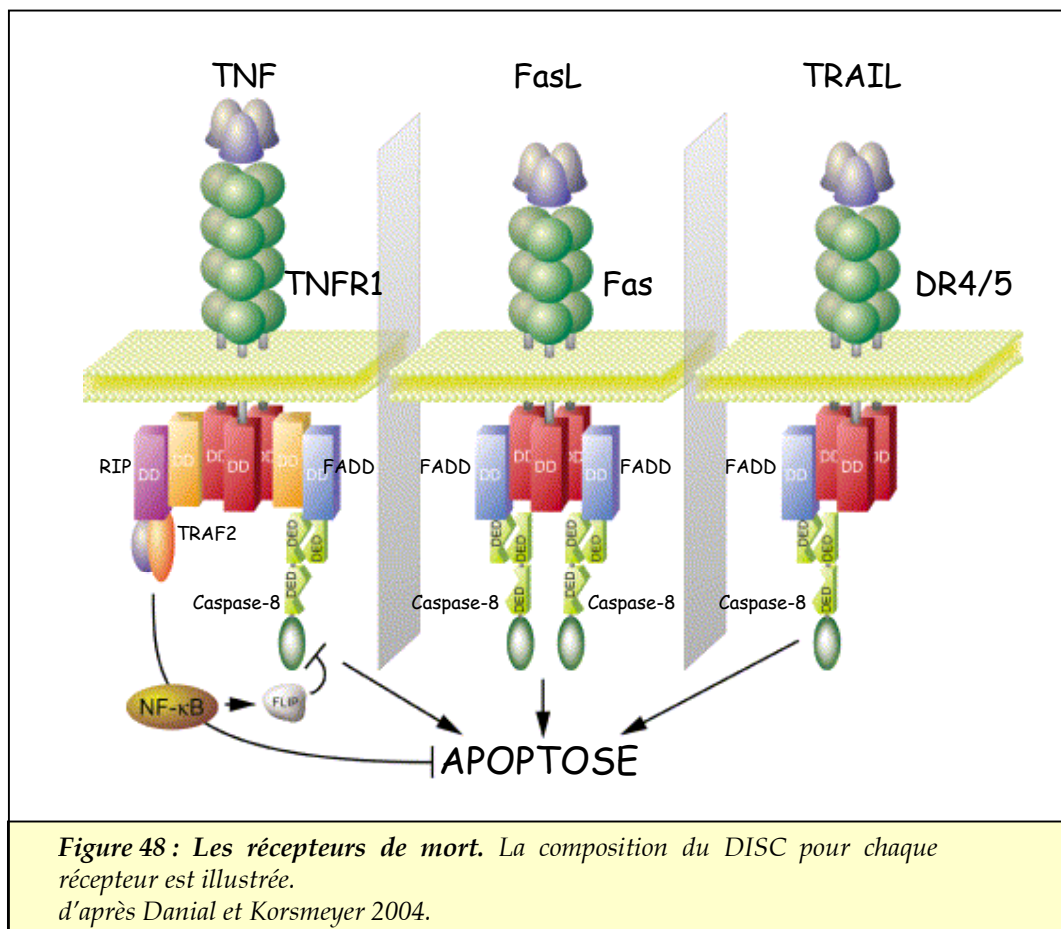
Les céramides sont des seconds messagers qui vont modifier un certain nombre de protéines cibles responsables de l'activation de différentes voies cellulaires : la kinase CAPK « ceramide-activated protein kinase », la phosphatase CAPP « ceramide-activated protein phosphatases », la PKC ξ... (Ruvolo 2003, Dobrowsky *et al.* 1993). Ces protéines contribuent au dysfonctionnement mitochondrial et à l'activation des caspases (Chmura *et al.* 2000, Alphonse *et al.* 2002) ainsi qu'à la génération de radicaux oxygénés (Quillet-Mary *et al.* 1997). Par ailleurs, elles inactivent la voie Akt/NFκB, responsable de la survie des cellules.

Les céramides conduisent également à l'activation de SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase). Déclenchée par des agressions physiques diverses (stress thermique, osmotique ou oxydatif), cette voie de transduction du signal conduit à l'apoptose indépendamment de p53. La voie SAPK/JNK est différente, voire antagoniste, de la voie MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) qui transmet un signal mitogénique. Les céramides activent la première kinase (MEKK1) de la voie SAPK/JNK aboutissant, après une cascade de phosphorylations, à l'activation de facteurs nucléaires de type AP-1, tel que c-Jun. La phosphorylation de ce dernier induit l'expression de gènes pro-apoptotiques dont le gène TNF $\alpha$  (Verheij *et al.* 1996). Une translocation de SAPK/JNK vers la mitochondrie a également été démontrée, provoquant ainsi que l'interaction de cette protéine avec BCL-X<sub>L</sub> (Kharbanda *et al.* 2000).

### 2.2.3. Voie des récepteurs de mort

Les radiations ionisantes peuvent également activer l'apoptose par la voie des récepteurs de mort. Ces récepteurs membranaires appartiennent à la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumoral TNF, dont les membres présentent un domaine extracellulaire similaire, riche en cystéines. Les récepteurs de mort contiennent également dans leur région cytoplasmique, un domaine de mort DD, qui permet le recrutement d'autres protéines possédant aussi un domaine DD, qui assurent la propagation du signal de mort induit par ces récepteurs.

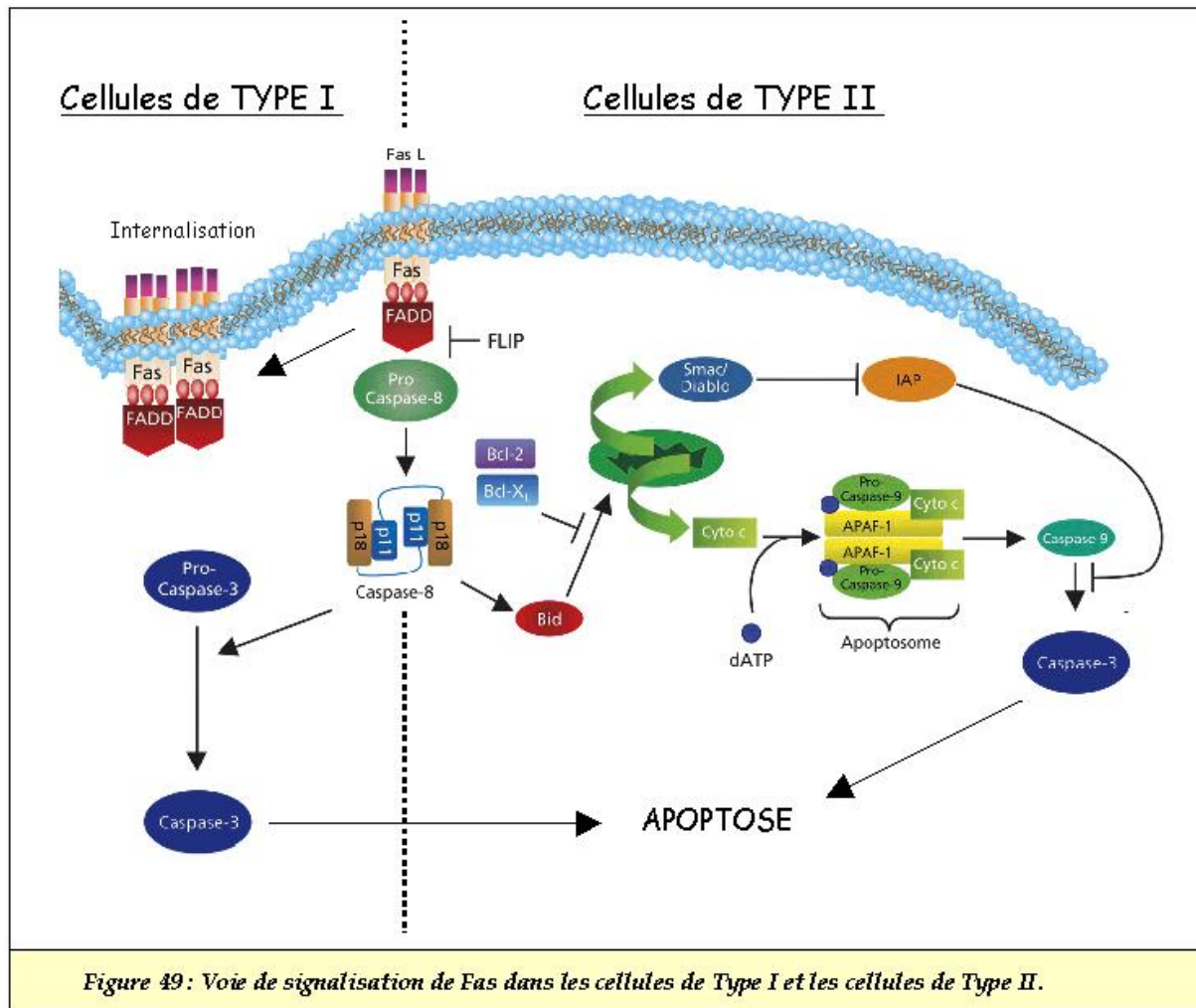
Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF et la lymphotoxine  $\alpha$ , et DR4 et DR5 qui sont les récepteurs de TRAIL (Figure 48). De plus, il existe un récepteur DR3 dont le ligand est Apo3L. L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif conduit à l'induction d'apoptose.



### ➤ La voie de Fas/FasL

La cascade d'activation de l'apoptose induite par le récepteur Fas est la plus connue (Peter et Krammer 1998), d'autant plus qu'elle joue un rôle important dans le système immunitaire (Krammer 2000). La stimulation de Fas par FasL induit un changement de conformation du récepteur qui fixe alors au niveau de sa partie cytoplasmique, la protéine adaptatrice FADD. Cette fixation se produit par interaction du domaine DD de Fas avec celui de FADD. Puis FADD qui possède également un domaine effecteur de mort DED, recrute au niveau du récepteur plusieurs procaspases-8 ou -10, par liaison de domaines homologues DED-DED, ce qui aboutit la formation du complexe de signalisation DISC. La forte concentration locale de procaspases-8 douées d'une activité catalytique basale conduit à

l'autoactivation de ces caspases. Les caspases-8 activées initient alors la cascade des caspases responsables de l'exécution du programme de mort cellulaire.



L'apoptose induite par Fas peut ensuite suivre deux voies (Figure 49, Barnhart *et al.* 2003). Dans les cellules de type I, la stimulation de Fas conduit en une fixation efficace de FADD. Cette étape est dépendante de l'actine et est suivie par un recrutement très important de procaspases-8. Les caspases-8 activées générées vont ensuite directement activer les caspases-3 permettant le clivage de nombreux substrats cellulaires. Puis plus tardivement, les récepteurs activés vont former des agrégats qui seront par la suite internalisés (Algeciras-Schimmich *et al.* 2002).



L'internalisation dépend également de l'actine (Algeciras-Schimmich et Peter 2003). Dans les cellules de type II, la formation du DISC ne nécessite pas l'actine mais est moins importante que dans les cellules de type I. De faibles quantités de caspases-8 actives sont produites et elles restent insuffisantes pour activer la caspase-3.

Les cellules de type II nécessitent une amplification mitochondriale. En effet, les caspases-8 sont capables de cliver la protéine BID. BID activée interagit avec la membrane mitochondriale et favorise la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui résulte en l'activation de la caspase-9 et successivement celle de la caspase-3. Contrairement aux cellules de type I, cette voie nécessitant l'intervention de la mitochondrie est inhibée par les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2. De plus, dans ces cellules de type II, il a été montré que les agrégats de Fas sont de plus petite taille et que leur formation est retardée. L'internalisation de ces agrégats semble se produire uniquement dans les cellules de type I. En revanche, il a été reporté récemment que la formation des agrégats se produit dans les deux types de cellules au niveau de domaines riches en lipides (« lipid rafts »). D'autres travaux ont même montré que l'internalisation de ces agrégats survient également dans les cellules de type II (Eramo *et al.* 2004).

#### ➤ Les voies des autres récepteurs

La signalisation apoptotique déclenchée par TNFR1 est plus complexe que celle de Fas et nécessite l'adaptateur TRADD. TRADD se fixe à TNFR1 par des interactions DD/DD et recrute différentes molécules au niveau du complexe du récepteur : TRAF2 et RIP qui stimulent les voies d'activation de NFκB ou de JNK/AP-1, ou FADD qui recrute la caspase-8 et conduit à l'apoptose. RIP est essentiel pour induire la voie de NFκB qui active des gènes de survie et également cFLIP qui inhibe l'activation de la caspase-8 par TNFR1 (Figure 48). TRAF2 est nécessaire pour induire la voie JNK. Le TNFR1 peut aussi recruter CRADD (RAIDD) qui se lie à RIP et fixe par son domaine CARD la caspase-2 (Duan et Dixit 1997). DR3 peut aussi activer NFκB mais lie également FADD et requiert cet adaptateur pour induire l'apoptose.

L'apoptose induite par les récepteurs de TRAIL est similaire à celle de Fas mais peut se produire en l'absence de FADD. En effet, les cellules de souris déficientes en FADD sont résistantes à l'apoptose induite par Fas, TNFR1 et DR3 mais sont sensibles à DR4. Une association entre DR4 ou DR5 et TRADD, FADD, TRAF2, RIP a également été mise en évidence. Cependant, la nécessité de ces adaptateurs pour l'activation de l'apoptose par DR4 ou DR5 reste sujet à controverse. Bien que la plupart des cellules fait intervenir les caspases-8 et -10, BID et la mitochondrie en réponse à TRAIL (Deng *et al.* 2002, Fulda *et al.* 2002), une sur-expression de BCL-2 n'inhibe pas l'apoptose induite par DR4 et DR5 dans certains types cellulaires confirmant la présence de cellules de type I dans la voie de TRAIL (Walczak *et al.* 2000, Ozoren et El-Deiry 2002).

➤ **Activation des récepteurs de mort par l'irradiation**

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle des récepteurs de mort dans l'apoptose radio-induite. En effet, le ligand Fas ainsi que TNF $\alpha$  comme radiosensibilisateurs (Kimura et Gelmann 2000). En outre, suite aux dommages de l'ADN induits par l'irradiation, p53 peut activer transcriptionnellement l'expression de Fas et ainsi induire la voie des récepteurs de mort (Semont *et al.* 2004, Embree-Ku *et al.* 2002, Sheard *et al.* 1997). Par ailleurs, p53 peut favoriser la voie de Fas après irradiation, par un mécanisme indépendant de son activité de facteur de transcription, en améliorant le transport de la protéine Fas des réserves intracellulaires jusqu'à la surface de la cellule (Bennett *et al.* 1998). L'expression de FasL peut aussi être induite par les radiations ionisantes (Abdulkarim *et al.* 2000), mais cette activation de l'expression semble être indépendante de p53 (Fulda *et al.* 1998). Certains travaux ont établi une connection entre l'induction de FasL après irradiation et la « réponse cellulaire au stress » régulée par la protéine de stress SAPK/JNK. En effet, le promoteur de FasL contient un domaine AP-1 qui peut former un complexe transcriptionnel actif après liaison du facteur nucléaire c-Jun phosphorylé suite à l'irradiation (Faris *et al.* 1998). Par ailleurs, les radiations ionisantes peuvent également provoquer l'activation de la

voie Fas en absence de FasL et sans sur-expression de Fas, par induction directe de l'agrégation des récepteurs. Il semblerait que les radicaux oxygénés produits par les rayonnements contribuent à ce regroupement de récepteurs (Huang *et al.* 2003). Cependant, d'autres équipes ont observé une induction d'apoptose par les radiations ionisantes sans l'intervention de la voie Fas (Streffer *et al.* 1999). L'implication de Fas/FasL après irradiation semble être dépendante du type cellulaire.

L'irradiation peut également activer la voie de TRAIL. Une augmentation de l'expression de DR4 et DR5 a été rapportée dans plusieurs lignées cellulaires après irradiation (Gong et Almasan 2000, Guan *et al.* 2001, Kang *et al.* 2003). En outre, cette induction des récepteurs de TRAIL semble être dépendante de p53 (Guan *et al.* 2001, Takimoto et El-Deiry 2000). Par ailleurs, la sur-expression de ces récepteurs est induite uniquement dans les cellules tumorales et non dans les cellules saines (Kim *et al.* 2001). La plupart des cellules cancéreuses semble être sensible à TRAIL alors que les cellules normales y sont résistantes.

L'utilisation de TRAIL en combinaison avec les radiations ionisantes augmente les effets apoptotiques de l'irradiation (Shi *et al.* 2003). Cette sensibilisation des cellules à l'apoptose ainsi que l'absence d'apoptose induite par TRAIL dans les cellules normales, font de l'association radiations/TRAIL une perspective prometteuse en radiothérapie (Held et Schulze-Osthoff 2001).

---

# *Matériels et Méthodes*

---

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Lignées cellulaires

Nous avons utilisé la lignée humaine lymphoblastoïde humaine TK6 (n° CRL-8015 au catalogue ATCC) exprimant une protéine p53 sauvage, et ses deux variants : WTK1 (*p53* muté au niveau du site de liaison à l'ADN, codon 237 exon 7) et NH32 dont le gène *p53* a été totalement inactivé par double recombinaison homologue (Chuang *et al*, 1999). La lignée lymphoblastoïde humaine MOLT-4 (n° CRL-1582 au catalogue ATCC), issue d'une leucémie T aiguë a également été utilisée. Les cellules TK6 et MOLT-4 proviennent de l'American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA). Les cellules WTK1 et NH32 ont été fournies par H. L. Liber. Ces cellules qui prolifèrent en suspension, sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 Glutamax (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) additionné de 10% v/v de sérum de veau fœtal (Invitrogen Corporation) inactivé par la chaleur (30 min à 56°C), 1 mM de pyruvate de sodium, 1 mM d'acides aminés non essentiels et 50 µg/ml de gentamycine (Invitrogen Corporation). Les cultures ont été maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

La concentration et la viabilité cellulaires ont été déterminées par le test d'exclusion au Bleu de Trypan et la densité cellulaire a été maintenue à une concentration inférieure à 10<sup>6</sup> cellules. Les expériences ont été réalisées après approximativement trois passages pour limiter l'instabilité chromosomique causée par le maintien des cellules en culture.

## 2 . Irradiations

La dosimétrie a été effectuée au moyen d'une chambre d'ionisation (paroi en plastique tissu-équivalent A150, volume 0,1 ml) selon le rapport 59 de l'ICRU adapté pour les ions lourds (Vynckier *et al.* 1994). Des mesures relatives ont également été effectuées par film (Kodak X-Omat V) et par dosimètres plastiques (CR39).

### 2.1. Irradiation par les rayons X

Les irradiations par rayons X ont été effectuées par les accélérateurs linéaires de type Saturne V (15 MV) au Centre Anticancéreux Paul Strauss de Strasbourg et à un débit de dose de 2 Gy/min.

### 2.2. Irradiation par les neutrons rapides

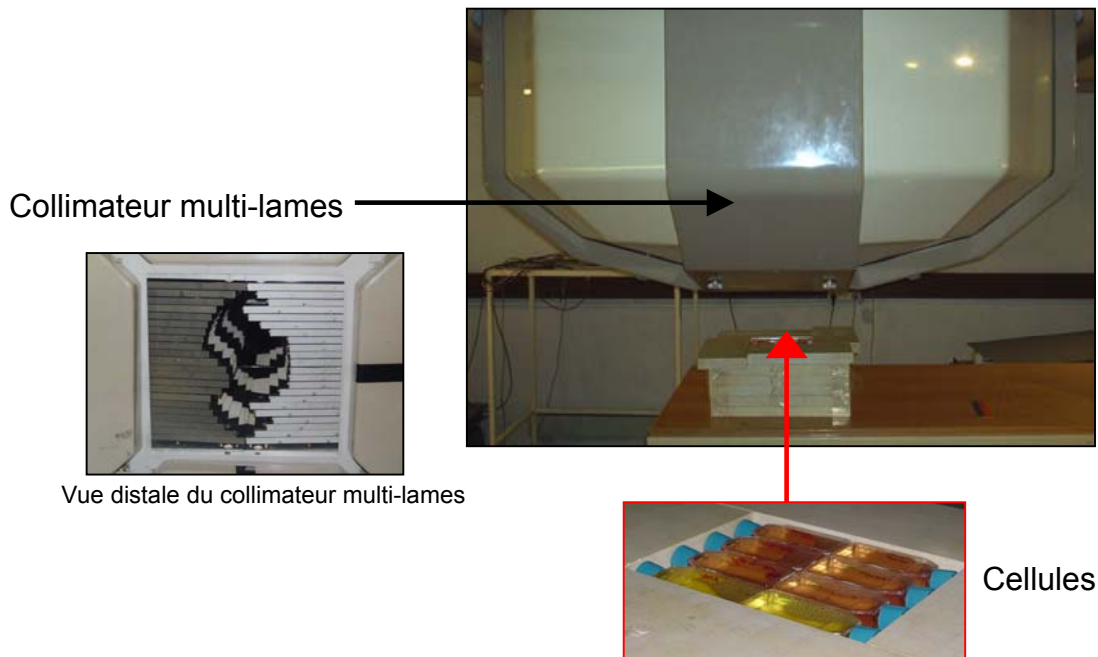
Les irradiations par neutrons rapides ont été réalisées dans l'ancienne installation de neutronthérapie au Centre de Recherche du Cyclotron (CRC) de l'Université Catholique de Louvain-La-Neuve en Belgique (Figure 50).



Figure 50 : Le Centre de Recherche du Cyclotron (CRC), Belgique.

Le faisceau de neutrons rapides est produit en bombardant une cible épaisse de béryllium avec des protons de 65 MeV accélérés par le cyclotron « CYCLONE ». Le spectre neutronique s'étendant jusqu'à 63,2 MeV a une valeur moyenne de l'ordre de 30 MeV. Les dimensions et formes finales du champ d'irradiation sont

déterminées par un collimateur multi-lames (Denis *et al.* 1996). Les doses sont délivrées en une seule fraction au débit de 0,4 Gy/min avec un TEL d'environ 10 keV/ $\mu$ M dans nos conditions d'irradiation. La Figure 51 montre le dispositif d'irradiation des cellules.



*Figure 51 : Dispositif d'irradiation des cellules par les neutrons rapides. Les flacons de culture contenant les cellules à irradier sont placés sous le collimateur multi-lames et entourés de blocs de polystyrène, pour éviter une trop grande propagation des rayons et homogénéiser la dose.*

### 2.3. Irradiation par les ions carbone

Les irradiations par les ions carbone ont été effectuées dans la salle d'irradiation G4 du GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds, Caen).

Les ions carbone 12 sont accélérés à 95 MeV/nucléon. Le TEL moyen est compris entre 30 et 50 keV/ $\mu$ M. Les cellules ont été irradiées à la concentration de  $10^7$  cellules/ml dans des tubes en plexiglas de 5 ml, placés verticalement face au faisceau d'ions carbone sur un plateau de plexiglas (Figure 52). Les mesures de dosimétrie ont montré que l'homogénéité sur le champ d'irradiation utilisé est de l'ordre de  $\pm 3\%$ .

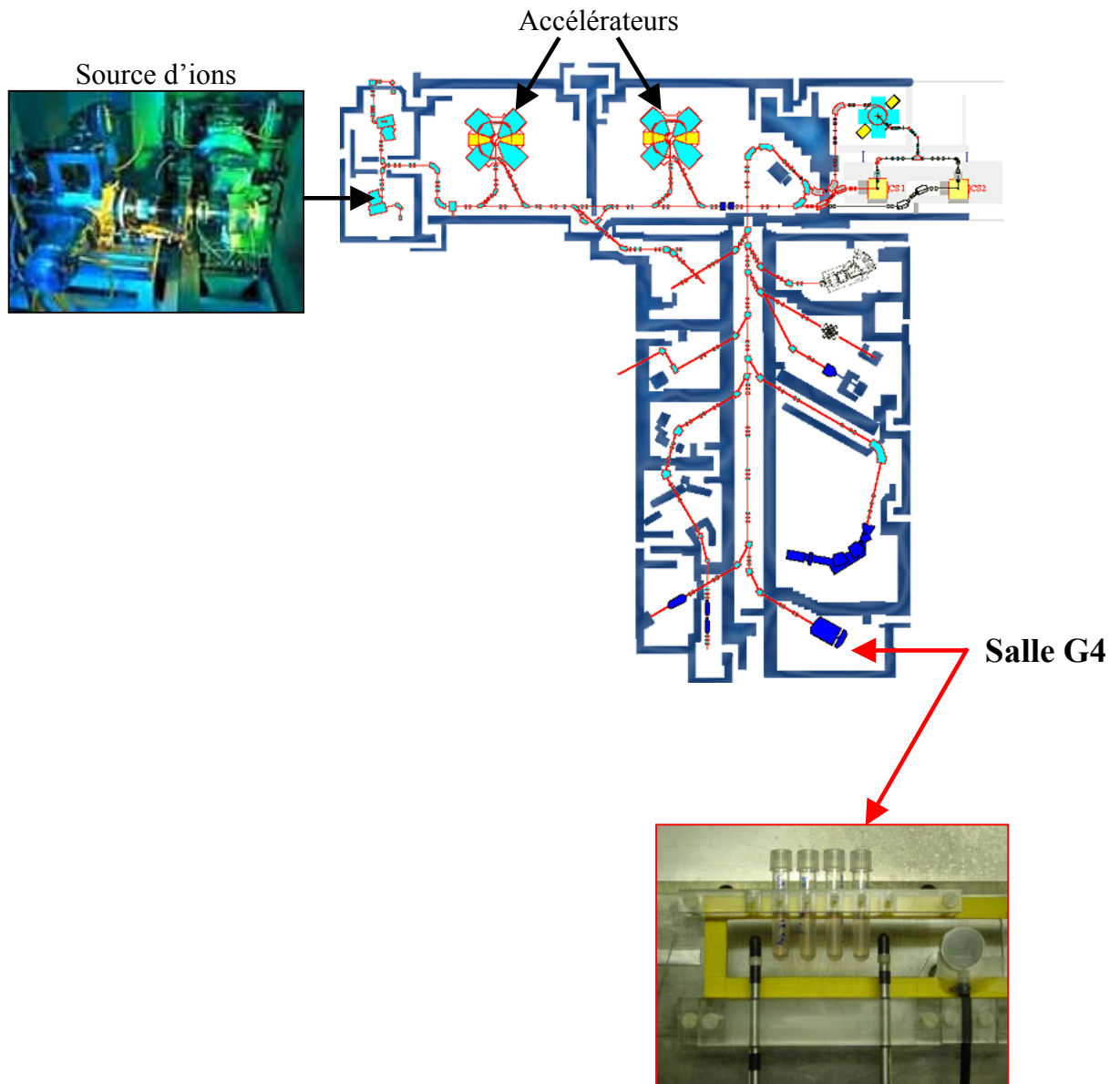


Figure 52 : Plan du GANIL avec la salle d'irradiation et le dispositif expérimental pour l'irradiation des cellules par les ions lourds.



### **3. Traitement des cellules**

#### **3.1. Traitement par l'anticorps anti-Fas CH11 ou par FasL**

250 000 cellules/ml ont été placées en microplaques de 6 puits et traitées par l'anticorps « agoniste » monoclonal anti-Fas CH11 (Immunotech Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ou avec la protéine recombinante humaine FasL (Biovision Research Products, Mountain View, CA, USA). Les plaques ont été placées à l'incubateur à 37°C.

#### **3.2. Traitement des cellules à la méthyl $\beta$ cyclodextrine**

Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de méthyl  $\beta$  cyclodextrine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1 h avant traitement (irradiation ou traitement par l'anticorps anti-Fas CH11), dans un milieu dépourvu de sérum, dans l'incubateur à 37°C.

### **4. Cytométrie en flux**

Plusieurs de nos expériences pour l'analyse de l'apoptose et des voies de signalisation cellulaire sont réalisées par des techniques de cytométrie en flux. Nous avons utilisé le cytomètre FACScan, dont le laser a une longueur d'onde de 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La cytométrie en flux permet la mesure simultanée de différents caractères physiques d'une cellule. Les cellules défilent devant un rayon laser et le cytomètre en flux enregistre la façon dont chaque cellule interagit avec le laser. L'analyse des faisceaux diffractés donne le nombre d'éléments (numération) et des informations sur la taille de la cellule (FSC-forward scatter) et sa granularité (SSC-side scatter) (Figure 53).

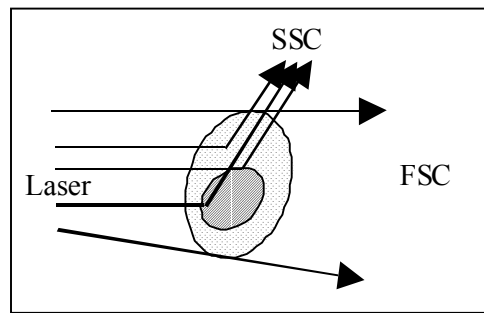


Figure 53 : Taille (FSC) et granularité (SSC) mesurées par le cytomètre.

Lorsque les cellules sont préalablement marquées par un colorant fluorescent, ce dernier est excité par le laser et l'analyse de la fluorescence émise apporte des informations supplémentaires sur les cellules selon le fluorochrome utilisé. Les données obtenues sont traitées par ordinateur et analysées à l'aide du logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

## 5. Analyse de l'apoptose

### 5.1. Mesure des particules hypodiploïdes

Lors de l'apoptose, suite à la fragmentation de l'ADN, les corps apoptotiques vont contenir une quantité d'ADN inférieure à  $2n$ . De ce fait, après un marquage à l'iodure de propidium qui est un intercalant de l'ADN, ces cellules émettent une fluorescence réduite et produisent un pic SubG0G1.

Le taux de particules hypodiploïdes a été mesuré selon la méthode décrite par Nicoletti *et al.* (Nicoletti *et al.* 1991). 500 000 cellules sont prélevées et centrifugées à 1000 rpm. Après un lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées dans 1 ml d'éthanol froid à 70% et placées à 4°C toute la nuit. Puis elles sont à nouveau centrifugées et lavées dans du PBS. Le culot est alors repris dans 1 ml de PBS contenant à 0,1 mg de RNase A (Sigma) et 0,1 mg d'iodure de propidium. Après incubation à l'obscurité et à 37°C pendant 30 min, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Après exclusion des débris, l'analyse de fluorescence de 10000

évènements permet de quantifier la proportion de cellules ayant un contenu en ADN inférieur à  $2n$ . Ces cellules sont considérées comme apoptotiques.

## 5.2. Externalisation des phosphatidylsérines

Un des critères les plus étudiés lors des phases précoces de l'apoptose est la translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. Il est possible de détecter l'externalisation de ces phospholipides anioniques par un marquage à l'annexine V-FITC, l'annexine V se fixant spécifiquement sur les phosphatidylsérines (Figure 54).

L'externalisation des phosphatidylsérines a été mesurée à l'aide du kit d'annexine V-FITC Euromedex (Souffelweyersheim, France). Les cellules ont été lavées dans du RPMI 1640 et pour chaque échantillon,  $5 \cdot 10^5$  cellules ont été reprises dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction (10  $\mu\text{l}$  de tampon de marquage 10X, 1  $\mu\text{l}$  d'annexine V-FITC et 89  $\mu\text{l}$  d'eau distillée).

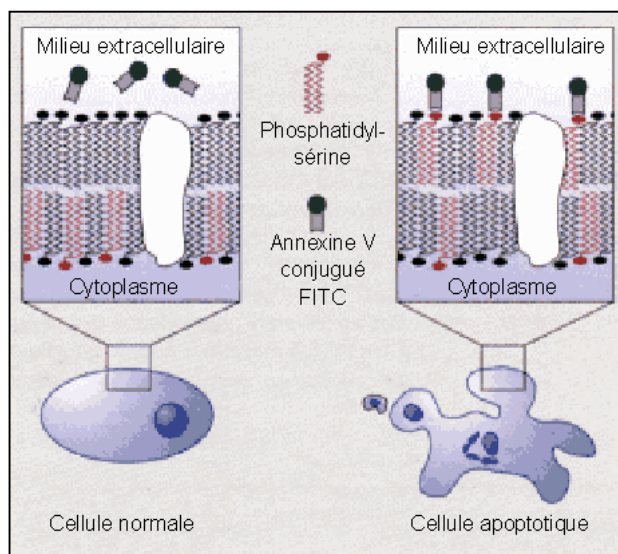


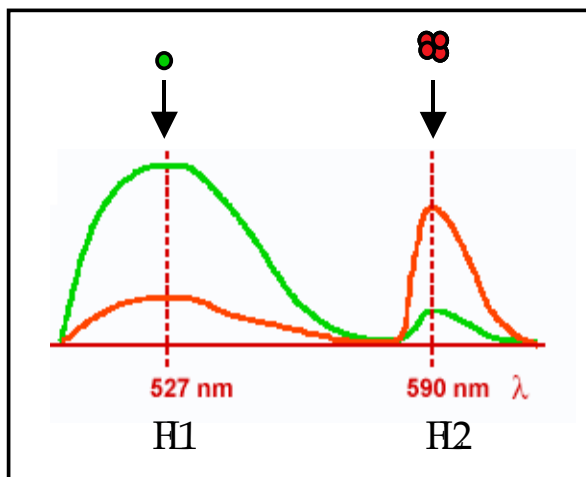
Figure 54 : Principe du marquage à l'annexine V.

Après 15 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, chaque réaction a été diluée avec du tampon de marquage 1X pour obtenir un volume final approprié (au moins 200  $\mu\text{l}$ ) pour l'analyse. Celle-ci a été effectuée immédiatement au moyen du cytomètre en flux.

## 6. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$

### 6.1. Utilisation du JC-1

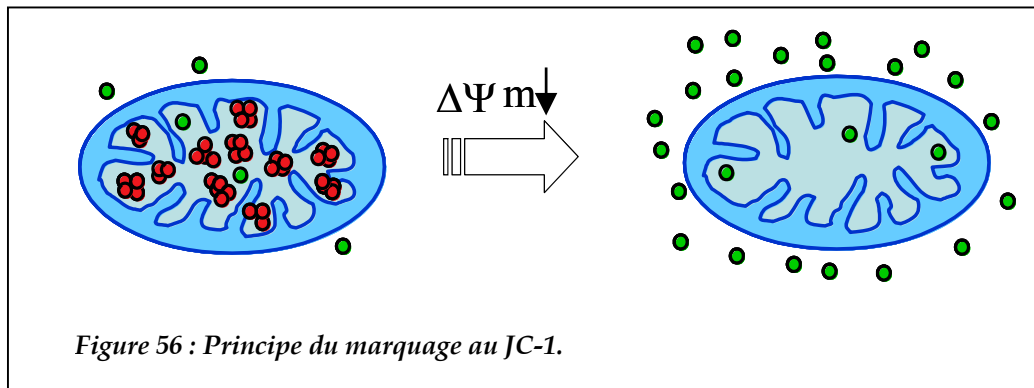
La mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  est réalisée avec le marqueur JC-1. Le JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodide) est une molécule lipophile qui fluoresce en vert sous sa forme monomérique et en rouge lorsqu'il forme des multimères (Figure 55).



*Figure 55 : Fluorescence du JC-1. Les longueurs d'onde de fluorescence de la forme monomérique (527 nm) et de la forme multimérique (590 nm) sont indiquées avec les filtres de cytométrie utilisés pour les mesurer.*

La charge négative établie par le potentiel membranaire mitochondrial permet à ce fluorochrome chargé positivement de s'accumuler dans la matrice mitochondriale. Lorsque sa concentration augmente, des agrégats se forment et fluorescent en rouge. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel mitochondrial diminue et le JC-1 ne peut s'accumuler dans la mitochondrie à une concentration suffisante. Il reste donc dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie, sous sa forme monomérique verte (Figure 56). En cytométrie en flux, la chute du potentiel mitochondrial dans les cellules en apoptose va donc être mise en évidence après marquage au JC-1 par une diminution de la fluorescence rouge et par une augmentation de la fluorescence verte (Cossarizza *et al.* 1993). Pour cette expérience, 500 000 cellules

sont prélevées, lavées au PBS et incubées pendant 15 min à 37°C en présence de 10 µg/ml de JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Après lavage au PBS, les cellules sont analysées par cytométrie en flux.



## 6.2. Utilisation de la chlorométhyl-X-rosamine

La chlorométhyl-X-rosamine (CMX-Ros) est un colorant qui est séquestré dans les mitochondries des cellules vivantes. Lors de la chute du potentiel mitochondrial pendant l'apoptose, cette molécule est libérée de la cellule. 250 000 cellules sont prélevées, lavées et incubées avec 100 nM de CMX-Ros (Molecular Probes) pendant 15 min à 37°C. Après lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Les cellules présentant une chute du  $\Delta\Psi_m$  sont mesurées par la diminution de la fluorescence rouge de CMX-Ros.

## 7. Mesure de l'activation des caspases

### 7.1. Mesure de l'activité enzymatique des caspases

La mesure de l'activité enzymatique des caspases est basée sur l'utilisation d'un substrat spécifique de ces protéases. Le clivage de ce substrat conduit à un produit

fluorescent. 500 000 cellules ont été lavées deux fois dans du PBS, puis incubées dans du tampon de lyse (HEPES 50 mM, pH 7,4, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, leupeptine 1 µg/ml, pepstatine 1 µg/ml, aprotinine 1 µg/ml, PMSF 0,5 mM, Nonidet P40 1%) dans la glace pendant 20 min. Les lysats ont été centrifugés à 10 000 g pendant 20 min à 4°C et les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. 20 µl de chaque surnageant ont ensuite été incubés à 37°C, pendant 1 h, avec 70 µl de tampon de réaction (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS 0,1%, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, glycérol 10%) et 10 µl de substrat peptidique : Ac-DEVD-amc, Ac-IETD-amc ou Ac-LEHD-amc (Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA), selon l'activité caspase mesurée. La fluorescence des échantillons a ensuite été mesurée à 450 nm (excitation : 350 nm), à l'aide du lecteur de microplaques Fluorolite 1000.

## **7.2. Mesure de l'activation de la caspase-3 par cytométrie en flux**

Les caspases sont synthétisées sous forme de proenzymes et sont activées par clivage lors de l'apoptose. Un anticorps dirigé contre la forme active de l'enzyme et couplé à un fluorochrome permet d'identifier par cytométrie en flux les cellules présentant l'activation d'une caspase donnée, après perméabilisation de ces cellules. Nous avons mesuré l'activation de la caspase-3 par cytométrie en flux avec le kit « FITC-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis kit I » (BD Biosciences Pharmingen, Becton Dickinson), selon les instructions du fabricant. Brièvement, après lavage avec du PBS froid, les cellules sont fixées et perméabilisées dans le tampon Cytotfix/Cytoperm fourni pendant 20 min dans la glace. Ensuite, les cellules sont lavées et incubées avec l'anticorps anti-caspase-3-active 30 min à température ambiante. Puis, après lavage, elles sont analysées par cytométrie en flux.

### **7.3. Inhibition des caspases**

Les cellules ont été traitées 1 h avant l'irradiation par les inhibiteurs réversibles Ac-DEVD-CHO (caspase-3 et -7), Ac-IETD-CHO (caspase-8) et Ac-LEHD-CHO (caspase-9) à la concentration de 200  $\mu$ M, ou par l'inhibiteur irréversible à large spectre d'action z-VAD-fmk à 50  $\mu$ M. Ces réactifs proviennent de Neosystem (Strasbourg) ou de Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, USA).

## **8. Quantification de la nécrose par mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH)**

La nécrose est mise en évidence par l'activité lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire. Les cellules en nécrose sont caractérisées par une perméabilisation précoce de la membrane et une destruction des organites ce qui conduit à un relargage dans le milieu de la LDH. L'activité LDH a été mesurée dans le surnageant, après centrifugation des cellules irradiées, avec le kit Cytotoxicity Detection (Boehringer Mannheim, Meylan, France) et selon les instructions du fabricant. La lecture a été faite à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaques MRX (Dynex Technologies, Issy-les-Moulineaux) et les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité mesurée dans les échantillons contrôles.

## **9. Extraction protéique et Western Blot**

Les cellules ont été lavées dans du PBS, puis reprises dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, EDTA 5 mM pH 8, EGTA 0,5 mM, leupeptine 10  $\mu$ g/ml, pepstatine 10  $\mu$ g/ml, aprotinine 10  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, NaCl 250 mM, Nonidet P40 1%) pendant au moins 20 min à 4°C et centrifugées à froid à 10 000 g pendant 20 min. Le surnageant contenant les protéines a été récupéré et un petit volume a été prélevé pour le dosage protéique (méthode BCA,

Pierce, Rockford, IL, USA). Le contenu en protéines de  $3 \cdot 10^6$  cellules (ou 20  $\mu\text{g}$  de protéines) a été déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 15% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose, après électrophorèse. Les membranes ont été incubées pendant la nuit, à 4°C sous agitation dans du tampon TBST (Tris pH 7,5 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%) contenant 3% de BSA. Elles ont ensuite été incubées 1h à température ambiante dans une solution d'anticorps primaires, puis lavées 3 fois 10 min dans du tampon TBST avant d'être incubées 1 h dans une solution d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) à la dilution de 1/50 000. Après 3 lavages de 10 min dans du TBST et 2 min dans du tampon sans Tween 20, la révélation chimioluminescente a été réalisée avec le kit SuperSignal (Pierce). L'intensité des bandes a été mesurée à l'aide de l'analyseur d'images GelDoc et le logiciel QuantityOne (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Les anticorps dirigés contre les différentes protéines humaines sont : l'anticorps de souris anti-CPP32 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) dirigé contre la procaspase-3 à la dilution de 1/20 000, l'anticorps de lapin anti-procaspase-9 (BD Biosciences Pharmingen) au 1/10 000, l'anticorps de souris anti-procaspase-8 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) au 1/50 000, l'anticorps de souris anti-procaspase-7/MCH-3 (Transduction Laboratories) au 1/20 000, l'anticorps de lapin anti-Bid (Cell Signaling Technology) au 1/1000, l'anticorps de souris anti-Fas/CD95 (BD Biosciences Pharmingen) au 1/10000, l'anticorps de souris anti-FasL (BD Biosciences Pharmingen) au 1/10000, et l'anticorps de souris anti-cytochrome c (BD Biosciences Pharmingen) au 1/1000.

Pour l'étude de la libération du cytochrome c par la mitochondrie, la séparation des fractions mitochondriale et cytoplasmique des cellules a été réalisé à l'aide du kit : « Mitochondria/Cytosol fractionation kit » (Alexis Biochemicals, Lausanne, Suisse), suivant les instructions du fabricant. Brièvement,  $5 \cdot 10^7$  cellules sont prélevées, lavées dans du PBS et incubées dans le tampon d'« extraction cytoplasmique ». Après homogénéisation, les lysats sont centrifugés à 700 g



pendant 10 min à 4°C puis les surnageants récupérés sont recentrifugés 30 min à 10000 g. Le surnageant obtenu constitue la fraction cytoplasmique et le culot remis en suspension dans le tampon d'« extraction mitochondriale » représente la fraction mitochondriale.

## **10. Tests de prolifération et de survie clonogénique**

### **10.1. Test de Prolifération UptiBlue**

Ce test de prolifération utilise le réactif UptiBlue (Interchim, Montluçon, France), métabolisé par les cellules viables. Après irradiation, les cellules sont placées en plaques de 96 puits à 2000 cellules/puits (200 µl) et cultivées pendant 2 ou 4 jours. Puis 20 µl d'UptiBlue sont ajoutés dans chaque puits. Après incubation durant 4 heures, la fluorescence des échantillons contenus dans les plaques a été mesurée à 590 nm (excitation : 560 nm), à l'aide d'un lecteur de microplaques Fluorolite 1000 (Dynex Technologies, Issy-Les-Moulineaux, France).

### **10.2. Survie clonogénique**

La survie des cellules c'est-à-dire leur capacité à former des colonies, ou clonogénicité, a été évaluée dans un milieu plasmatique semi-solide. Après irradiation, les cellules ont été lavées dans du RPMI 1640 et mises en culture dans des boîtes de Pétri à une concentration variant de 100 à 10<sup>6</sup> cellules par boîte, selon la dose d'irradiation de façon à obtenir de 100 à 150 colonies. Le milieu utilisé contient du RPMI 1640 à 50%, du sérum de veau foetal à 10%, de la pénicilline/streptomycine à 1%, et de la méthylcellulose (Invitrogen Corporation) à 40%. Après 10 jours de culture, le nombre de colonies a ensuite été déterminé.

### **10.3. Test CFSE**

Le test CFSE (5(et 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) permet de quantifier la division des cellules. Il se fixe aux protéines cellulaires irréversiblement et lorsque les cellules se divisent, il est distribué également entre les cellules filles. Ces dernières seront caractérisées par une fluorescence deux fois moins importante que celle de la cellule mère. Ainsi, par diminution de la fluorescence, le nombre de divisions cellulaires après irradiation peut être quantifié. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Lyons (Lyons 2000). Les cellules sont d'abord marquées par le CFSE (Molecular Probes) à 10  $\mu$ M. Puis les cellules sont irradiées et replacées en culture. A différents temps après irradiation, les cellules sont prélevées et lavées pour l'analyse par cytométrie en flux. Nous avons effectué une étude biparamétrique (division cellulaire et apoptose) avec marquage des cellules au CFSE et à la CMX-Ros. Le marquage à la CMX-Ros est alors réalisé après irradiation. La fluorescence verte émise par le CFSE et la fluorescence rouge émise par la CMX-Ros sont analysées simultanément.

## **11. Etude de l'expression de Fas/FasL et de l'agrégation des récepteurs Fas**

### **11.1. Analyse de l'expression de Fas et FasL par cytométrie en flux**

$1.10^6$  cellules ont été prélevées et marquées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-Fas-FITC (clone DX2, BD Biosciences Pharmingen) ou avec l'anticorps monoclonal de souris anti-FasL-PE (clone Alf-2.1a, Alexis Biochemicals) pendant 45 min à 4°C. Après deux lavages, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Un deuxième marquage avec les anticorps de contrôle isotype : anti-IgG1-FITC (Dakocytomation, Glostrup, Danemark) et anti-IgG1-PE (Immunotech Beckman Coulter) ont été réalisés pour contrôler les fixations aspécifiques des anticorps.

## **11.2. Détection des agrégats de Fas et immunofluorescence**

La détection des agrégats de Fas a été réalisée après traitement à l'anticorps anti-Fas et après irradiation. Pour le traitement à l'anticorps anti-Fas, le même anticorps est utilisé pour le traitement des cellules et pour leur visualisation par microscope. Ainsi, 250 000 cellules ont été incubées avec 20 µl d'anticorps anti-Fas-FITC (BD Biosciences Pharmingen) pendant 45 min dans la glace pour la fixation de l'anticorps sur les récepteurs Fas. Après lavage au PBS, les cellules ont été placées dans l'incubateur à 37°C pour permettre la stimulation des récepteurs par l'anticorps et l'activation de la voie Fas. Puis après différents temps, les cellules ont été visualisées sous microscope à fluorescence.

Après irradiation, 250 000 cellules ont été marquées par l'anticorps anti-Fas-FITC pendant 45 min dans la glace. Les anticorps non fixés ont été ensuite éliminés par lavage dans du PBS à 4°C. Puis les cellules ont été placées entre lame et lamelle et visualisées sous microscope à fluorescence Eclipse E1000 (Nikon Corporation, Japon).

Les cellules présentant des agrégats de Fas ont été dénombrées pour chaque échantillon.

## **12. Mesure de l'activation de p53 par cytométrie en flux**

L'activation de p53 est mesurée avec un anticorps spécifique de cette protéine, couplé au fluorochrome FITC. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-p53-FITC (Dakocytomation), suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 50000 cellules ont été prélevées, fixées et perméabilisées dans 2 ml de PBS contenant 1% de paraformaldéhyde pendant 5 min puis dans 1 ml de méthanol pendant 10 min. Après centrifugation, les cellules ont été incubées 30 min avec l'anticorps anti-p53-FITC à 4°C. Après lavage, l'analyse des cellules a été réalisée par cytométrie en flux.

## **13. Analyse de l'expression différentielle des gènes par tests d'hybridation d'ADNc : technique de « cDNA expression arrays »**

### **13.1. Extraction des ARN**

L'extraction des ARN a été effectuée avec le kit « Rneasy Mini Kit » (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. La manipulation est expliquée dans la Figure 57. Au total, nous obtenons un volume de 30 µl d'ARN extraits qui sont conservés à -80°C.

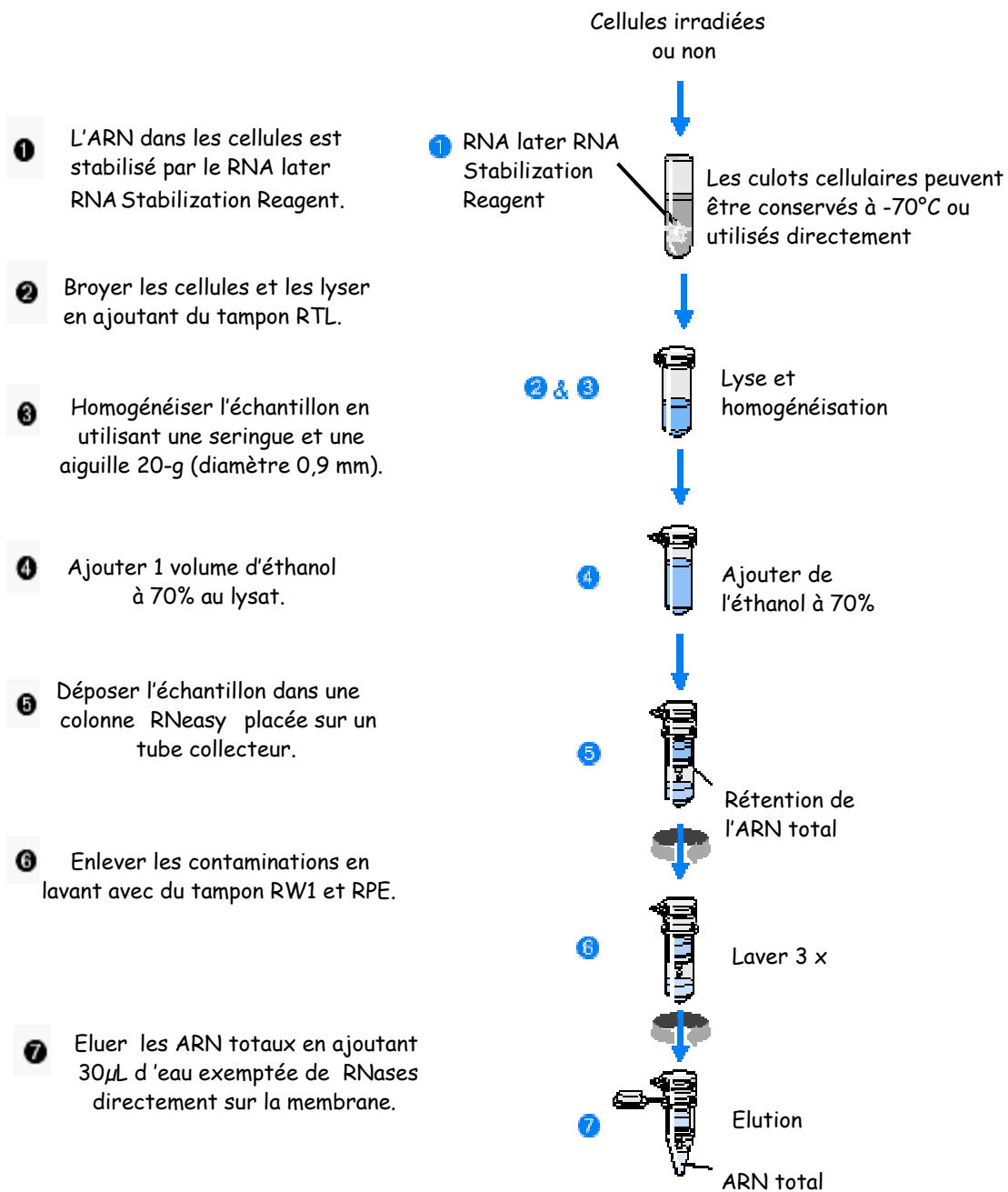


Figure 57 : Protocole d'extraction des ARN totaux (Qiagen).

La concentration d'ARN obtenue a ensuite été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Gene Quant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech, Saclay, France).

### 13.2. Analyse de la qualité des ARN

Afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination par des protéines, le rapport entre l'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 280 nm est calculé. Il doit être compris entre 1,8 et 2,2. La contamination protéique diminue ce rapport.

Dans un deuxième temps, nous avons déposé les ARN extraits (2 µg/puits) sur un gel dénaturant de formaldéhyde à 1% d'agarose pour vérifier qu'ils n'ont pas été dégradés durant l'extraction. L'intensité des bandes nous permet également de confirmer nos concentrations d'ARN mesurées.

### 13.3. « cDNA expression arrays »

Afin de comparer les transcriptômes des cellules TK6 et NH32, irradiées et non irradiées, nous avons utilisé la technique d'hybridation cDNA expression arrays sur membranes de nylon.

Les ARNs extraits de nos cellules sont synthétisés en cDNA marqués au <sup>32</sup>P par transcription inverse en utilisant des amorces spécifiques de gènes impliqués dans l'apoptose (et présents sur la membrane). Les sondes marquées sont ensuite hybridées sur une membrane contenant des spots de cDNA représentatifs de 205 gènes connus déposés en doublet : Atlas Human Apoptosis Array (Clontech, Le Pont de Claix, France). La liste des gènes présents sur les membranes peut être consultée sur le site [www.clontech.com](http://www.clontech.com).

#### 13.3.1. Synthèse des sondes radioactives à partir de l'ARN total

Tout d'abord, les amorces sont hybridées avec l'ARN. Dans deux tubes de 0,5 mL, on prélève pour chaque échantillon, 5 µl d'ARN total et 1 µl d'amorces (CDS primer cDNA synthesis primer mix). Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur (Eppendorf, Le Pecq, France) où ils vont être soumis à différents paliers de température : 2 min à 70°C pour l'hybridation et 2 min à 50°C pour

stopper la réaction. Puis ces ARN sont ajoutés au tampon de réaction de la reverse transcription contenant 4 µl de tampon, 2 µl de dNTP, 5 µl de dAT<sup>32</sup>P, 1 µl de DTT (100 mM) et 2 µl de reverse transcriptase. Ce mélange est incubé 25 min à 50°C pour la réaction d'élongation, où l'ADNc radiomarqué est synthétisé.

La réaction est stoppée par l'ajout de 2 µl de solution d'arrêt. La solution de sondes radioactives d'ADNc obtenue peut être conservée quelques heures dans la glace à 4°C.

### 13.3.2. Purification des sondes radioactives par chromatographie sur colonne

Cette étape permet d'éliminer les nucléotides marqués au <sup>32</sup>P non incorporés dans l'ADNc, ainsi que les petits fragments d'ADNc (inférieur à 0,1 kb). Pour cela, la solution de sondes radioactives est diluée afin d'obtenir un volume final de 200 µl qui est placé sur une colonne de chromatographie « Nucleospin Extraction Spin ». Après plusieurs lavages et centrifugation, les ADNc purifiés sont élués avec du tampon d'éluion « NE ». Un compteur Geiger est utilisé pour estimer la radioactivité des sondes.

### 13.3.3. Hybridation des sondes radioactives sur les membranes Atlas Arrays

La pré-hybridation consiste à incuber pendant 30 min à 68°C à 6 rpm, 5 ml d'une solution d'hybridation auxquels on ajoute 0,5 mg d'ADN de saumon préalablement dénaturé à 95-100°C pendant 5 min, pour saturer les sites non-spécifiques de la membrane.

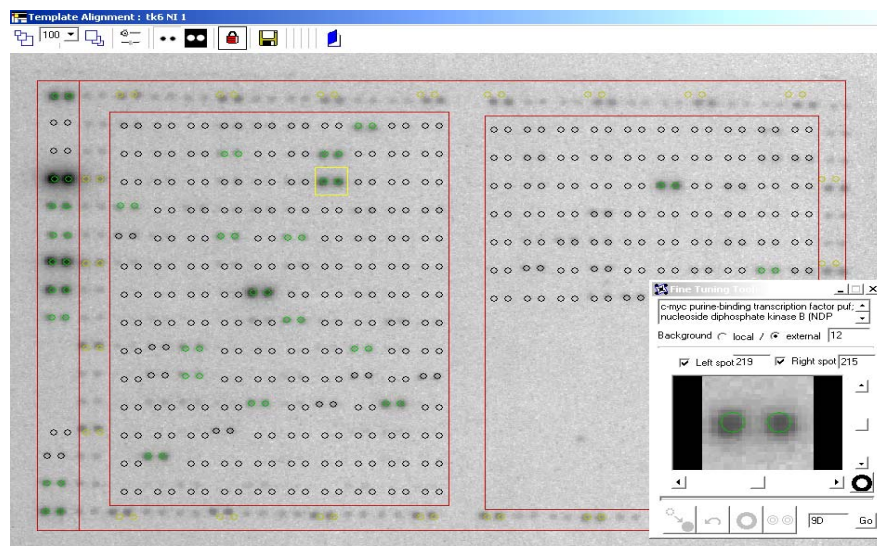
Après la pré-hybridation, on ajoute 5 µl de Cot-1 ADN sont ajoutés à la solution de sondes marquées, pour masquer les séquences répétitives. Le tout est placé 2 min dans un bain-marie à 100°C puis 2 min dans la glace. On ajoute ensuite ce mélange à la solution de pré-hybridation dans les tubes. On laisse hybrider toute la nuit sous agitation (6 rpm), à 68°C dans le four à hybridation. L'ADNc de nos échantillons va s'hybrider avec l'ADNc des différents gènes fixés sur la membrane.

### 13.3.4. Révélation des membranes

Après l'hybridation, différents lavages de haute stringence sont effectués pour éliminer l'ADNc non hybridé de manière spécifique : quatre lavages de 30 min à 68°C avec 150 ml/tube de solution de lavage (2× SSC, 1% SDS), un lavage de 30 min à 68°C avec 150 ml/tube de solution de lavage (0,1× SSC, 0,5% SDS), et un lavage 5 min à température ambiante avec 150 ml/tube de solution de lavage 2× SSC. Ensuite, les membranes sont placées dans une cassette. Après trois jours, les signaux émis par les sondes marquées hybridées sont lus à l'aide d'un phosphorimager, qui donne une image en niveaux de gris des signaux émis.

### 13.3.5. Analyse des résultats par le logiciel AtlasImage 1.01

Pour le traitement de l'image obtenue et la quantification des signaux, nous utilisons le logiciel AtlasImage 1.01 (Clontech). Ce dernier permet d'appliquer aisément sur l'image une « grille » prédéterminée selon le type de membrane utilisée, afin de définir les zones de présence des signaux (Figure 58).



**Figure 58 : Alignement de la grille de détection des signaux.** A gauche, la grille alignée, à droite, l'outil de centrage précis des points. (logiciel AtlasImage 1.01)



Pour la quantification des signaux, divers paramètres sont à déterminer. Premièrement, il faut définir le bruit de fond. Il peut être global, c'est-à-dire défini par l'intensité moyenne détectée sur les zones de la membrane dépourvues de point, ou local défini manuellement pour chacun des signaux. Puis, il faut déterminer le niveau minimum d'intensité, qui correspond à l'intensité minimale du signal qui sera nécessaire pour qu'il soit pris en compte dans la quantification. Seuls sont considérés dans nos expériences les signaux dont l'intensité est deux fois supérieure au bruit de fond. Le logiciel AtlasImage compare dans un deuxième temps deux à deux les signaux situés à la même position sur deux membranes différentes. Pour cette analyse, la normalisation des signaux obtenus sur les deux membranes est le premier paramètre qui doit être configuré par l'utilisateur, ceci afin de compenser une hybridation globalement plus forte sur une des deux membranes. La normalisation peut se faire gène par gène en s'appuyant alors sur un ensemble de gènes dont les intensités sont égales sur les deux membranes (gènes domestiques) ou elle peut être globale en se basant sur la somme ou la médiane de l'ensemble des signaux détectés sur chaque membrane. Dans nos expériences, nous avons comparé nos membranes en utilisant la normalisation globale par la somme.

Le logiciel donne ensuite la liste des gènes dont l'expression est modifiée entre les deux membranes et leurs intensités respectives.

## **14. Analyse statistique**

Le test Student t a été utilisé pour mesurer les différences entre les groupes expérimentaux.

---

# *Résultats*

---

## PRESENTATION DES RESULTATS

La majorité des données concernant l'apoptose radio-induite a été obtenue avec des rayons X ou  $\gamma$ . Peu d'informations sont actuellement disponibles quant aux mécanismes impliqués dans l'apparition de ce type de mort cellulaire en réponse aux radiations à TEL élevé. Par ailleurs, comme ces radiations induisent des dommages plus complexes et moins facilement réparables que les radiations à faible TEL, on peut s'attendre à ce que les voies initiant le processus apoptotique, suite à l'irradiation diffèrent entre ces deux types de rayonnements. Ainsi, l'objectif général de ce travail était de parvenir à identifier les mécanismes cellulaires qui régissent l'induction de l'apoptose par ces rayonnements à TEL élevé, en particulier les neutrons rapides et les ions carbone, dans des cellules tumorales humaines. Un objectif plus spécifique a été de déterminer la contribution du gène suppresseur de tumeur *p53* dans la réponse à l'irradiation.

Dans ce but, nous avons utilisé la lignée lymphoblastoïde humaine TK6, ainsi que deux de ses variants dans lesquels la protéine p53 n'est pas fonctionnelle. Ces cellules ont été irradiées par des rayons X de 15 MV, générés par des accélérateurs linéaires du Centre Paul Strauss (Strasbourg), par des neutrons rapides de 65 MeV/nucléon, produits au Cyclotron de Louvain-la-Neuve (Belgique) ou par des ions carbone de 95 MeV/nucléon, produits au GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds, Caen).

Les résultats obtenus au cours de nos expériences sont présentés en deux parties. La première partie concerne l'apoptose induite par les neutrons rapides. Après avoir comparé les effets de ces radiations à ceux des rayons X sur nos lignées cellulaires, nous avons mis en évidence l'activation par les neutrons rapides de deux voies apoptotiques distinctes selon le statut p53 des cellules. Nous nous sommes ensuite efforcés de déterminer les différents mécanismes impliqués dans le déclenchement

des deux voies de signalisation apoptotiques, en étudiant les caspases activées et en évaluant le rôle de la mitochondrie ainsi que l'implication du récepteur Fas dans l'initiation de l'apoptose. Nous avons enfin étudié l'expression des gènes après irradiation, afin d'identifier d'autres protéines qui pourraient être impliquées dans la réponse de nos lignées lymphoblastoïdes aux neutrons rapides.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'induction d'apoptose par les ions carbone. Nous avons également évalué l'influence du statut p53 dans le déclenchement de l'apoptose et nous avons essayé de déterminer si le modèle de signalisation obtenu pour l'apoptose induite par les neutrons rapides s'applique également à celle induite par les ions carbone.

En conclusion, ces travaux apportent des données nouvelles concernant l'induction de l'apoptose par les radiations ionisantes à TEL élevé et démontrent clairement pour la première fois l'implication de p53 dans l'apoptose induite par ce type de rayonnements.

**1<sup>ère</sup> PARTIE :**

ETUDE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE DE  
L' APOPTOSE INDUITE PAR LES NEUTRONS RAPIDES DANS  
DES CELLULES LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES  
DIFFERANT PAR LEUR STATUT P53

## Chapitre 1

# ROLE DE P53 DANS L'APOPTOSE INDUITE DANS DES LIGNEES LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES PAR DES NEUTRONS RAPIDES

### RESUME

Nous avons étudié le rôle de p53 dans l'apoptose induite par les neutrons rapides. Pour cela, trois lignées cellulaires lymphoblastoïdes dérivant du même donneur et différant dans leur statut p53 : TK6 (p53 +/+), WTK1 (p53 muté) et NH32 (p53 -/-) ont été irradiées par des rayons X ou des neutrons rapides. Nous avons mis en évidence que les neutrons rapides sont plus efficaces que les rayons X, pour déclencher l'apoptose dans ces lignées cellulaires. De plus, l'induction d'apoptose varie aussi suivant le statut p53 des cellules. En effet, l'étude de l'apoptose en cytométrie en flux, par la mesure de l'externalisation des phosphatidylsérines ou de la formation des particules hypodiploïdes, montre que les neutrons induisent massivement et rapidement l'apoptose dans les cellules TK6. Par contre, en l'absence de p53 fonctionnel, dans les cellules WTK1 et NH32, l'induction de cette mort cellulaire est plus faible et retardée. Cependant une activité caspase-3 a été décrite dans les trois lignées après irradiation. Ces données suggèrent que les neutrons rapides activent l'apoptose suivant deux voies distinctes : une voie rapide et dépendante de p53 et une voie indépendante de p53, plus lente, mais faisant elle-aussi intervenir les caspases. Les tests de prolifération cellulaire et de survie clonogénique indiquent que les neutrons rapides peuvent néanmoins tuer efficacement les cellules WTK1 et NH32. En conclusion, l'efficacité biologique relative (EBR) élevée des neutrons rapides pourrait être due à une mort clonogénique plus importante ainsi qu'à une capacité accrue d'induction d'apoptose. Ces résultats ont été publiés dans le journal *Radiation Research* (Coelho *et al.* *Radiation Research* 2002).

## 1. INTRODUCTION

La protéine suppresseur de tumeur p53 apparaît comme un régulateur clé de la réponse aux radiations ionisantes (Fei et El-Deiry 2003). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'intervention de cette protéine dans l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose observés après exposition aux radiations ionisantes (Dulic *et al.* 1994, Lowe *et al.* 1993). En effet, une perte de fonction de cette protéine entraîne en général et surtout dans les cellules hématopoïétiques, une diminution importante de la capacité des cellules tumorales à entrer en apoptose suite à une irradiation, conduisant par conséquent à une résistance accrue à la radiothérapie (Dewey *et al.* 1995, Nakano *et al.* 2001). Contrairement à ces données sur les rayons X ou gamma, et bien qu'il ait été montré que les neutrons rapides induisent l'apoptose dans les tissus tumoraux, peu d'informations existent quant au rôle de p53 dans le déclenchement de ce type de mort cellulaire, après exposition à ces rayonnements de TEL élevé.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer le rôle de p53 dans l'induction d'apoptose par les neutrons rapides et son influence sur la radiosensibilité des cellules tumorales humaines. Nous avons également tenté d'identifier les caspases impliquées dans ce processus.

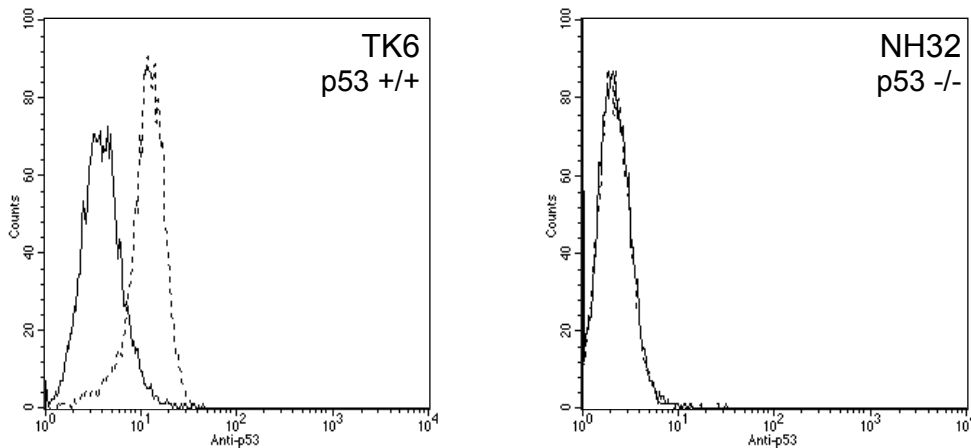
Dans ce but, trois variants d'une même lignée lymphoblastoïde humaine différant par leur statut p53, TK6 (p53 sauvage), WTK1 (p53 muté) et NH32 (p53 délété) ont été irradiés par des rayons X ou par des neutrons rapides à des doses comprises entre 2 et 8 Gy (Chuang *et al.*, 1999). L'apoptose a été quantifiée par cytométrie en flux et l'activité des caspases a été déterminée par des tests enzymatiques. Nous avons mesuré la radiosensibilité des cellules irradiées par des tests de prolifération et par clonogénicité.

Nos résultats montrent que pour une même dose d'irradiation, les neutrons rapides sont plus efficaces que les rayons X en terme d'induction de l'apoptose et que p53 joue un rôle dans l'induction de ce type de mort cellulaire. En outre, les tests de survie indiquent que contrairement aux rayons X, le statut p53 des cellules lymphoblastoïdes détermine leur sensibilité face aux neutrons rapides.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Expression de p53 après irradiation

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression de p53 dans les cellules TK6 et son absence dans les cellules NH32. Pour cela, nous avons irradié ces deux lignées par des rayons X à 8 Gy. Huit heures après irradiation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-p53 couplé au fluorochrome FITC et analysées en cytométrie en flux. Les résultats présentés dans la Figure 59 font apparaître une accumulation de p53 dans les cellules TK6 après irradiation, comme le montre le décalage vers la droite du pic de fluorescence après 8 Gy. Par contre, dans les cellules NH32, la superposition des deux pics, avant et après irradiation montre l'absence d'induction de p53 par les rayons X et confirme le statut p53 -/- de cette lignée.



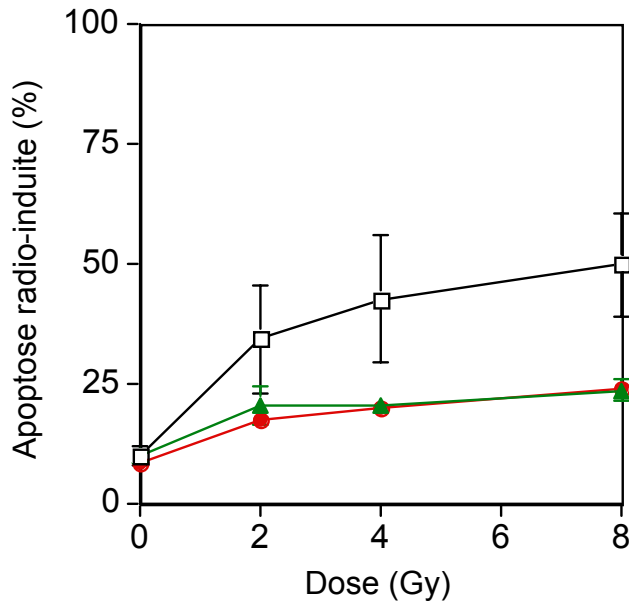
*Figure 59 : Analyse par cytométrie en flux de l'accumulation de p53 après irradiation par des rayons X. Les cellules TK6 (à gauche) et les cellules NH32 (à droite) ont été prélevées 8 h après irradiation à 8 Gy et marquées avec un anticorps anti-p53-FITC. Le pic correspondant aux cellules irradiées est représenté en pointillés, celui des contrôles non irradiés est représenté en noir.*

### 2.2. Induction de l'apoptose par les neutrons rapides

Afin de déterminer l'influence de p53 sur l'induction de l'apoptose par les neutrons rapides, nous avons ensuite irradié nos trois lignées cellulaires par des neutrons



rapides à des doses comprises entre 2 et 8 Gy. L'apoptose a été mesurée après marquage des cellules à l'annexine V-FITC, 24 h après irradiation (Figure 60).

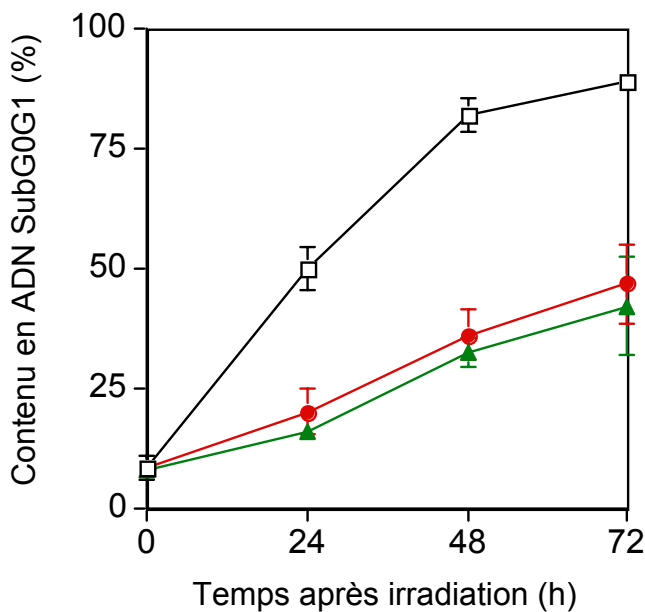


**Figure 60 : Induction d'apoptose par les neutrons rapides.** Les cellules TK6 (□), WTK1 (□) et NH32 (●) ont été marquées à l'annexine V-FITC, 24 h après irradiation et analysées par cytométrie en flux. L'apoptose est exprimée en pourcentage de cellules positives à l'annexine V. Chaque valeur représente la moyenne de quatre expériences indépendantes.

L'externalisation des phosphatidylsérines, normalement présentes dans le feuillet interne de la membrane plasmique est un des marqueurs précoces de l'apoptose (Martin *et al.* 1996). L'annexine V, qui se fixe préférentiellement sur ces phosphatidylsérines permet de quantifier les cellules apoptotiques. Les résultats obtenus montrent que l'apoptose induite dans les cellules TK6 est dose-dépendante avec une augmentation de 34% à 50% de 4 à 8 Gy. En revanche, pour les cellules WTK1 et NH32, l'externalisation des phosphatidylsérines est moins importante, atteignant seulement 24% après 8 Gy. Ainsi, l'induction d'apoptose par les neutrons rapides dépend du statut p53 des cellules. Cet effet différentiel a aussi été observé suite à une irradiation par des rayons X mais avec des valeurs significativement plus faibles, démontrant ainsi la plus grande efficacité biologique relative (EBR) des neutrons rapides en terme d'induction d'apoptose. Après irradiation à 4 Gy, l'apoptose induite par les rayons X atteint 26% dans les cellules TK6, 13% dans les cellules WTK1 et 15% dans les cellules NH32. Ceci confirme des résultats précédents démontrant que l'apoptose est retardée et réduite dans les cellules où p53 n'est pas fonctionnel (Yu et Little 1998). Ces données nous ont permis de calculer une EBR de

1,8 pour les neutrons rapides à 24 h. Il est important de noter que celle-ci est similaire pour les trois lignées étudiées.

Les différences relevées entre les lignées pouvant être dues à des cinétiques différentes d’induction d’apoptose, nous avons choisi une dose d’irradiation unique, 4 Gy et mesuré l’apoptose à différents intervalles de temps après irradiation par des neutrons rapides. Nous avons quantifié par cytométrie en flux la quantité de particules hypodiploïdes, un autre marqueur spécifique de l’apoptose (Figure 61). Les cellules TK6 sont caractérisées par une augmentation rapide et importante de la quantité d’ADN SubG0G1, atteignant 50% à 24 h et culminant à 87% à 72 h. En revanche, l’apparition des particules hypodiploïdes dans les cellules WTK1 et NH32 est retardée et reste inférieure à 47% même 72 h après irradiation. Par ailleurs, les valeurs mesurées pour les cellules WTK1 et NH32 à 72 h, avoisinent celles observées pour les cellules TK6 à 24 h, ce qui suggère que dans ce modèle cellulaire, l’apoptose est uniquement retardée en absence de protéine p53 fonctionnelle.

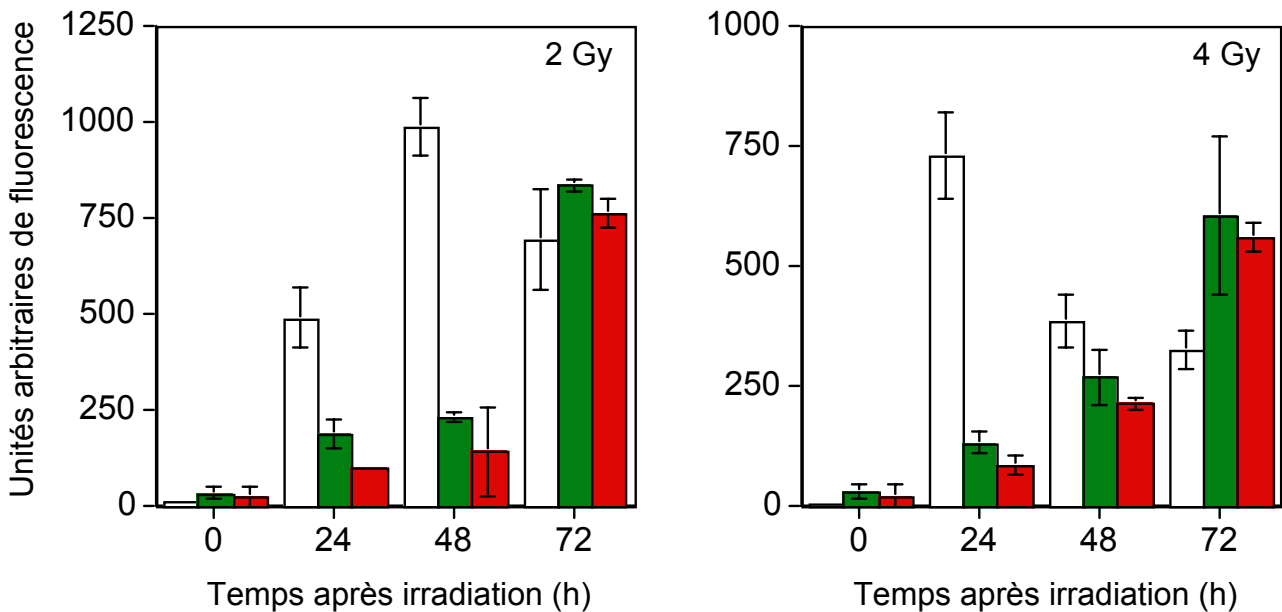


*Figure 61 : Cinétique d'apparition de l'apoptose après irradiation par des neutrons rapides à 4 Gy. A chacun des temps indiqués, les cellules TK6 (□), WTK1 (□) et NH32 (●) ont été perméabilisées et marquées à l'iodure de propidium, puis analysées par cytométrie en flux. Les cellules contenant de l'ADN SubGOG1 c'est-à-dire une quantité d'ADN inférieure à 2n, sont définies comme apoptotiques. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.*

### 2.3. Activation des caspases

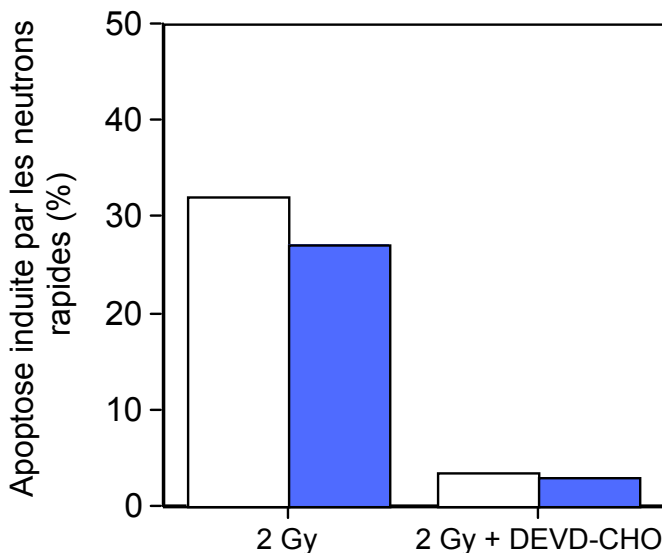
Afin de s’assurer que la mort cellulaire provoquée par les neutrons est bien de nature apoptotique, nous avons mesuré l’activation des caspases effectrices à l’aide de tests

fluorimétriques. Le substrat utilisé, Ac-DEVD-amc est un tétrapeptide dont la séquence est celle du site de clivage de la PARP, un substrat endogène des caspases-3 et -7 (Gurtu *et al.* 1997). Ainsi, le clivage de ce substrat synthétique permet d'évaluer l'activité de ces caspases. Les résultats mettent en évidence une activité des caspase-3 et -7 dans les trois lignées cellulaires après irradiation à 2 Gy et à 4 Gy. Dans les cellules TK6, cette activité augmente de façon très précoce et atteint son maximum à 48 h après 2 Gy et à 24 h après 4 Gy (Figure 62). Par contre, dans les cellules WTK1 et NH32, l'augmentation de cette activité est plus lente et le maximum n'est atteint qu'à 72 h. Ces résultats indiquent que l'activité de la caspase-3 et de la caspase-7 est retardée après irradiation dans les cellules déficientes en p53 fonctionnel. On peut également remarquer que les cinétiques d'activité DEVDase peuvent être corrélées à l'apparition de l'apoptose dans les différentes lignées. De plus, ces données permettent d'affirmer que la mort cellulaire induite par les neutrons rapides est bien un processus apoptotique.



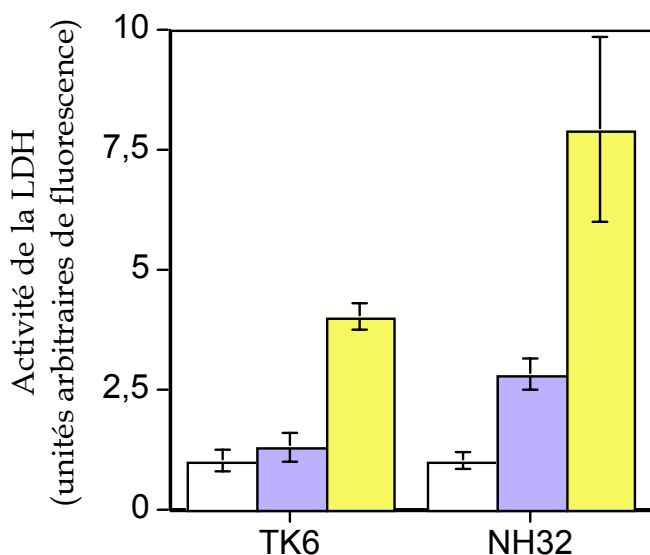
**Figure 62 : Activité de type caspase-3 en fonction du temps après irradiation par des neutrons rapides : à 2 Gy (à gauche) et à 4 Gy (à droite), dans les cellules TK6 (en blanc), WTK1 (en vert), NH32 (en rouge). Aux différents temps indiqués, les cellules ont été lysées et l'activité des caspases-3 et -7 a été mesurée grâce au clivage du substrat fluorimétrique Ac-DEVD-amc. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$ SD d'une expérience représentative réalisée en triplicate.**

Pour confirmer le rôle des caspases-3 et -7 dans l'apoptose induite par les neutrons, les cellules TK6 ont été traitées 1 h avant l'irradiation, par Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M) un inhibiteur spécifique de ces deux protéases. L'inhibition de ces caspases effectrices prévient l'apparition des particules hypodiploïdes et l'externalisation des phosphatidylsérines, 24 h après irradiation à 2 Gy (Figure 63), ce qui suggère que la phase d'exécution de l'apoptose induite par les neutrons est sous la dépendance des caspases-3 et -7. Cette particularité est d'ailleurs retrouvée dans l'apoptose induite par les rayons X où l'inhibition de la caspase-3 conduit là-aussi à une diminution de l'apoptose (Coelho *et al.* 2000).



**Figure 63 :** Effets de l'inhibition de la caspase-3 sur l'apoptose induite par les neutrons rapides. Les cellules TK6 ont été prétraitées 1 h avant l'irradiation à 2 Gy, avec de l'Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M). L'apoptose a été quantifiée 24 h après l'irradiation, par mesure d'une part des particules hypodiploïdes (en blanc) et d'autre part de l'externalisation des phosphatidylsérines (en bleu). Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

De même, Coelho *et al.* ont démontré que la diminution de l'apoptose observée après inhibition des caspases effectrices, s'accompagne d'une augmentation de la nécrose après irradiation par des rayons X (Coelho *et al.* 2000). Nous avons donc voulu vérifier si le même phénomène était observé après irradiation par des neutrons rapides.



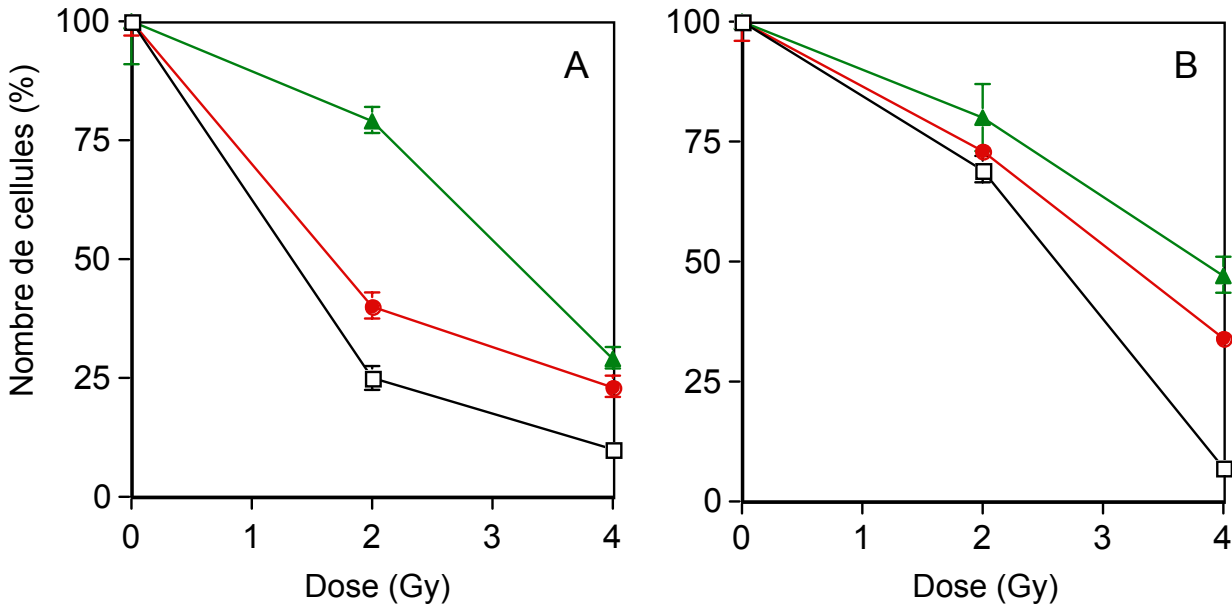
*Figure 64: Mise en évidence de la nécrose après irradiation et inhibition des caspases de type 3. L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu a été mesurée 24 h après irradiation par des neutrons rapides à 2 Gy dans les cellules TK6, avec ou sans inhibition des caspases-3 et-7 avec de l'Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M). En blanc : 0 Gy, en bleu : 2 Gy, en jaune : 2 Gy + Ac-DEVD-CHO. Chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes.*

La survenue de la nécrose a été évaluée 24 h après irradiation des cellules TK6 à 2 Gy, par mesure de l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu. Le relargage de la LDH dans le milieu extracellulaire est dû à une dégradation de la membrane et des mitochondries ce qui est caractéristique de la mort de type nécrotique. La Figure 64 montre que l'inhibition de l'apoptose par Ac-DEVD-CHO induit une augmentation de l'activité LDH dans le milieu. Par ailleurs, l'activité LDH des échantillons irradiés diffère peu de celle des contrôles. Ces données indiquent que les caspases-3 et -7 jouent un rôle primordial dans le déroulement de l'apoptose induite par les neutrons rapides et que leur inhibition résulte en une augmentation de la nécrose.

#### 2.4. Radiosensibilité vis-à-vis des neutrons rapides

Comme le statut p53 influence l'induction d'apoptose par les neutrons rapides, nous avons ensuite vérifié s'il joue également un rôle dans la prolifération et la survie des cellules après irradiation. L'effet des neutrons rapides et des rayons X sur la prolifération cellulaire a été déterminé par le test UptiBlue après 4 jours de culture. L'exposition aux deux types de radiations se traduit par une diminution dose-dépendante de la prolifération des trois lignées cellulaires (Figure 65). Cette diminution est plus importante pour les neutrons que pour les rayons X, surtout à

2 Gy. En outre, l'absence de p53 fonctionnel rend les cellules WTK1 et NH32 moins sensibles aux neutrons et aux rayons X que la lignée parentale TK6. Ces résultats suggèrent que p53 intervient dans la réponse des cellules lymphoblastoïdes aux rayons X et aux neutrons en ce qui concerne la prolifération cellulaire.



**Figure 65 :** Prolifération cellulaire mesurée par le test UptiBlue 4 jours après irradiation par des neutrons rapides (A) ou par des rayons X (B), pour les cellules : TK6 (□), WTK1 (◻) et NH32 (●).

Nous avons également mesuré l'effet des neutrons rapides et des rayons X sur la survie clonogénique par le comptage des colonies formées en milieu semi-solide après 10 jours de culture (Figure 66). Le nombre de colonies diminue en fonction de la dose d'irradiation pour les neutrons rapides et pour les rayons X. Les neutrons présentent cependant, une plus grande efficacité que les rayons X, notamment après 4 Gy d'irradiation où la survie cellulaire est supérieure à 1% pour les cellules TK6 après irradiation par les rayons X, alors qu'elle ne dépasse pas 0,1% après une irradiation par les neutrons rapides. Ces tests de formation de colonies font par ailleurs apparaître des différences importantes concernant l'influence de p53 dans la survie, suivant le type de radiation utilisé. En effet, alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les trois lignées après irradiation par les rayons X, la survie des cellules WTK1 est 10 fois plus importante et celle des NH32 5 fois plus

importante que celle des TK6 après irradiation à 4 Gy, ce qui démontre l'importance de p53 dans la radiosensibilité des lignées aux neutrons rapides.

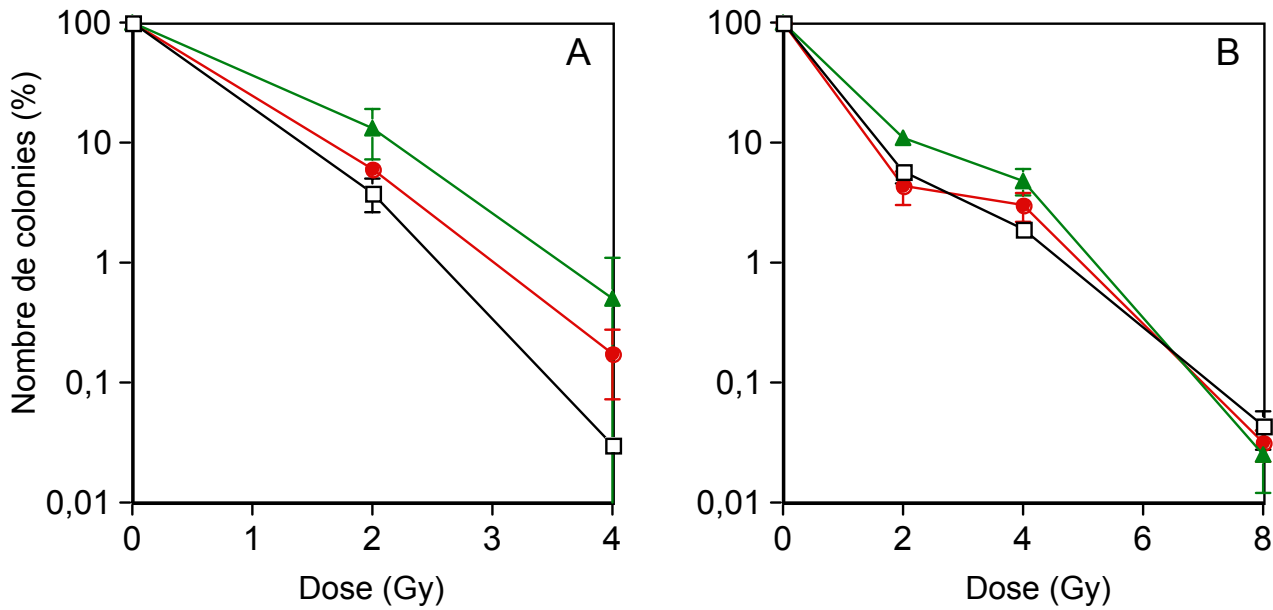


Figure 66 : Survie clonogénique des cellules : TK6 (□), WTK1 (△) et NH32 (●) irradiées par des neutrons rapides (A) ou par des rayons X (B).

### 3. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était double. Il s'agissait d'une part, de déterminer si l'induction de l'apoptose par les neutrons rapides dépend du statut p53 des cellules lymphoblastoïdes, et d'autre part d'analyser le rôle des caspases dans l'apoptose induite par ce type de rayonnement.

Nos résultats montrent qu'après une exposition aux neutrons rapides, les cellules WTK1 et NH32 entrent en apoptose, bien que ce processus soit quantitativement moins important et retardé par rapport aux cellules TK6, qui expriment une protéine p53 sauvage. Ceci suggère que les neutrons rapides induisent l'apoptose dans les cellules lymphoblastoïdes par deux voies différentes : une voie dépendante de p53, qui entraîne une apoptose rapide et massive, et une deuxième voie, p53-indépendante, responsable d'une apoptose plus tardive. Nous avons également montré que les caspases effectrices de type caspase-3 sont activées suite à une irradiation par des neutrons rapides et que leur activité est responsable de l'apoptose observée. De plus, les neutrons sont plus efficaces que les rayons X, pour initier le processus apoptotique quel que soit le statut p53 des cellules. Cependant, la survie des cellules irradiées par les neutrons, mesurée par la formation de colonies suggère que la plus grande efficacité biologique relative des neutrons rapides serait plutôt le reflet d'une mort clonogénique plus importante que d'une augmentation de l'apoptose radio-induite.

Bien que le modèle le plus couramment accepté associe la présence d'une protéine p53 fonctionnelle à la capacité des cellules irradiées à entrer en apoptose (Nakano *et al.* 2001), des études récentes ont démontré que l'apoptose induite par les rayons  $\gamma$  peut être indépendante de p53 et même que la présence de protéine p53 sauvage peut inhiber l'apoptose des cellules de lymphome DL40, suite à une irradiation par des rayons  $\gamma$  (Ogawa *et al.* 2000). D'autres travaux ont encore suggéré que des mutations de p53 pourraient être à l'origine d'une plus grande radiosensibilité. Cependant, la survenue de l'apoptose a été associée au statut p53 des cellules TK6,



exposées aux rayons  $\gamma$  (Yu et Little 1998, Yu *et al.* 1997, Zhen *et al.* 1995). Ces données contradictoires justifient notre intérêt pour cette protéine.

Yu et Little ont proposé deux mécanismes différents d'induction de l'apoptose par les rayons  $\gamma$ , selon le statut p53 des cellules. Nos résultats confirment ces travaux, démontrant l'implication de p53 dans l'apoptose induite par les radiations à TEL faible pour la lignée cellulaire TK6. Contrairement aux radiations à TEL faible, peu d'informations sont disponibles quant au rôle de p53 dans l'apoptose induite les radiations à TEL élevé. Il a été rapporté dernièrement que les cellules TK6 sont plus sensibles aux ions fer (1 Gy/nucléon) que les cellules WTK1, soulignant le rôle de p53 dans la cytotoxicité des radiations à TEL élevé (Wiese *et al.* 2001). Nos résultats sont en accord avec ces données, démontrant la relation entre p53 et l'apoptose induite par les radiations à TEL élevé et montrent pour la première fois que le gène *p53* intervient dans l'apoptose induite par les neutrons rapides.

Pour estimer le taux d'apoptose, nous avons non seulement mesuré l'externalisation des phosphatidylsérines, mais aussi quantifié l'apparition des particules hypodiploïdes et l'activité des caspases, étant donné que les cellules nécrotiques peuvent aussi être positives au marquage à l'annexine V. Nos résultats indiquent que les cellules déficientes en protéine p53 fonctionnelle sont tout de même capables d'entrer en apoptose après exposition aux neutrons rapides, ce qui suggère qu'il existe une voie d'induction d'apoptose indépendante de p53. Néanmoins, l'étude de l'apoptose uniquement dans les cellules WTK1 ne nous permet pas de conclure à l'existence d'une voie apoptotique indépendante de p53. En effet, ces cellules expriment une protéine p53 mutée au niveau du domaine de liaison à l'ADN rendant impossible l'activité de transactivation mais laissant à cette protéine la capacité d'exercer ses autres fonctions apoptotiques, comme l'interaction avec la mitochondrie (Marchenko *et al.* 2000). Par contre, l'induction d'apoptose après irradiation par les rayons X et les neutrons rapides, dans les cellules NH32, où le gène *p53* est délété, démontre clairement l'existence d'une voie apoptotique p53-indépendante, qui est plus lente et moins importante que l'apoptose p53-dépendante.

Nos résultats montrent également que les réponses apoptotiques observées dans les trois lignées cellulaires peuvent être corrélées avec l'activation des caspases effectrices (-3 et -7). En effet, dans les cellules TK6 l'induction d'apoptose par les neutrons est massive et rapide après irradiation à 4 Gy (Figure 61), et l'activité des caspases-3 et -7 atteint son maximum à 24 h (Figure 62). De même, dans les cellules WTK1 et NH32, où l'apoptose est retardée, l'activité de ces caspases effectrices augmente progressivement jusqu'à 72 h. Les deux voies d'initiation de l'apoptose par les neutrons rapides sont donc caractérisées par l'activation des caspases effectrices -3 et -7. Yu et Little ont également obtenu les mêmes résultats concernant l'activation de la caspase-3 après irradiation par des rayons X (Yu et Little 1998). En outre, l'inhibition de ces caspases dans les cellules TK6 prévient l'apparition des critères d'apoptose tels que l'externalisation des phosphatidylsérines et la formation de particules hypodiploïdes, confirmant ainsi le rôle central de ces caspases de type-3 dans l'apoptose induite par les neutrons. L'activation des caspases de type caspase-3 semble être un phénomène universel de nombreuses voies d'apoptose et est même considérée comme un critère d'identification de la mort cellulaire programmée (Marshman *et al.* 2001, Degterev *et al.* 2003). Par ailleurs, nous avons également observé que l'inhibition de ces caspases se traduit non seulement par une diminution de l'apoptose mais aussi par une induction d'une mort cellulaire de type nécrotique. Coelho *et al.* avaient déjà mis en évidence cette conversion de l'apoptose en nécrose lors de l'inhibition des caspases de type-3 dans les cellules MOLT-4 après irradiation par des rayons X (Coelho *et al.* 2000). Les explications concernant cette transition sont diverses : elle pourrait provenir d'une diminution de la quantité d'ATP de la cellule empêchant la formation de l'apoptosome (Leist *et al.* 1997, Eguchi *et al.* 1997). D'autres auteurs ont suggéré qu'un défaut du clivage de la PARP pourrait rediriger la cellule vers la nécrose (Ha et Snyder 1999). Malgré ces hypothèses, les mécanismes à l'origine de la conversion apoptose/nécrose après irradiation restent encore inconnus. Toutefois, ces résultats montrent que l'inhibition des caspases n'empêche pas la mort des cellules et que l'apoptose et la nécrose peuvent être induites par des mécanismes similaires (McCarthy *et al.* 1997).

L'apoptose et la mort clonogénique observées après irradiation par les neutrons rapides sont toutes les deux supérieures à celles mesurées après irradiation par les rayons X. Les neutrons rapides sont donc plus efficaces que ces derniers pour provoquer la mort des cellules. Ces résultats confirment des études précédentes, réalisées *in vivo* sur des souris, qui montrent que les neutrons rapides induisent une plus grande diminution du poids et de la cellularité de la rate que les rayons X (Holl *et al.* 2000). En outre, après exposition aux neutrons rapides, l'apoptose est déclenchée plus rapidement et de façon plus importante, suggérant que les dommages infligés par les neutrons rapides sont plus sévères que ceux induits par les rayons X. Le nombre de particules hypodiploïdes atteint 50%, 24 h après irradiation aux neutrons rapides dans les cellules TK6, alors qu'il n'est que de 10% après exposition aux rayons X. De même, Wang *et al.* ont montré que les neutrons rapides induisent une apoptose plus importante des cellules de carcinome rectal que les rayons X (Wang *et al.* 2001). Des expériences réalisées sur des cellules thyroïdiennes de rat Fischer ont également démontré que l'apoptose induite par les protons est plus élevée et apparaît plus rapidement que l'apoptose induite par les rayons  $\gamma$ . Ces auteurs expliquent la forte efficacité biologique des protons par les caractéristiques physiques de ces particules, en particulier la formation de « grappes » d'ionisations (Green *et al.* 2001). D'autres travaux ont mis en évidence dans des cellules lymphoblastoïdes, la génération par les neutrons rapides de dommages au niveau de l'ADN, plus difficilement réparables que ceux induits par les rayons  $\gamma$ , suggérant que ces dommages plus complexes seraient responsables de l'efficacité biologique des neutrons (Mustonen *et al.* 1999). Il reste à déterminer si ces dommages complexes induits par les radiations à TEL élevé, déclenchent des mécanismes d'initiation de l'apoptose qui leur sont propres.

Dans notre modèle, les neutrons rapides provoquent une augmentation de l'apoptose plus forte que les rayons X, à 24 h, quel que soit le statut p53 des cellules. Les EBR calculées à 24 h, sont d'ailleurs identiques pour les trois lignées cellulaires (1,8). Cependant, lorsque p53 est non fonctionnel, il n'y a pas de différence significative entre les deux types de rayonnements, concernant l'apoptose induite, 72 h après irradiation. Néanmoins, les tests de survie clonogénique indiquent que les

cellules présentant une protéine p53 non fonctionnelle, sont plus sensibles aux neutrons qu'aux rayons X. Ainsi, d'après ce test de formation de colonies, le statut p53 de ces cellules est bien plus important lors d'une irradiation par des neutrons rapides, qu'après irradiation par des photons. Donc, la plus grande efficacité biologique des neutrons repose sur une induction de l'apoptose plus importante ainsi que sur une induction accrue de mort clonogénique, indépendante de p53. Nos résultats soutiennent donc l'idée que les radiations à TEL élevé présentent un avantage par rapport aux rayons X, vis-à-vis des lignées tumorales radiorésistantes (Takahashi *et al.* 1998). Cette absence de corrélation entre l'augmentation de la létalité cellulaire et l'induction de l'apoptose a déjà été décrite par Kim *et al.* dans des cellules de carcinomes dans les traitements associant les neutrons et le cisplatine (Kim *et al.* 2000). Ce phénomène peut être expliqué par les dommages difficilement réparables induits par les neutrons qui entraîneraient une mort clonogénique, due à la capacité réduite de ces cellules à initier une apoptose rapide (due à l'absence de p53 fonctionnelle).

En conclusion, cette étude met en évidence le rôle de la protéine p53 dans l'induction d'apoptose par les neutrons rapides. Les neutrons rapides activent l'apoptose suivant deux voies distinctes : une voie dépendante de p53 qui intervient dès les premières heures après l'irradiation, et une voie indépendante de p53, plus lente, mais faisant elle aussi intervenir les caspases. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il existe également des différences dans les mécanismes cellulaires à l'origine de ces deux voies de signalisation. En outre, l'efficacité biologique des neutrons par rapport aux rayons X dans l'induction de la mort clonogénique des cellules lymphoblastoïdes déficientes en p53 a également été démontrée. La plus grande cytotoxicité des neutrons pourrait compenser la capacité réduite de ces cellules à entrer en apoptose. Il serait intéressant d'évaluer d'une part si p53 détermine la sensibilité des cellules TK6 et de ses variants à d'autres types de radiations à TEL élevé et d'autre part si les neutrons rapides induisent la même cytotoxicité dans d'autres lignées déficientes en p53 ou en tout autre composant de la machinerie apoptotique.

## Chapitre 2

# SIGNALISATION DE L'APOPTOSE INDUITE DANS DES LIGNEES LYMPHOBLASTOÏDES PAR LES NEUTRONS RAPIDES

### RESUME

Les résultats précédents montrent que le statut p53 des cellules lymphoblastoïdes détermine leur sensibilité face aux neutrons rapides et intervient dans l'induction de l'apoptose. L'objectif de cette étude était de caractériser les deux voies de signalisation apoptotiques activées dans les lignées lymphoblastoïdes par les neutrons rapides afin d'identifier les différents mécanismes impliqués dans le déclenchement du processus apoptotique en fonction de p53. Nous avons déterminé l'implication des caspases par « western blot ». Le rôle des mitochondries a été évalué par la mesure de la chute du potentiel transmembranaire  $\Delta\Psi_m$  et par le clivage de la protéine pro-apoptotique BID. Nos résultats montrent que le statut p53 affecte non seulement la cinétique d'induction de l'apoptose mais aussi la nature des caspases activées. L'apoptose p53-dépendante est associée à l'activation des caspases-3, -7, -8 et -9, au clivage de BID, à la chute du  $\Delta\Psi_m$  et à la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Par contre, la caspase-7 paraît être activée par une voie de signalisation indépendante de p53. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases nous a permis d'identifier la caspase-8 comme étant responsable du clivage de BID dans les cellules TK6. Dans leur ensemble, ces résultats mettent en évidence le rôle essentiel de la mitochondrie et de l'activation de BID par la caspase-8 dans le déroulement de l'apoptose p53-dépendante induite par les neutrons rapides.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Fischer *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003).

## 1. INTRODUCTION

Les mécanismes cellulaires d'induction de l'apoptose par les radiations ionisantes ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Il est établi que l'irradiation active des signaux cellulaires qui vont conduire à l'initiation du processus apoptotique par l'activation des caspases initiatrices : les caspases-8 et -9 (Norbury et Zhivotovsky 2004, Baatout *et al.* 2001). Puis celles-ci activent les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) qui clivent différents substrats cellulaires, ce qui est à l'origine des caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose (Cohen 1997). Cependant, la nature des signaux cellulaires mis en jeu par les radiations ainsi que les caspases initiatrices activées restent sujet à controverse. Le modèle le plus couramment accepté pour l'initiation de l'apoptose par les photons (rayons X ou  $\gamma$ ) fait intervenir p53 dans l'activation transcriptionnelle de la protéine pro-apoptotique BAX (Miyashita et Reed 1995, Gong *et al.* 1999, Pruschy *et al.* 2001). BAX interagit avec la membrane mitochondriale, ce qui résulte en une chute du potentiel membranaire mitochondrial  $\Delta\psi_m$  et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Jurgenmeister *et al.* 1998). Puis le cytochrome c s'associe à la procaspase-9, au dATP et à Apaf-1 pour former l'apoptosome responsable de l'activation de la caspase-9, qui active par la suite les caspases effectrices (Zou *et al.* 1999, Hentgartner 2000). Tout comme dans ce modèle, l'activation de la caspase-9 causée par la libération du cytochrome c est aussi responsable de l'initiation du programme apoptotique dans l'apoptose induite par des agents chimiques (Sun *et al.* 1999). D'autres études ont placé la caspase-8 à l'origine du processus apoptotique induit par les rayons X. Ding *et al.* ont mis en évidence une activité de la caspase-8 en amont de la mitochondrie dans des fibroblastes embryonnaires de souris exposés aux rayons  $\gamma$  (Ding *et al.* 2000). L'activation de la caspase-8 peut aussi être causée par une induction de la voie des récepteurs de mort par l'irradiation (Embree-Ku *et al.* 2002, Fulda *et al.* 1998). Dans cette voie des récepteurs, la caspase-8 active les caspases effectrices directement ou indirectement par une boucle d'amplification faisant intervenir la protéine pro-apoptotique BID et la mitochondrie (Scaffidi *et al.* 1998, Luo *et al.* 1998). Dans ce

dernier cas, BID clivé par la caspase-8 s'intègre dans la membrane mitochondriale et comme BAX, induit le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme ce qui conduit à l'activation de la cascade des caspases. Par ailleurs, la caspase-8 peut être activée après irradiation indépendamment des récepteurs de mort (Belka *et al.* 1999). Il a aussi été rapporté que l'activation de la caspase-8 et de BID induite par les radiations se produisait après les dommages mitochondriaux (Belka *et al.* 2000), suggérant que le clivage de BID par la caspase-8 serait plutôt impliqué dans la phase d'exécution de l'apoptose. Ces données contradictoires soulignent la complexité des mécanismes responsables du déclenchement de l'apoptose radio-induite. Contrairement aux rayons X et  $\gamma$ , peu de travaux portent sur l'initiation et le déroulement du processus apoptotique induit par les neutrons rapides. Dans les expériences précédentes, nous avons précisé l'importance de p53 dans la sensibilité des cellules lymphoblastoïdes vis-à-vis des neutrons rapides. Les différences quantitatives observées entre ce type de rayonnement et les rayons X en terme d'induction d'apoptose peuvent amener à penser que les neutrons rapides induisent des voies de signalisation apoptotiques différentes des rayons X. Cette hypothèse est également soutenue par le fait que certaines cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie d'une part, et à l'irradiation par des photons d'autre part, soient sensibles aux neutrons rapides (Britten *et al.* 1990, Aref *et al.* 1999). Dès lors, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des neutrons rapides revêt une importance particulière, en vue de l'utilisation de ces rayonnements pour le traitement des cancers, dans le cadre de l'hadronthérapie (Scalliet *et al.* 2001). Ainsi l'objectif de ce travail était de définir les mécanismes cellulaires impliqués dans le déclenchement des deux voies de signalisation apoptotique activées par les neutrons rapides en fonction de p53, dans les lignées lymphoblastoïdes humaines. Ces deux voies avaient été mises en évidence et décrites dans le chapitre précédent. Nous avons tenté d'identifier les caspases activées dans chacune de ces voies d'apoptose et étudié le rôle de la mitochondrie et de BID dans l'initiation de l'apoptose suite à l'exposition aux neutrons rapides.

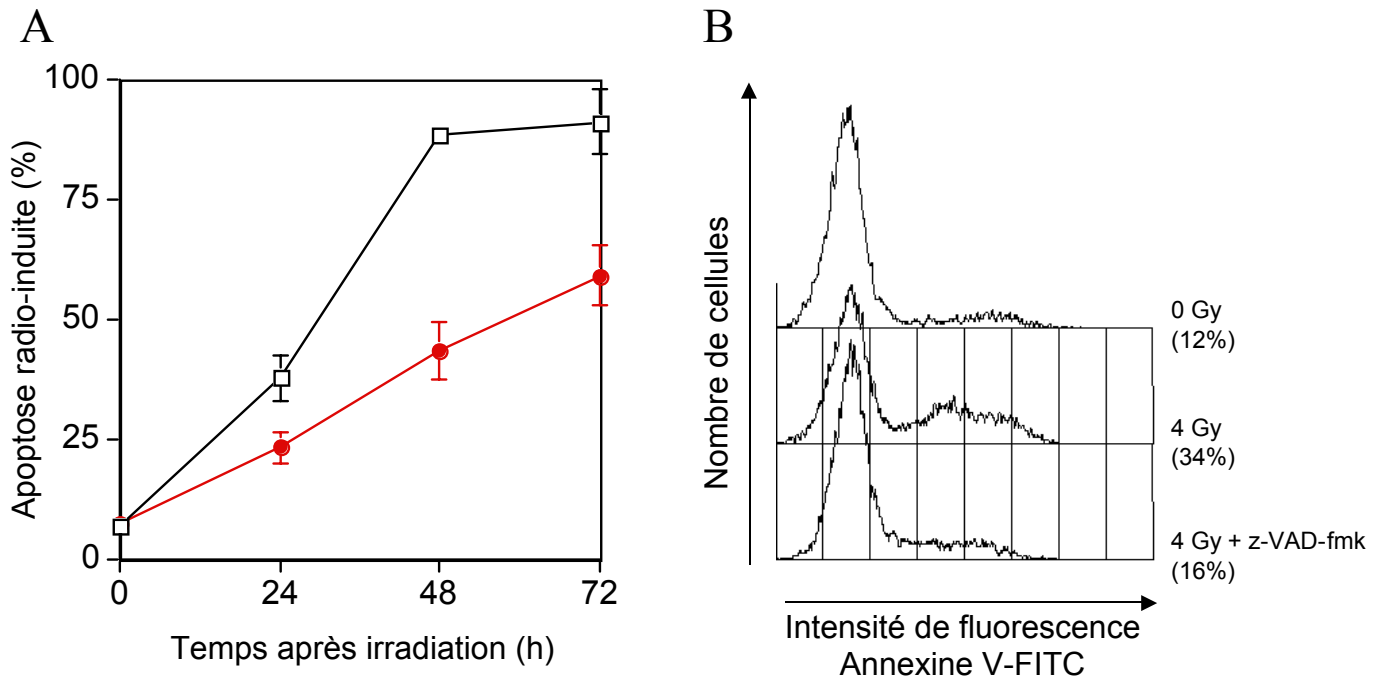
## 2. RESULTATS

Pour déterminer les différences qualitatives entre les deux voies apoptotiques induites par les neutrons rapides dans les cellules lymphoblastoïdes, nous avons choisi d'irradier uniquement les lignées TK6 (*p53* sauvage) et NH32 (*p53* délété). La lignée WTK1 n'a pas été utilisée pour ces expériences puisque ces cellules mutées pour *p53* sont issues de passages successifs en culture et peuvent présenter des mutations dans d'autres gènes de la machinerie apoptotique. Ces mutations pourraient être responsables de l'induction d'autres voies de signalisation, qui ne seraient pas causées essentiellement par l'absence de *p53*. Les cellules NH32, qui présentent uniquement une délétion du gène *p53*, sont plus adaptées pour l'étude de l'apoptose-*p53* indépendante. Par ailleurs, la fréquence des mutations spontanées ainsi que celle des mutations radio-induites, pour les cellules NH32 ne sont pas plus élevées que celles observées pour les cellules TK6 (Chuang *et al.* 1999).

### 2.1. Externalisation des phosphatidylsérines et inhibition des caspases

Comme nous l'avons montré précédemment, les neutrons rapides induisent dans les cellules lymphoblastoïdes, une voie d'apoptose *p53*-dépendante massive, qui intervient de façon précoce, alors que l'apoptose *p53*-indépendante, observée dans les cellules NH32 est moins importante et plus tardive.



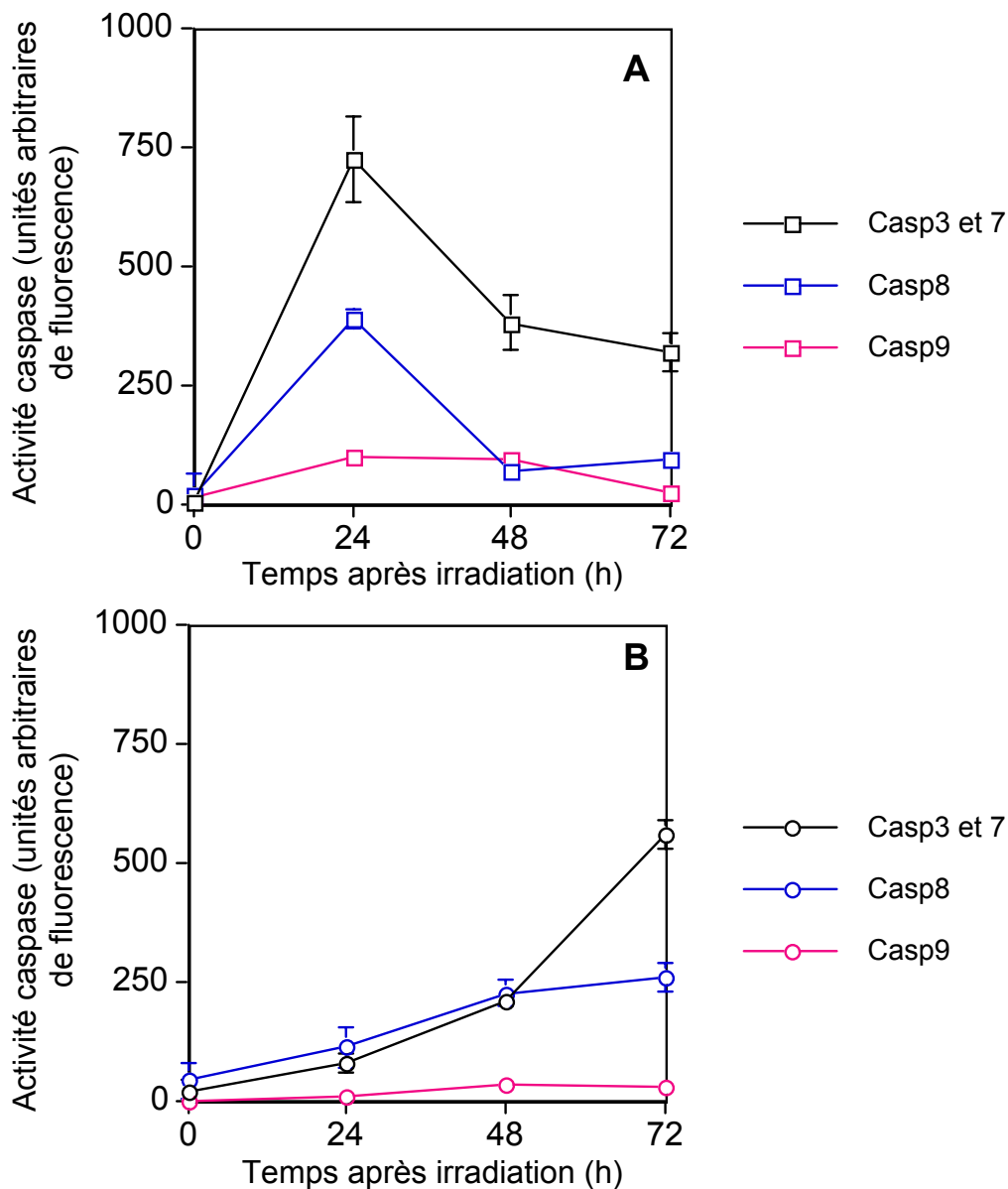


**Figure 67 : Apoptose induite par les neutrons rapides en fonction du statut p53 des cellules.** (A) Externalisation des phosphatidylsérines après irradiation par les neutrons rapides à 4 Gy, mesurée par cytométrie en flux après marquage à l'annexine V-FITC des cellules TK6 (□) et NH32 (●). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. (B) Inhibition de l'externalisation des phosphatidylsérines, mesurée 24 h après irradiation à 4 Gy, par des neutrons rapides dans les cellules TK6, traitées 1 h avant l'irradiation par l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk (50  $\mu$ M). L'inhibition de l'apoptose se traduit par une diminution du volume du pic positif (à droite) entre les cellules irradiées et les cellules irradiées et traitées par z-VAD-fmk.

La Figure 67 rappelle ces résultats : en effet, l'apoptose, mesurée par l'externalisation des phosphatidylsérines en cytométrie en flux, augmente de 34% à 73% de 24 h à 48 h après irradiation, dans les cellules TK6 alors que dans les cellules NH32 elle passe de 13% à 26% (Figure 67A). En outre, l'addition de l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk (50  $\mu$ M), une heure avant l'irradiation des cellules TK6, réduit fortement la proportion de cellules positives à l'annexine V-FITC de 34% à 16% (Figure 67B), démontrant que ce critère précoce de l'apoptose est sous le contrôle des caspases.

## 2.2. Activités des caspases en fonction du statut p53

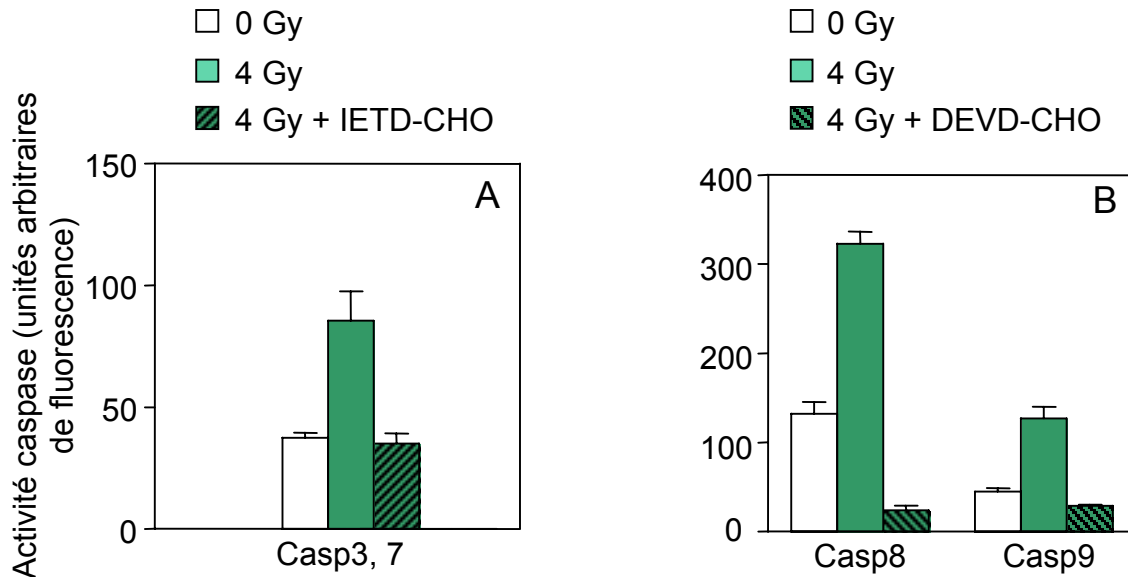
Nous avons vu dans l'étude précédente que l'apoptose induite par les neutrons fait intervenir les caspases de type caspase-3 dans les cellules TK6 et dans les cellules NH32. Cependant, les cinétiques d'activation de ces caspases diffèrent selon le statut p53 des cellules. Par conséquent, nous avons tenté de définir quelle caspase pouvait être à l'origine de l'activation de ces caspases effectrices. Pour ce faire, les cellules ont été lysées à différents temps après irradiation à 4 Gy par les neutrons rapides, et incubées avec différents substrats spécifiques de chaque caspase étudiée : Ac-IETD-amc, Ac-LEHD-amc et Ac-DEVD-amc, respectivement clivés par la caspase-8, la caspase-9 et les caspases-3 et -7 (Gurtu *et al.* 1997, Thornberry *et al.* 1997). Le clivage de ces substrats conduit à une fluorescence qui permet de quantifier l'activité de ces caspases. La Figure 68 montre que dans les deux lignées cellulaires, les caspases initiatrices-8 et -9, ainsi que les caspases effectrices sensibles au DEVD, semblent être activées simultanément, rendant difficile l'identification de celle qui déclenche la cascade protéolytique. Dans les cellules TK6, les caspases-3, -9 et -8 atteignent leur maximum d'activité 24 h après irradiation (Figure 68A). Cette activité diminue ensuite de 24 h à 72 h. Au contraire, dans la lignée NH32, les activités des trois caspases sont retardées et significativement plus faibles par rapport à celles observées dans la lignée TK6 (Figure 68B). En fait, dans ces cellules déficientes en p53, les valeurs mesurées ne sont significativement supérieures au contrôle non-irradié qu'à partir de 48 h après irradiation ( $p < 0,05$ ). Ainsi, les trois activités caspases augmentent progressivement en fonction du temps atteignant leur maximum à 72 h après irradiation, dans les cellules NH32. Il est important de noter que dans ces cellules, l'activité de la caspase-9, même à 72 h, reste très faible.



**Figure 68 : Etude comparative des cinétiques de plusieurs activités caspases activées par les neutrons rapides à 4 Gy.** Aux temps indiqués, les cellules TK6 (A) et les cellules NH32 (B) ont été lysées et l'hydrolyse de Ac-DEVD-amc (caspases-3 et -7), Ac-IETD-amc (caspase-8), Ac-LEHD-amc (caspase-9) a été mesurée à l'aide de tests fluorimétriques. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$ SD d'une expérience représentative réalisée en triplicate.

Les profils similaires obtenus dans les cellules TK6, pour les activités caspase-3 et -8 indiquent que l'une peut être à l'origine de l'activation de l'autre. Par ailleurs, le

traitement avant irradiation des cellules TK6 avec l'inhibiteur spécifique de la caspase-8, Ac-IETD-CHO (200  $\mu$ M) prévient significativement l'activité des caspases effectrices-3 et -7 (Figure 69A).



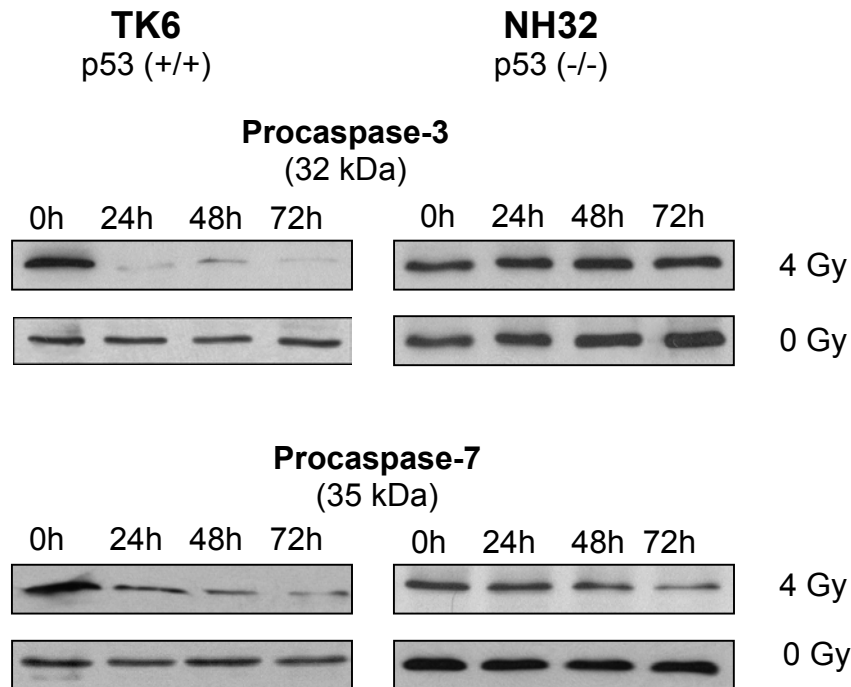
**Figure 69 : Effets de l'inhibition de la caspase-8 et de la caspase-3 sur les activités des autres caspases, après irradiation aux neutrons rapides.** Les cellules TK6 ont été traitées, 1 h avant irradiation, par les neutrons rapides à 4 Gy, par Ac-IETD-CHO (A) ou par Ac-DEVD-CHO (B) à 200  $\mu$ M. Les activités enzymatiques des caspases-9, -8, ou -3 et -7 ont été quantifiées 24 h après irradiation.

De même, l'inhibition des caspases de type caspase-3 par l'addition d'Ac-DEVD-CHO (200  $\mu$ M) résulte en une diminution de l'activité des caspases-8 et -9 (Figure 69B). Ces résultats suggèrent que la caspase-8 semble être activée en amont de la caspase-3, qui peut à son tour, initier une boucle d'amplification positive en activant les caspases-8 et -9 (Scaffidi *et al.* 1998).

### 2.3. Analyse de l'activation des caspases par western blot

Pour compléter ces tests enzymatiques et étudier plus en détails l'implication des caspases dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, nous avons ensuite

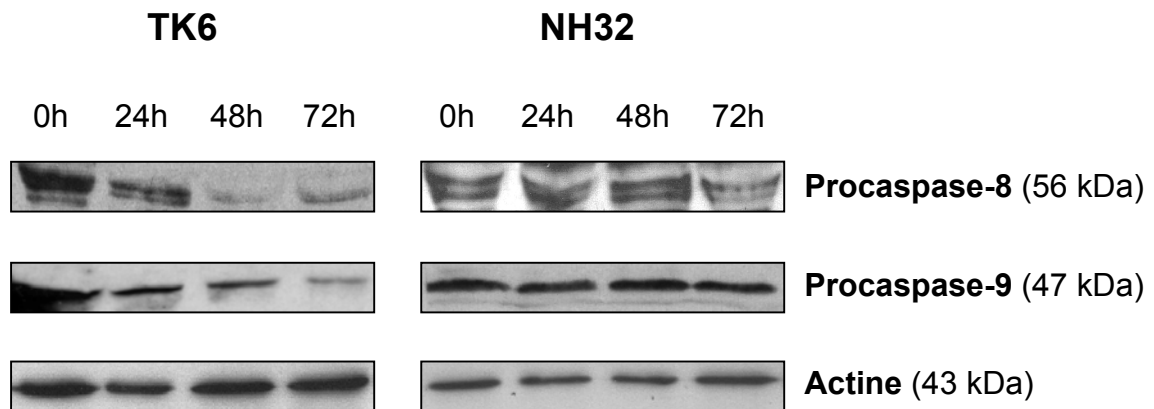
analysé l'expression de plusieurs de ces protéases par western blot. La figure 70 montre que les deux lignées expriment la forme inactive de la caspase-3 (32 kDa), en l'absence d'irradiation (Figure 70, 0 h). Après irradiation à 4 Gy, une diminution de l'expression de la procaspase-3 est observée à partir de 24 h, pour les cellules TK6, avec une disparition totale de cette protéine à 72 h. En s'appuyant sur les résultats précédents d'activité DEVDase (Figure 68), nous pouvons affirmer que la diminution de l'expression de la procaspase-3 résulte du clivage protéolytique de celle-ci en caspase-3 active. Nous n'avons pu mettre en évidence la sous-unité active de 17 kDa, sur le western blot.



**Figure 70 : Analyse du rôle de la caspase-3 et de la caspase-7 dans l'apoptose induite par les neutrons rapides.** Western blot de la procaspase-3 et de la procaspase-7 dans les cellules TK6 (à gauche) et les cellules NH32 (à droite) après irradiation par les neutrons rapides à 4 Gy. Aux temps indiqués après irradiation, 60 µg de protéines isolées des cellules ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Les cellules non irradiées sont utilisées comme contrôle.

Par contre, dans les cellules NH32, la bande correspondant à la proforme de la caspase-3 reste identique en fonction du temps, même 72 h après irradiation, suggérant qu'une autre protéase est responsable du clivage du substrat Ac-DEVD-

amc mesuré dans ces cellules. Etant donné que les caspases-3 et -7 présentent la même spécificité de substrat *in vitro*, nous avons alors émis l'hypothèse que la caspase-7 pourrait être responsable de l'activité DEVDase mesurée dans les cellules NH32 (Thornberry *et al.* 1997). L'analyse de la caspase-7 par western blot valide cette hypothèse, en montrant que l'expression de la procaspase-7 (35 kDa) diminue en fonction du temps après irradiation dans les deux types cellulaires (Figure 70). Les cellules NH32 présentent une réduction plus marquée de l'expression de cette proforme, 72 h après irradiation, ce qui concorde avec l'augmentation de l'activité DEVDase (Figure 68). La caspase-7 est donc activée par les neutrons rapides indépendamment du statut p53 des cellules, contrairement à la caspase-3 activée uniquement dans les cellules TK6.

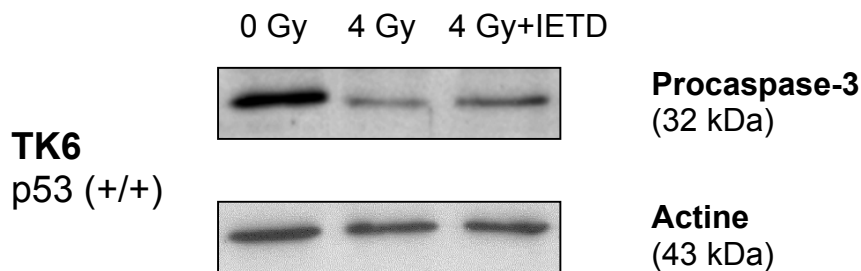


**Figure 71 : Analyse de l'activation de la caspase-8 et de la caspase-9 par les neutrons rapides.** Les cellules TK6 et NH32 ont été lysées aux temps indiqués après irradiation à 4 Gy et les protéines isolées ont été déposées sur un gel d'électrophorèse pour le western blot des procaspases-8 et -9. La diminution de la proforme de la caspase correspond à l'activation par clivage de cette protéase. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes. L'actine sert de contrôle pour s'assurer qu'une quantité égale de protéines est déposée dans chaque puits du gel.

L'expression des caspases initiatrices-8 et -9 a également été analysée par western blot. L'irradiation induit une diminution de l'expression des proformes de ces deux caspases, dès 24 h après irradiation, dans les cellules TK6 (Figure 71). Comme dans les western blot précédents, une réduction des procaspases se traduit par une activation de ces enzymes, suite à un clivage protéolytique. Donc les caspases-8 et-9 sont activées dans les cellules TK6 suite à une exposition aux neutrons rapides, ce qui

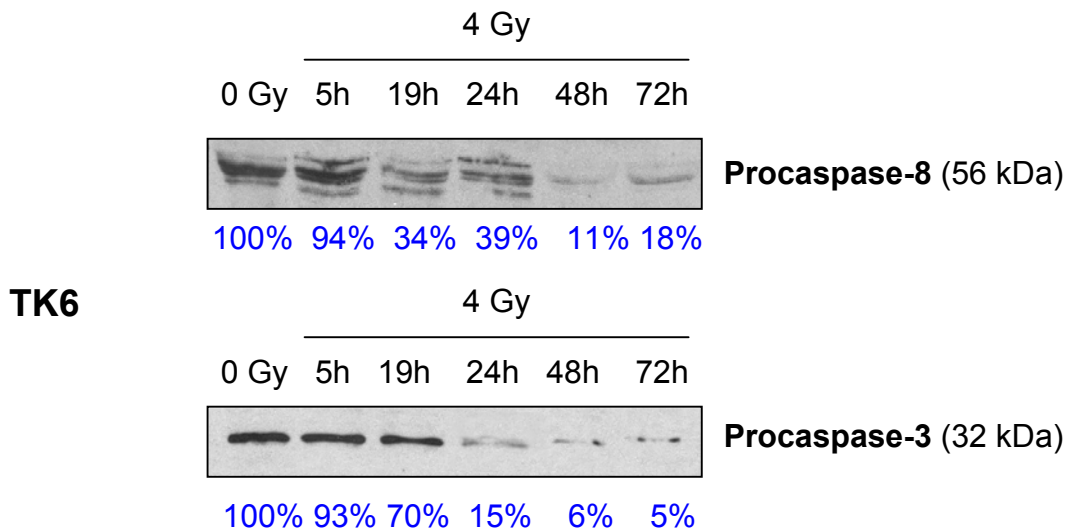
peut être corrélé avec les tests enzymatiques. Pour les cellules NH32, l'activation de la caspase-8 n'est observée qu'à partir de 72 h, où la diminution de la bande correspondant à la procaspase-8 devient significative (Figure 71). Ces données confirmées par l'activité enzymatique, indiquent que cette caspase est activée tardivement en l'absence de p53. Au contraire, dans ces cellules déficientes en p53, aucune réduction de la proforme de la caspase-9 n'a pu être décelée sur le western blot (Figure 71), même 72 h après irradiation, ce qui suggère que cette caspase n'est pas activée dans les cellules NH32 et semble contredire les activités caspase mesurées (Figure 68). Néanmoins, l'activité caspase-9 dans les cellules NH32 est très faible et pourrait être due à d'autres caspases partageant les mêmes spécificités de substrat (Thornberry *et al.* 1997).

Par ailleurs, afin d'identifier la caspase initiatrice responsable de l'activation des caspases effectrices, nous avons réalisé des western blot en présence d'inhibiteurs spécifiques de caspases. L'addition de l'inhibiteur de la caspase-8, Ac-IETD-CHO avant l'irradiation prévient la diminution de l'expression de la procaspase-8 et par conséquent l'activation de cette protéase, 24 h après irradiation (Figure 72). Ces résultats apportent une preuve supplémentaire à l'hypothèse selon laquelle la caspase-8 interviendrait avant l'activation de la caspase-3 dans la voie de signalisation apoptotique induite par les neutrons rapides.



**Figure 72 :** Analyse par western blot de la procaspase-3, après inhibition de la caspase-8 dans les cellules TK6. Les cellules ont été traitées 1 h avant l'irradiation par l'inhibiteur de la caspase-8, Ac-IETD-CHO à 200  $\mu$ M. Elles ont été prélevées pour l'analyse 24 h après irradiation. Les taux d'actine sont utilisés comme contrôle, pour s'assurer qu'une quantité égale de protéines a été déposée dans chaque puits. Les intensités des bandes ont été calculées en utilisant le logiciel Quantity One.

De plus, d'autres western blot effectués à des temps plus précoces après irradiation à 4 Gy par les neutrons rapides (Figure 73), font apparaître une forte réduction de la procaspase-8, 19 h après irradiation (de 100% à 34%). A l'opposé, la diminution de la procaspase-3 à ce temps, est nettement plus faible, de 100% à 70%, ce qui suggère que l'activation de la caspase-8 serait plus précoce que celle de la caspase-3 et soutient l'idée que la caspase-8 est activée en amont de la caspase-3 après irradiation par les neutrons rapides.

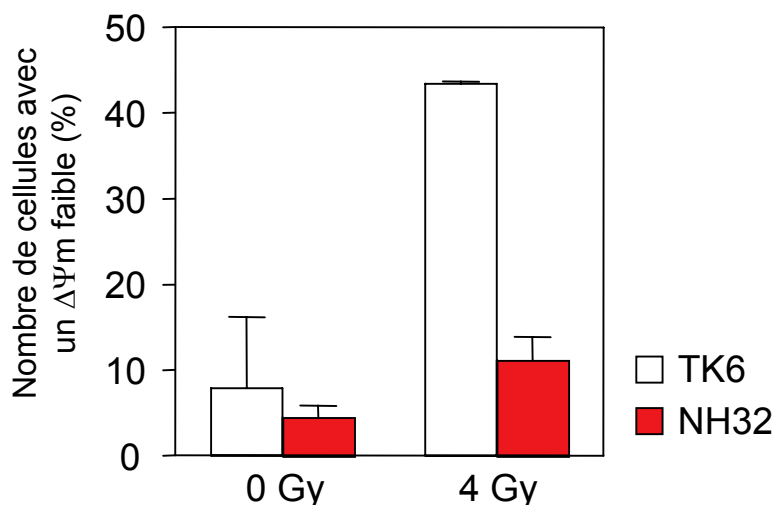


**Figure 73 : Comparaison des cinétiques d'activation des caspases-8 et -3, après irradiation par les neutrons rapides à 4 Gy.** Analyse par western blot de la procaspase-8 et de la procaspase-3 dans les cellules TK6. Les intensités des bandes ont été calculées en utilisant l'analyseur d'images GelDoc et le logiciel Quantity One et sont indiquées sous chaque bande en % par rapport au témoin non irradié.

#### 2.4. L'apoptose dépendante de p53 est caractérisée par des dommages mitochondriaux causés par les caspases

Afin d'évaluer l'implication de la mitochondrie dans le processus apoptotique, activé par les neutrons rapides, la chute du potentiel membranaire mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  a été mesurée grâce au marqueur JC-1 (Figure 74).

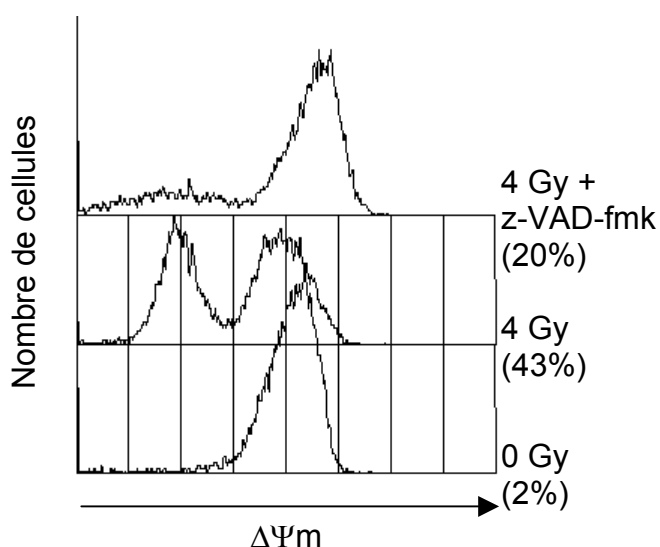




**Figure 74 :** Chute du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) induite par les neutrons rapides. Le nombre de cellules présentant une chute du  $\Delta\Psi_m$  24 h après irradiation à 4 Gy par les neutrons, ont été dénombrées par cytométrie en flux après marquage au JC-1. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

Le nombre de cellules TK6 présentant une chute de leur potentiel mitochondrial augmente de 2% à 43%, 24 h après irradiation par des neutrons rapides à 4 Gy. A l'opposé, dans les cellules NH32, il n'y a pas d'augmentation significative du nombre de cellules avec un potentiel mitochondrial bas après irradiation (de 5% à 11%,  $p>0,05$ ). Ces résultats indiquent que la chute du potentiel mitochondrial est sous le contrôle de la voie p53-dépendante.

Puis, pour déterminer si cette chute du potentiel intervient en amont ou en aval de l'activation des caspases, nous avons traité les cellules TK6 avant l'irradiation, avec l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk.

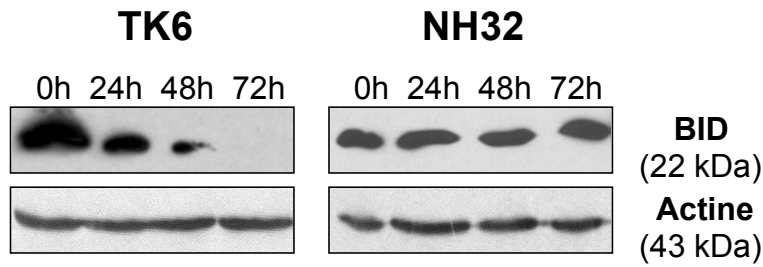


**Figure 75 :** Intervention des caspases dans les dommages mitochondriaux induits par les neutrons rapides. Les cellules TK6 ont été traitées par l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk (50  $\mu\text{M}$ ), 1 h avant l'irradiation par les neutrons, à 4 Gy. La chute du potentiel mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a été mesurée à l'aide du JC-1, 24 h après irradiation. Le pourcentage représente le nombre de cellules présentant une chute du  $\Delta\Psi_m$ . Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Comme l'indique la Figure 75, z-VAD-fmk inhibe fortement le décalage vers la gauche du pic de fluorescence rouge du JC-1, observé dans les cellules TK6 irradiées, ce qui révèle que les caspases sont partiellement responsables de la chute du potentiel mitochondrial. Une diminution de ces dommages mitochondriaux suite au traitement par l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk, a aussi été décrite, après exposition aux photons (Chen *et al.* 2000). Par contre, l'inhibiteur spécifique de la caspase-3, Ac-DEVD-CHO ne prévient pas la chute du potentiel mitochondrial dans les cellules TK6 après exposition aux neutrons rapides, ce qui indique que l'activation de la caspase-3 se produirait en aval des dommages mitochondriaux.

## **2.5. L'apoptose p53-dépendante fait intervenir BID**

Etant donné que nos résultats montrent que les caspases sont activées avant la chute du potentiel membranaire mitochondrial, nous nous sommes ensuite demandés si, comme dans la voie des récepteurs de mort, la protéine BID pouvait jouer un rôle dans les dommages mitochondriaux causés par les neutrons rapides. BID est un membre pro-apoptotique de la famille BCL-2. Sa forme inactive de 22 kDa est clivée par les caspases, résultant en un fragment actif de 15 kDa (Luo *et al.* 1998). Ainsi, pour étudier l'implication de BID dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, nous avons effectué un western blot de la protéine BID sur les deux lignées cellulaires après irradiation à 4 Gy. La Figure 76 met en évidence la présence de BID inactif de 22 kDa dans les deux lignées cellulaires.



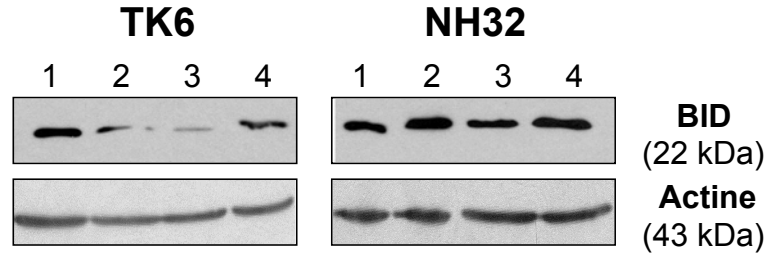
**Figure 76 : Détermination du clivage de BID, par western blot, après irradiation par les neutrons rapides.** Aux temps indiqués après irradiation à 4 Gy, les cellules ont été lysées et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse. La protéine BID a été détectée grâce à un anticorps spécifique de sa forme inactive (22 kDa). Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Le western blot de l'actine est utilisé comme contrôle pour s'assurer qu'une quantité identique de protéines est déposée pour chaque échantillon. Les données obtenues pour les cellules TK6 montrent une diminution de la forme inactive de 22 kDa de BID à partir de 24 h après irradiation, avec une disparition complète 72 h après irradiation, suggérant que la forme inactive a été clivée en sa forme active (Figure 76). Par contre, dans les cellules NH32, aucune modification significative de l'expression de BID n'a pu être détectée après irradiation, même à 72 h. Ces résultats amènent à la conclusion que BID est uniquement impliqué dans la voie apoptotique dépendante de p53, induite par les neutrons rapides.

## 2.6. Identification de la caspase responsable du clivage de BID

BID peut être activé par la caspase-8 ou par la caspase-3 (Belka *et al.* 2000). Nous avons donc entrepris d'autres expériences pour identifier la caspase responsable du clivage de BID suite à une exposition aux neutrons rapides. Pour cela, deux inhibiteurs spécifiques de caspase ont été utilisés : l'Ac-IETD-CHO et l'Ac-DEVD-CHO qui inhibent respectivement la caspase-8 et la caspase-3 et un western blot de BID a été réalisé après irradiation des cellules TK6 à 4 Gy. La

Figure 77 montre clairement la disparition de la proforme de BID après irradiation. Cette diminution de BID est inhibée par le traitement avec l'Ac-IETD-CHO mais pas par l'Ac-DEVD-CHO.



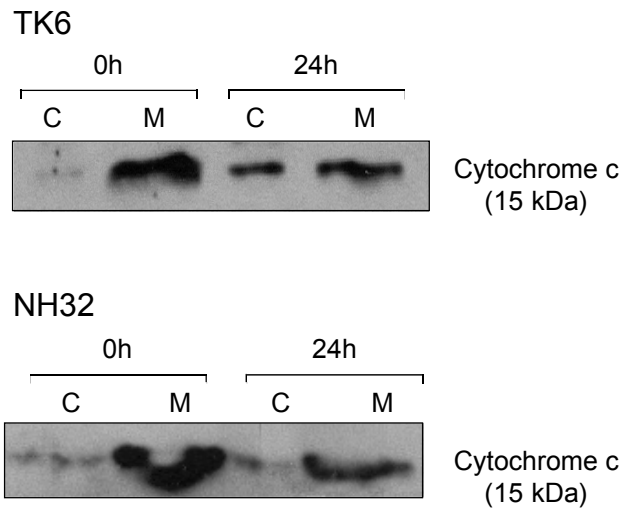
*Figure 77 : Effets de l'inhibition de la caspase-3 et de la caspase-8 sur le clivage de BID, 24 h après irradiation par les neutrons rapides. (1) cellules non irradiées, (2) cellules irradiées à 4 Gy, (3) cellules traitées par l'Ac-DEVD-CHO (200  $\mu$ M) et irradiées à 4 Gy, (4) cellules traitées par l'Ac-IETD-CHO (200  $\mu$ M) et irradiées à 4 Gy. L'actine sert de témoin pour la quantité de protéines. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.*

Les résultats concernant les cellules NH32 sont donnés à titre de contrôle. Ainsi, dans les cellules TK6, seule l'addition de l'inhibiteur de la caspase-8 prévient le clivage de BID, suggérant que la caspase-8 est responsable de l'activation par les neutrons rapides de la protéine BID.

## 2.7. Libération du cytochrome c de la mitochondrie lors de l'apoptose p53-dépendante

Nous avons montré que lors de l'apoptose p53-dépendante induite par les neutrons rapides, les caspases interviennent en amont de la mitochondrie et BID est activé par la caspase-8. Pour approfondir ce modèle de signalisation, nous avons tenté de définir si BID une fois activé interagissait avec la mitochondrie et favorisait la libération du cytochrome c. Nous avons donc examiné la localisation du cytochrome c après irradiation à 4 Gy. Dans ce but, une séparation des fractions

cytoplasmique et mitochondriale des cellules a été effectuée par des centrifugations successives 24 h après irradiation. Puis la présence du cytochrome c dans ces différentes fractions a été détectée par western blot. Les résultats pour les deux lignées cellulaires sont présentés dans la Figure 78. Dans les conditions normales, le cytochrome c est localisé dans la mitochondrie des cellules TK6 et NH32. Par contre, après irradiation, une bande correspondant au cytochrome c est présente au niveau de la fraction cytoplasmique des cellules TK6. A l'opposé, pour les cellules NH32, la localisation du cytochrome c reste inchangée après irradiation. Ces résultats montrent que les neutrons rapides induisent la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme, mais uniquement lorsque p53 est présent.



**Figure 78 :** Libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme lors de l'apoptose induite par les neutrons rapides. Les cellules ont été prélevées 24 h après irradiation à 4 Gy et les fractions mitochondriale (M) et cytoplasmique (C) ont été séparées par centrifugation. Le cytochrome c (15 kDa) a été détecté par western blot.

La libération du cytochrome c conduit généralement à la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9. Nous avons déjà montré à l'aide des tests enzymatiques et des western blot, que les neutrons rapides sont à l'origine d'une activation précoce et élevée de la caspase-9 dans la lignée TK6 alors que dans les cellules NH32, la caspase-9 ne semble pas être activée en réponse aux neutrons rapides (Figures 68 et 71). Cette dernière hypothèse est confirmée par l'absence dans ces cellules déficientes en p53, de relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Ainsi, le cytochrome c pourrait participer à l'activation de cette protéase dans l'apoptose p53-dépendante induite par les neutrons rapides.

### 3. DISCUSSION

Dans ces travaux, nous avons apporté pour la première fois des informations sur les mécanismes responsables de l'initiation et du déroulement de l'apoptose induite par les neutrons rapides dans des lignées lymphoblastoïdes, différant par leur statut p53. Nous avons en particulier mis en évidence l'intervention de la protéine BID dans la voie apoptotique p53-dépendante et identifié la caspase-8 comme étant à l'origine du processus apoptotique déclenché par ces rayonnements à TEL élevé dans nos lignées cellulaires.

Dans le premier chapitre de ce travail de thèse, nous avons établi que la cytotoxicité des neutrons rapides est liée à l'induction de l'apoptose et à l'activation des caspases effectrices de type caspase-3, mais avec cependant des différences au niveau des cinétiques d'apparition de ces phénomènes selon le statut p53 des cellules. Le rôle essentiel des caspases dans l'apoptose provoquée par ce type de radiation a encore été confirmé dans cette étude, par l'observation de la diminution de l'apoptose après inhibition des caspases (Figure 67B). Ainsi, afin de définir les mécanismes responsables de l'activation de ces caspases effectrices, nous avons décidé d'examiner le rôle d'autres composants de la machinerie apoptotique.

#### 3.1. Nature des caspases activées après irradiation par les neutrons rapides

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'activation des caspases après irradiation. Dans les cellules TK6, les activités des trois caspases étudiées (-8, -9 et -3/7) présentent les mêmes profils d'activation, atteignant un maximum 24 h après irradiation, suivie par une diminution marquée (Figure 68). Les cellules NH32 sont quant à elles, caractérisées par une augmentation plus faible et progressive de ces activités jusqu'à 72 h après irradiation. Ces cinétiques d'activité des caspases peuvent être corrélées avec l'induction de l'apoptose dans les deux lignées cellulaires (Figure 67A, chapitre 1). Les caspases-8 et -9 interviennent donc dans le processus

apoptotique activé par les neutrons. Ces résultats indiquent également que la perte de p53 pourrait affecter l'apparition immédiate de l'apoptose probablement en inhibant l'initiation précoce de la cascade des caspases. Par conséquent, p53 semble nécessaire à l'activation des caspases initiatrices. De même, nous avons apporté la preuve que p53 influence l'activation des caspases effectrices après irradiation. En effet, alors que dans les cellules exprimant p53, les caspases-3 et -7 sont toutes les deux activées, la caspase-7 est l'unique caspase DEVDase activée dans les cellules déficientes en p53. Liang *et al.* ont également mis en évidence une activation de la caspase-7, sans induction de p53 après traitement par des drogues chimiothérapeutiques, dans des cellules MCF7 déficientes en procaspase-3 (Liang *et al.* 2001). p53 semble donc être indispensable à l'activation de la caspase-3 en réponse aux neutrons rapides, contrairement à ce qui a été montré par d'autres équipes (Yu et Little 1998). La caspase-7 quant à elle, serait activée par d'autres mécanismes non contrôlés par p53. Ces hypothèses s'accordent avec de récents travaux indiquant que ces deux effecteurs qui partagent des spécificités de substrats, diffèrent dans leur localisation subcellulaire et dans leur mode d'inhibition par XIAP, un membre de la famille IAP (Chandler *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2001). En effet, la caspase-3 serait localisée dans le cytoplasme et le noyau alors que la caspase-7 serait plutôt présente au niveau des microsomes (Zhivotovsky *et al.* 1999, Chandler *et al.* 1998). De plus, certains auteurs ont rapporté une inhibition de l'apoptose causée par un défaut de transfert de la caspase-3 active du cytoplasme vers le noyau (Joseph *et al.* 2001). Il nous reste à déterminer quels sont les mécanismes responsables de l'activation de la caspase-7 dans les cellules NH32.

### **3.2. Identification de la caspase initiatrice responsable de l'apoptose induite par les neutrons rapides**

Par la suite, nous avons cherché à identifier quelle caspase est à l'origine du processus apoptotique activé par les neutrons rapides. Nous avons tout d'abord déterminé si la caspase-9 pouvait être responsable de l'initiation de ce type de mort

cellulaire. Cette protéase est en général activée suite à des dommages mitochondriaux et à la formation de l'apoptosome, qui suit la libération du cytochrome c de la mitochondrie (Zou *et al.* 1999). Les résultats obtenus concernant l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose déclenchée par les neutrons rapides montrent que celle-ci n'intervient que dans la voie dépendante de p53 et que l'activation des caspases précède la chute du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules TK6. Ainsi, nos résultats excluent l'hypothèse selon laquelle la caspase-9 initie l'apoptose en présence de p53. Ils suggèrent également que la caspase-9 ne joue pas un rôle prépondérant dans la voie p53-indépendante étant donné que la mitochondrie n'intervient pas dans cette voie et que nous n'avons pu mettre en évidence d'activation de cette caspase dans les cellules NH32 (Figure 71). Ces données contredisent bon nombre de travaux qui placent la mitochondrie et la caspase-9 à l'origine de l'activation des caspases effectrices et du processus apoptotique activé par les radiations ionisantes (Taneja *et al.* 2001, Belka *et al.* 2000, Tepper *et al.* 1999). Il a même été montré qu'après irradiation de cellules Jurkat par des rayons X, l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk n'avait aucun effet sur la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la caspase-9 était responsable de l'induction de l'apoptose.

Le deuxième candidat pour l'initiation de l'apoptose induite par les neutrons rapides est la caspase-8. Nous avons montré que l'inhibition de cette caspase prévient l'activation des caspases effectrices-3 et -7 (Figures 69, 72) dans les cellules TK6, indiquant que la caspase-8 pourrait être responsable du déclenchement du processus apoptotique activé par les neutrons rapides dans notre modèle cellulaire. En outre, les études par western blot des cinétiques d'activation des caspases-3 et -8 renforcent cette hypothèse en indiquant que la caspase-8 serait activée en amont de la caspase-3. De même, la caspase-8 apparaît comme la caspase initiatrice dans l'apoptose induite par certaines drogues utilisées en chimiothérapie comme le cisplatine (Ferreira *et al.* 2000). Dans la voie des récepteurs de mort, cette caspase une fois activée conduit soit à l'activation de la caspase-3, soit au clivage de BID, qui va après interaction avec la mitochondrie, promouvoir la libération du cytochrome c conduisant ainsi à



l'activation séquentielle de la caspase-9 et de la caspase-3 (Li *et al.* 1998, Luo *et al.* 1998). Cette voie mitochondriale faisant intervenir la protéine BID a déjà été décrite dans l'apoptose induite par les rayons X (Belka *et al.* 1999, Boesen de Cock *et al.* 1999, Werner *et al.* 2004), mais le lien avec le statut p53 des cellules n'a jamais été étudié, de même que son rôle dans la mort cellulaire induite par les neutrons. Par conséquent, ces données justifient l'étude de cette voie de signalisation après irradiation par les neutrons rapides. Comme la caspase-8 est activée par l'irradiation, nous nous sommes demandés si la protéine BID est clivée suite à l'exposition à ces rayonnements. Nos résultats révèlent que l'expression de BID n'est pas altérée par l'irradiation dans les cellules NH32. A l'opposé, dans les cellules TK6 la présence de la forme inactive de BID diminue en fonction du temps, ce qui témoigne du clivage de cette proforme en protéine BID active. L'importance du clivage de BID a déjà été rapportée après irradiation par des rayons X (Werner *et al.* 2004, Belka *et al.* 1999). Cependant, dans notre modèle, l'activation de BID est dépendante de p53. En outre, la protéolyse de cette protéine peut être atténuée par l'inhibiteur spécifique de la caspase-8, suggérant que BID est clivé par cette caspase initiatrice, elle-même activée par un mécanisme dépendant de p53. Donc, ces données soutiennent l'idée que la caspase-8 pourrait être responsable de la voie apoptotique dépendante de p53, en activant des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2. Cette relation entre p53 et la caspase-8 a déjà été mise en évidence dans d'autres travaux où l'induction de p53 dans des cellules de lymphome conduit à l'activation de la caspase-8 qui entraîne la translocation de BAX dans la mitochondrie suivie de la libération du cytochrome c et de l'activation de la caspase-9 (Gao *et al.* 2001). Par contre, d'autres études ont décrit une voie apoptotique régulée par p53, indépendante de la caspase-8 et ne faisant intervenir ni le clivage de BID, ni le relargage du cytochrome c de la mitochondrie (Li *et al.* 1999). Ces données contradictoires reflètent la complexité des mécanismes apoptotiques, qui diffèrent probablement d'un type cellulaire à l'autre.

### 3.3. p53 et la voie d'amplification mitochondriale

L'absence du clivage de BID dans l'apoptose indépendante de p53, induite par les neutrons rapides ainsi que l'absence de dommages mitochondriaux observée dans les cellules NH32, par opposition aux cellules TK6 suggèrent que BID une fois activé après irradiation, pourrait induire les dommages mitochondriaux, en présence de p53. Pour renforcer cette hypothèse, nous avons étudié la localisation du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 après irradiation, par western blot. En effet, l'un des mécanismes d'action de la protéine BID activée est l'induction de la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme, soit en formant elle-même des pores dans la membrane (Schendel *et al.* 1999), soit en activant BAX (Eskes *et al.* 2000). Le cytochrome c contribue alors à l'activation de la caspase-9 par formation de l'apoptosome (Zou *et al.* 1999). Après irradiation par les neutrons rapides, le cytochrome c est retrouvé dans le cytoplasme des cellules TK6, alors que dans les cellules déficientes en p53, ce composé reste localisé dans la mitochondrie. Le western blot de la procaspase-9 montre l'activation dès 24 h de cette caspase dans les cellules TK6. Dans les cellules NH32, la caspase-9 ne semble pas intervenir après irradiation. Ces résultats mettent en évidence à la fois l'activation de BID, la chute du potentiel mitochondrial, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-9, lors de l'apoptose p53-dépendante induite par les neutrons rapides. Des travaux précédents ont également démontré la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-9, après irradiation par des photons (Ogawa *et al.* 2002, Thiagarajah *et al.* 2000, Chen *et al.* 2000). Les résultats obtenus dans les cellules NH32 confirment l'absence de voie apoptotique mitochondriale. De même, une induction d'apoptose indépendante de la libération du cytochrome c a été décrite dans des cellules de myélome traitées par de la dexaméthasone (Chauhan *et al.* 1997).

Par ailleurs, nous avons également montré que l'inhibiteur de la caspase-3, Ac-DEVD-CHO prévient les activités des caspases-8 et -9. Comme des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres modèles cellulaires, nous pouvons conclure que la caspase-3 pourrait être à l'origine d'un contrôle rétroactif positif sur ces deux caspases, qui semble être un mécanisme commun dans l'apoptose (Sun *et al.* 1999, Vit

*et al.* 2001). Ces données renforcent tous nos résultats, et indiquent que l'apoptose induite par les neutrons rapides résulte principalement des dommages de l'ADN placés sous le contrôle de p53 (Coelho *et al.* 2002). Des expériences futures permettront de déterminer si nos résultats sont spécifiques des neutrons rapides ou de notre modèle cellulaire.

En conclusion, notre étude apporte la preuve de l'induction par les neutrons rapides de deux voies apoptotiques qui diffèrent par la nature des caspases effectrices activées et dans l'intervention de la mitochondrie. Nos résultats relient également l'apoptose dépendante de p53 à l'activation de BID par la caspase-8. A ce sujet, une étude récente a d'ailleurs démontré que BID est régulé transcriptionnellement par p53, après traitement par l'adriamycine ou le 5-fluorouracile (Sax *et al.* 2002). Ainsi, nos résultats sont en accord avec ces données, soutenant l'idée que BID est un composant essentiel de l'apoptose p53-dépendante induite par des agents génotoxiques.

Notre étude identifie non seulement BID comme intervenant clé dans la voie dépendante de p53 mais clarifie également les mécanismes moléculaires de l'induction de l'apoptose par les neutrons rapides. Grâce à ces résultats, nous pouvons établir un premier modèle de signalisation apoptotique activé par ces rayonnements à TEL élevé (Figure 79). Ainsi, suite à l'exposition aux neutrons rapides, la protéine p53 conduit à l'activation de la caspase-8. Cette dernière, une fois activée, clive BID, lui permettant alors d'interagir avec la membrane mitochondriale, induisant la chute du potentiel mitochondrial et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. La survenue du dysfonctionnement mitochondrial avant la libération du cytochrome c a été montrée par plusieurs travaux (Ogawa *et al.* 2002, Chen *et al.* 2000). Le cytochrome c contribue ensuite à l'activation de la caspase-9, qui à son tour active les caspases-3 et -7. Ces caspases effectrices sont à l'origine d'une amplification du signal apoptotique en activant une plus grande quantité de caspases-8, résultant ainsi en une apoptose massive et rapide dans les cellules

exprimant p53. Les étapes moléculaires induites entre p53 et la caspase-8 sont inconnues et feront l'objet d'investigations ultérieures.

En l'absence de p53, les neutrons rapides activent une autre voie apoptotique plus tardive, indépendante du clivage de BID et de la mitochondrie, et faisant uniquement intervenir la caspase-8 et la caspase-7. D'autres expériences seront également nécessaires pour comprendre comment la caspase-7 est activée dans la voie indépendante de p53.

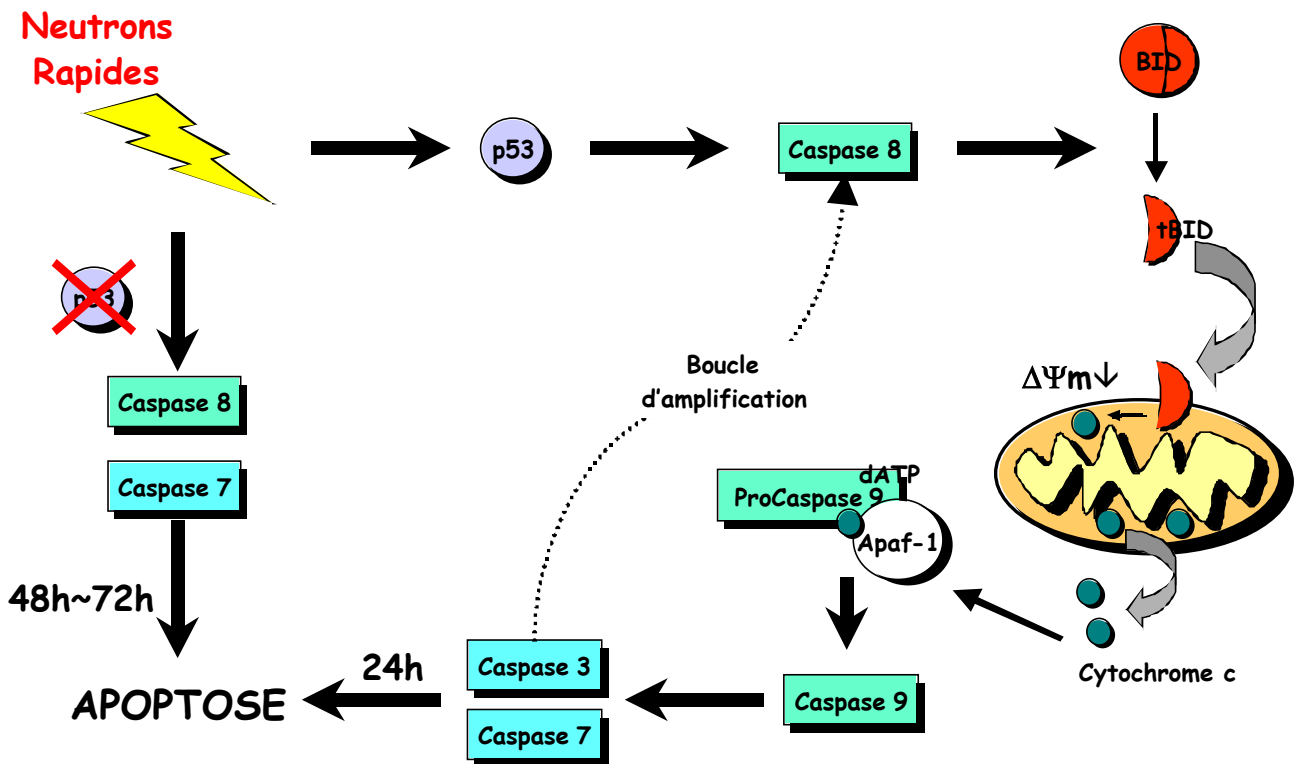


Figure 79 : Modèle de signalisation de l'apoptose induite par les neutrons rapides en fonction de p53, dans les cellules lymphoblastoïdes humaines.

### Chapitre 3

## **ROLE DU RECEPTEUR FAS DANS L'APOPTOSE INDUITE DANS DES LIGNEES LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES PAR DES NEUTRONS RAPIDES**

### *RESUME*

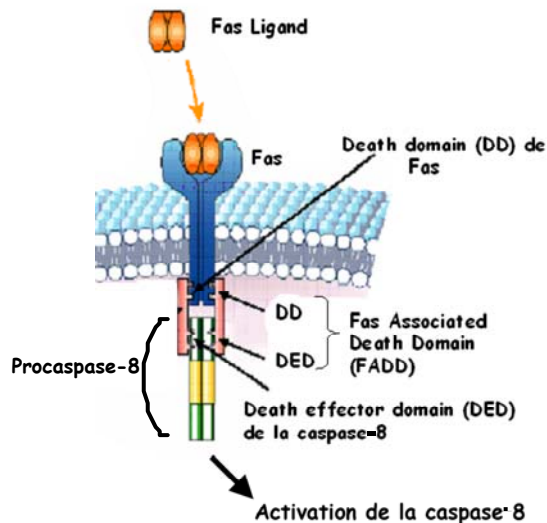
Nous avons montré que l'apoptose induite par les neutrons rapides diffère selon le statut p53 des cellules lymphoblastoïdes humaines et que la caspase-8 est impliquée dans l'initiation de l'apoptose dépendante de p53. Comme il a été rapporté que le récepteur de mort Fas pouvait intervenir en amont de la caspase-8, nous avons évalué l'implication de ce récepteur dans l'activation de cette caspase suite à l'exposition aux neutrons rapides. Nous avons d'abord vérifié que nos lignées cellulaires exprimaient le récepteur Fas et que celui-ci était capable d'induire l'apoptose après stimulation. L'expression de Fas ainsi que celle de son ligand FasL après irradiation par les neutrons ont ensuite été mesurées par cytométrie en flux et western blot. Nos résultats indiquent que les neutrons rapides n'induisent pas une sur-expression de Fas dans les cellules TK6 et NH32, mais plutôt une diminution de son expression. En outre, les neutrons ne provoquent pas d'induction de FasL. Comme certains travaux ont mis en évidence une activation directe de Fas, sans induction de son ligand et sans sur-expression, par induction de l'agrégation de plusieurs récepteurs, nous avons donc testé par microscopie à fluorescence si les neutrons rapides pouvaient provoquer cette agrégation de Fas. Nos résultats ne montrent aucune agrégation de Fas à la surface des cellules, après irradiation. De plus, le traitement des lignées avant l'irradiation, à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, qui inhibe la formation des agrégats de Fas, n'a aucun effet sur la survie des cellules. Ces travaux permettent de conclure que Fas n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par les neutrons rapides.

Une publication reprenant ces résultats a été soumise pour publication (Fischer *et al.* 2004).

## 1. INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré que la protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle majeur dans l'apoptose induite par les neutrons rapides. Ces rayonnements à TEL élevé activent deux voies de signalisation apoptotique dans les cellules lymphoblastoïdes en fonction de p53. L'apoptose dépendante de p53 est caractérisée par le clivage de BID par la caspase-8 qui conduit par l'intermédiaire de la mitochondrie, à l'activation des caspases-9, -3 et -7. La seconde voie apoptotique, indépendante de p53, fait uniquement intervenir la caspase-8 et la caspase-7, sans activation de BID, ni implication de la mitochondrie. Un des points communs entre ces deux voies est l'activation de la caspase-8, bien que cette dernière soit activée plus rapidement dans la voie dépendante de p53. Les mécanismes cellulaires à l'origine de l'activation de la caspase-8 dans ces deux voies de signalisation sont encore inconnus.

Or, la caspase-8 est la caspase initiatrice du processus apoptotique suite à l'activation des récepteurs de mort. En effet, dans la voie de Fas/Fas Ligand (FasL), les



*Figure 80 : Activation de la caspase-8 par le récepteur Fas. DD : domaine de mort, DED : domaine effecteur de mort.*

récepteurs, une fois activés, s'oligomérisent et recrutent la procaspase-8 au niveau de leur partie cytoplasmique, par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice FADD, ce qui résulte en une activation autocatalytique de la caspase-8 (Figure 80). Cette

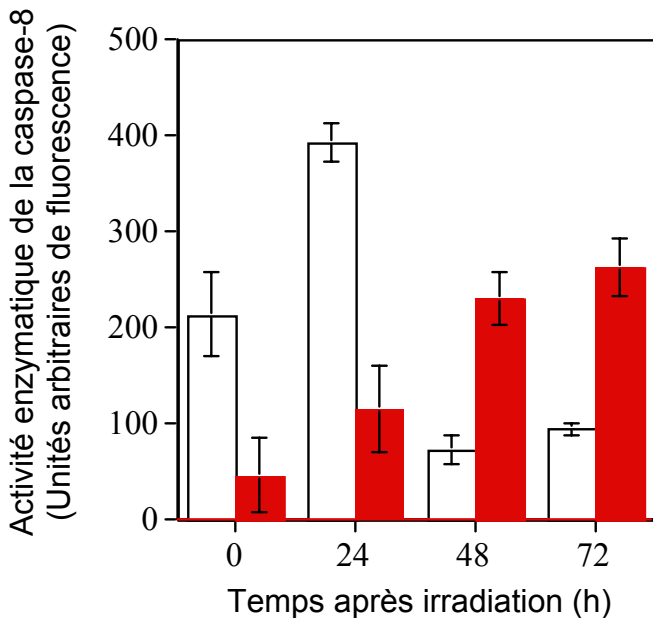
dernière clive et active alors directement la caspase-3, dans les cellules dites de type I. Dans d'autres cellules, les cellules de type II, la caspase-8 nécessite une étape mitochondriale pour activer la caspase-3 : après activation, elle clive BID, qui induit la libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'activation de la caspase-9 qui, à son tour, active la caspase-3 (Barnhart *et al.* 2003, Peter et Krammer 1998). Comme la stimulation de Fas induit l'activation de la caspase-8, ce récepteur pourrait être à l'origine de l'apoptose induite par les neutrons rapides.

De même, de nombreuses études ont indiqué que certaines drogues anti-cancéreuses ainsi que les rayons  $\gamma$  peuvent déclencher l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires, par l'intermédiaire du système Fas (Friesen *et al.* 1996, Abdulkarim *et al.* 2000, Embree-Ku *et al.* 2002). De plus, Fulda *et al.* ont rapporté une sur-expression de Fas induite par l'irradiation  $\gamma$  uniquement dans des cellules tumorales de cerveau exprimant p53 et non dans les cellules mutées pour p53 (Fulda *et al.* 1998). Ainsi la voie apoptotique p53-dépendante, décrite après exposition aux neutrons rapides dans les cellules TK6, pourrait être induite par la voie Fas, elle-même activée par p53. Au contraire, d'autres travaux suggèrent que Fas n'est pas requis pour l'induction de la mort cellulaire par des agents cytotoxiques (Gamen *et al.* 1997, Newton et Strasser 1998, Ogawa *et al.* 1998). Donc, les données concernant l'intervention de Fas dans l'apoptose radio-induite restent contradictoires. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans cette étude au rôle de Fas dans les étapes moléculaires précoces de l'apoptose induite par les neutrons rapides, en fonction de p53. Les expressions de Fas et de son ligand FasL après irradiation ont été analysées dans les cellules TK6 ainsi que dans les cellules NH32. Nous avons également testé si les neutrons rapides peuvent induire l'activation directe des récepteurs Fas sans régulation transcriptionnelle du récepteur ou du ligand mais par induction de l'agrégation de ces récepteurs.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Activation de la caspase-8 par les neutrons rapides

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la caspase-8 est la caspase initiatrice de l'apoptose induite par les neutrons rapides en présence de p53. Son activation a également été établie dans la voie apoptotique indépendante de p53. Dans les cellules TK6, la caspase-8 est activée dès 24 h après irradiation à 4Gy, tandis que dans les cellules NH32, l'activation de la caspase-8 ne devient significative qu'à 48 h et 72 h. La Figure 81 rappelle ces résultats.



**Figure 81 : Activation de la caspase-8 induite par les neutrons rapides.** Les cellules TK6 (□) et NH32 (■) ont été irradiées à 4 Gy et l'activité enzymatique de la caspase-8 a été analysée 24h après irradiation par des tests fluorimétriques utilisant le substrat Ac-IETD-amc. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$ SD d'une expérience représentative réalisée en triplicate.

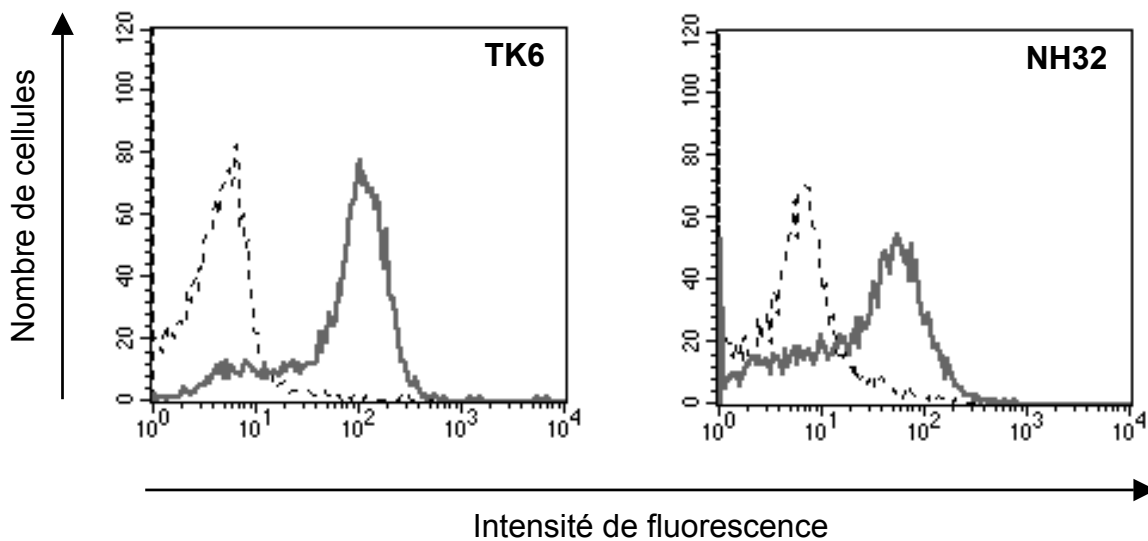
L'absence de p53 retarde l'activation de la caspase-8, suggérant que deux mécanismes différents peuvent être responsables du clivage de cette caspase, suivant le statut p53 des cellules.



## 2.2. Les cellules TK6 et NH32 sont sensibles à l'apoptose induite par Fas

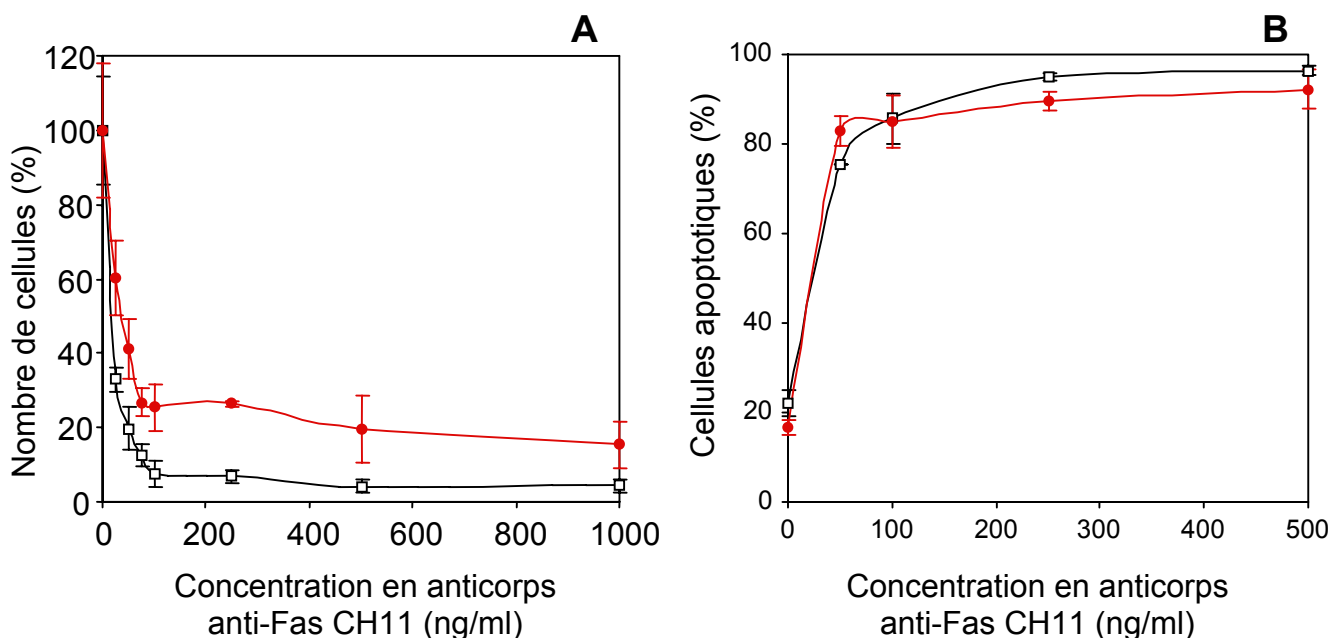
La caspase-8 peut être activée par la voie des récepteurs de mort et plus particulièrement par Fas (Peter et Krammer 1998, Juo *et al.* 1998). Ainsi, le système de Fas pourrait être à l'origine de l'activation de la caspase-8, observée dans l'apoptose induite par les neutrons rapides dans notre modèle cellulaire.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord examiné si nos lignées cellulaires expriment le récepteur Fas et si la stimulation de celui-ci entraîne la mort des cellules. Dans ce but, l'expression de Fas a été analysée par cytométrie en flux, après marquage des cellules avec un anticorps anti-Fas couplé au fluorochrome FITC. Les résultats obtenus, exposés dans la Figure 82, montrent que les cellules TK6 ainsi que les cellules NH32 expriment constitutivement le récepteur Fas à leur surface.



**Figure 82 : Analyse de l'expression constitutive de Fas.** Les cellules TK6 (à gauche) et NH32 (à droite) ont été analysées par cytométrie en flux après marquage avec un contrôle isotype IgG1-FITC (en pointillés) et un anticorps Anti-Fas-FITC (en gris continu). L'IgG1-FITC sert de contrôle négatif pour la fluorescence observée et permet d'éliminer les fixations aspécifiques de l'anticorps. L'expression constitutive de Fas est mise en évidence par le décalage vers la droite du pic de fluorescence observé avec anti-Fas-FITC en comparaison avec le pic obtenu pour IgG1-FITC.

Puis, pour étudier si la voie de signalisation de Fas est intacte dans nos cellules, nous avons incubé les deux lignées cellulaires avec des concentrations croissantes d'un anticorps anti-Fas « agoniste », CH11, décrit comme un activateur du récepteur Fas (Itoh *et al.* 1991). La prolifération cellulaire en présence de cet anticorps a été quantifiée par le test Uptiblué, après deux jours de culture. Les résultats indiquent que la stimulation de Fas cause une diminution significative de la prolifération cellulaire, en fonction de la dose d'anticorps, dans les deux types cellulaires (Figure 83A). Cependant, les cellules TK6 montrent une plus grande sensibilité à l'anticorps anti-Fas CH11 que les cellules NH32. En effet, après traitement à 1 µg/ml d'anticorps, la croissance cellulaire atteint 15% dans les cellules déficientes en p53, alors que dans les cellules TK6, elle reste en dessous de 5%.

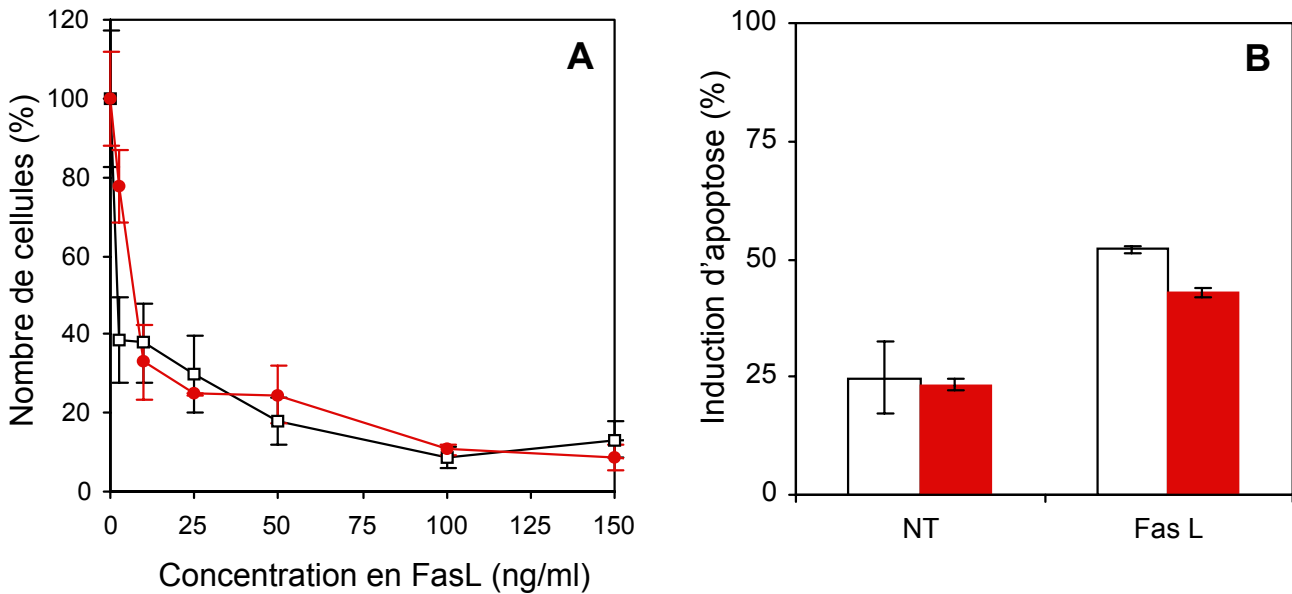


**Figure 83 :** Les cellules TK6 sont sensibles à Fas, quel que soit leur statut p53. (A) Prolifération cellulaire mesurée par les test UptiBlue. Les cellules TK6 (□) et NH32 (●) ont été cultivées pendant 2 jours en présence de l'anticorps anti-Fas CH11. Les valeurs sont les moyennes de quatre échantillons d'une expérience représentative. (B) Externalisation des phosphatidylsérines dans les cellules TK6 (□) et NH32 (●), 16 h après traitement par l'anticorps anti-Fas CH11. L'apoptose est exprimée par le pourcentage de cellules positives à l'annexine V-FITC. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

Ensuite, pour déterminer si l'inhibition de la prolifération cellulaire est la conséquence d'une mort cellulaire par apoptose, nous avons mesuré l'externalisation des phosphatidylsérines après traitement à l'anticorps anti-Fas CH11, par marquage

à l'annexine V-FITC des cellules et analyse en cytométrie en flux. La Figure 83B montre une relocalisation des phosphatidylsérines dans les cellules TK6 et NH32, 16 h après traitement. L'apoptose mesurée atteint son maximum à la concentration de 250 ng/ml d'anticorps anti-Fas CH11. Des concentrations plus élevées d'anti-Fas CH11 ne conduisent pas à une augmentation de l'apoptose, ce qui suggère qu'à cette concentration, les récepteurs Fas sont tous saturés par l'anticorps. Ici aussi, nous pouvons remarquer une faible différence entre les deux types cellulaires avec moins d'apoptose dans les cellules NH32 que dans les cellules TK6.

Enfin, pour s'assurer que l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas CH11 n'est pas due à un artefact, nous avons vérifié si le récepteur Fas pouvait induire l'apoptose après stimulation par son ligand naturel.



**Figure 84 : Effets de FasL sur les cellules TK6 (□) et NH32 (●).** (A) Prolifération cellulaire après traitement avec FasL. Les cellules ont été traitées par la protéine recombinante FasL pendant 2 jours, puis la prolifération cellulaire a été mesurée par le test UptiBlue. Les valeurs sont les moyennes d'une expérience représentative réalisée simultanément sur quatre échantillons. (B) Induction d'apoptose par FasL. Les cellules ont été marquées par l'annexine V-FITC et analysées par cytométrie en flux, 24 h après traitement avec 50 ng/ml de FasL. Les résultats présentés sont les moyennes des valeurs obtenues lors de trois expériences indépendantes. NT : cellules non traitées, Fas L : cellules traitées avec FasL.

Pour cela, les cellules TK6 et NH32 ont été traitées par la protéine recombinante FasL et l'effet de ce traitement a été mesuré sur la prolifération cellulaire et l'induction d'apoptose (Figure 84). De même qu'avec le traitement par l'anticorps anti-Fas CH11, une réduction de la survie cellulaire est observée en fonction de la concentration de FasL dans les cellules TK6 et NH32 (Figure 84A). Cette diminution de la viabilité est également associée à une induction d'apoptose dans ces lignées (Figure 84B).

L'ensemble de ces données démontre que les cellules TK6 et NH32 présentent une expression basale de Fas à leur surface et entrent en apoptose après stimulation de ce récepteur.

### **2.3. Etude de l'expression de Fas après irradiation par les neutrons rapides**

Après avoir montré l'expression constitutive de Fas dans nos lignées cellulaires, nous avons vérifié si l'irradiation par les neutrons rapides provoquait une sur-expression de ce récepteur. L'expression de Fas a été mesurée par cytométrie en flux après irradiation des cellules TK6 et NH32 à 4 Gy. L'analyse des histogrammes obtenus est présentée sur la Figure 85. Dans les deux lignées cellulaires, l'expression de Fas dans les cellules irradiées reste identique à celle des contrôles non irradiés, 12 h après irradiation. Par contre, l'apparition d'un deuxième pic de fluorescence à gauche du premier, à partir de 24 h après irradiation, montre que l'expression de Fas décroît dans les deux types cellulaires. Cette diminution est encore accentuée à 48 h. Afin de s'assurer que cette réduction de l'expression de Fas après irradiation n'est pas causée par un manque d'anticorps de marquage (anti-Fas-FITC), les mêmes expériences ont été effectuées avec des concentrations croissantes d'anticorps anti-Fas-FITC. Des résultats similaires ont été obtenus, indiquant que la baisse de l'expression de Fas est due à l'irradiation par les neutrons rapides. Pour compléter ces résultats, des western blot de Fas ont également été réalisés à différents temps après irradiation (Figure 86).

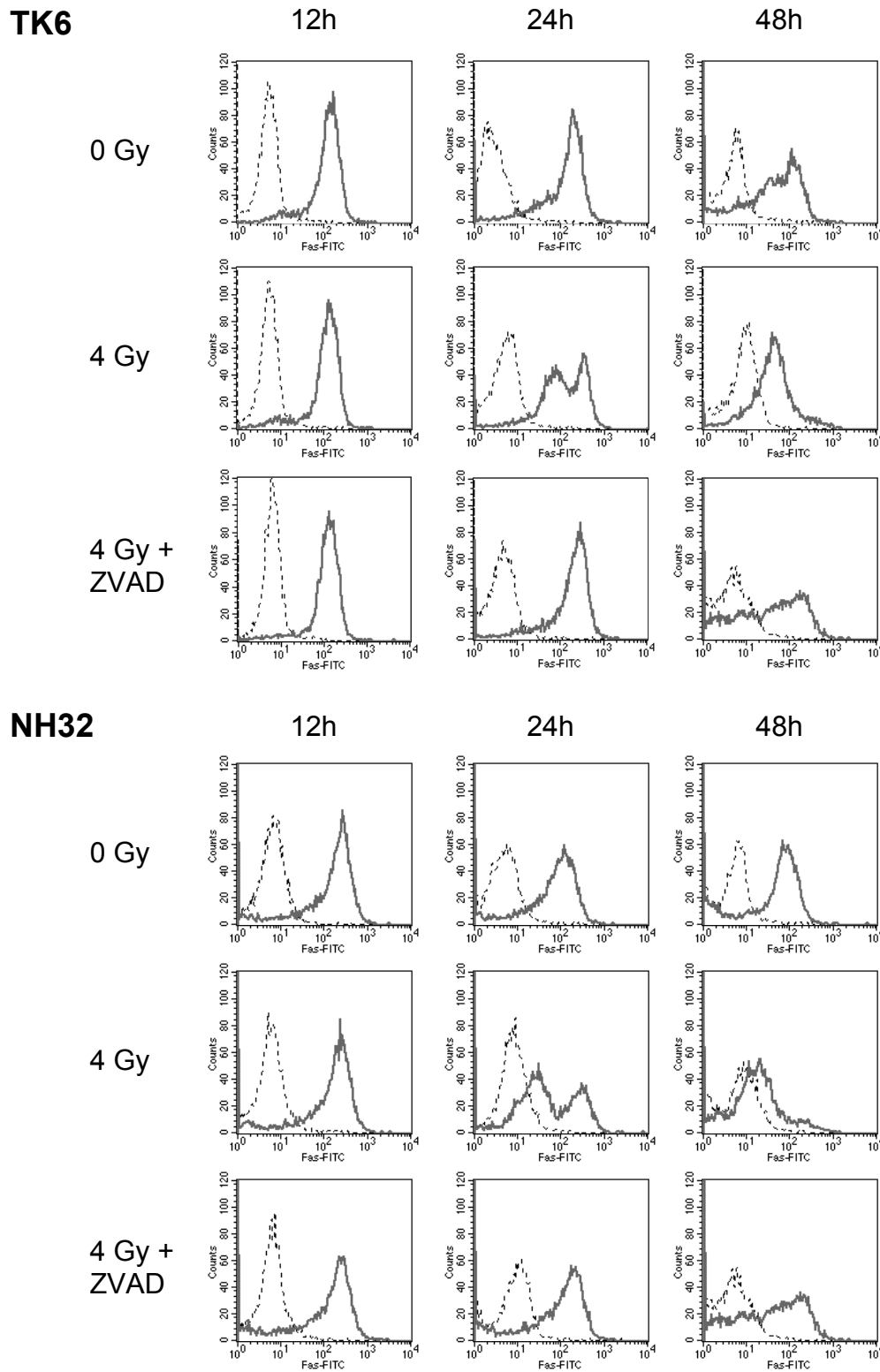
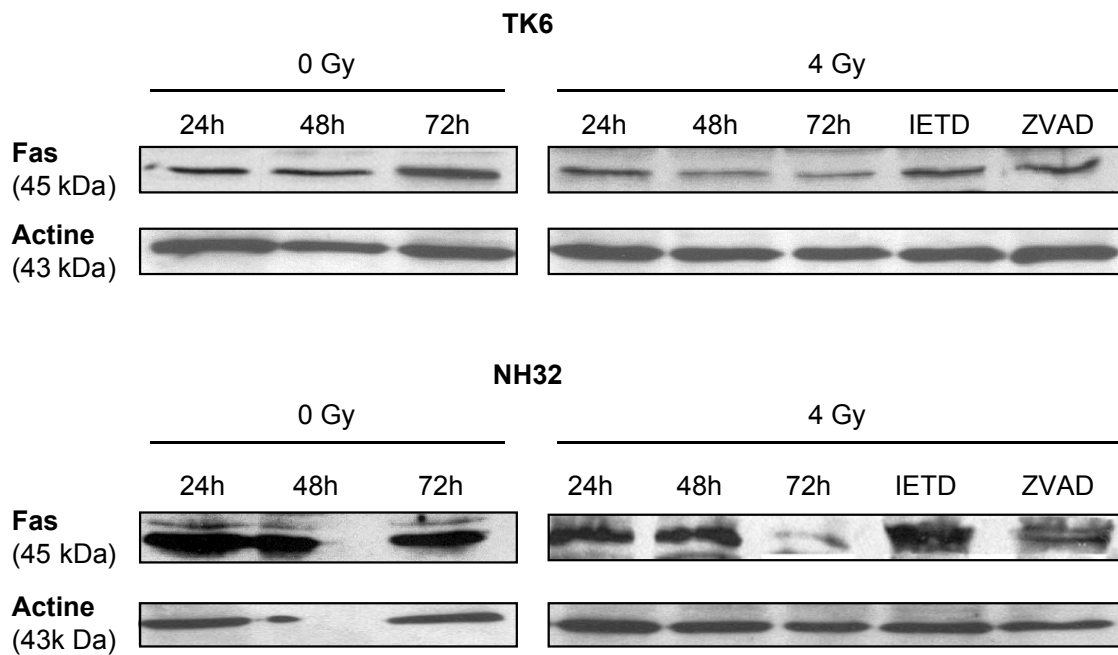


Figure 85 : Expression de Fas après irradiation par les neutrons rapides, mesurée par cytométrie en flux. Après irradiation, les cellules TK6 (en haut) et NH32 (en bas) ont été marquées à différents temps après irradiation à 4 Gy, par l'IgG1-FITC (en pointillés) ou par l'anticorps anti-Fas-FITC (en gris continu), à 4°C pendant 1 h. 0 Gy : contrôles non irradiés, 4 Gy : cellules irradiées à 4 Gy, 4 Gy + ZVAD : cellules traitées avec l'inhibiteur de caspases, z-VAD-fmk (50  $\mu$ M), 1 h avant l'irradiation à 4 Gy. Ces résultats sont représentatifs de six expériences indépendantes.

L'expression de Fas est importante dans les cellules non irradiées, et n'est pas augmentée après irradiation par les neutrons rapides. En revanche, à partir de 24 h après irradiation, une diminution de la bande correspondant à Fas est observée dans les cellules TK6 et dans les cellules NH32, ce qui confirme les données de cytométrie en flux.



**Figure 86 :** Analyse par western blot de Fas après irradiation par les neutrons rapides. Aux différents temps indiqués après irradiation à 4 Gy, les cellules TK6 et NH32 ont été lysées et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane de nitrocellulose pour la détection de Fas. IETD et ZVAD indiquent les échantillons qui ont été prétraités 1 h avant l'irradiation par les inhibiteurs de caspases Ac-IETD-CHO (200  $\mu$ M) et z-VAD-fmk (50  $\mu$ M) et prélevés 24 h après l'irradiation. L'expression de l'actine montre qu'une quantité identique de protéines a été déposée dans chaque puits.

En outre, le traitement des cellules par l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk, 1 h avant l'irradiation, inhibe fortement la diminution de l'expression de Fas provoquée par l'irradiation dans les deux lignées cellulaires (Figures 85, 86). Cet effet est mis en évidence à la fois sur les western blot et en cytométrie en flux, où le traitement par cet inhibiteur empêche le décalage du pic de fluorescence vers la gauche. De tels résultats suggèrent que la réduction de l'expression de Fas après irradiation par les neutrons rapides est dépendante de l'activation des caspases. De même, le traitement

des deux lignées avant l'irradiation, avec l'inhibiteur spécifique de la caspase-8 Ac-IETD-CHO inhibe également la baisse d'intensité de la bande correspondant à Fas, observée après irradiation (Figure 86). Ainsi, la caspase-8 est impliquée dans la diminution de Fas.

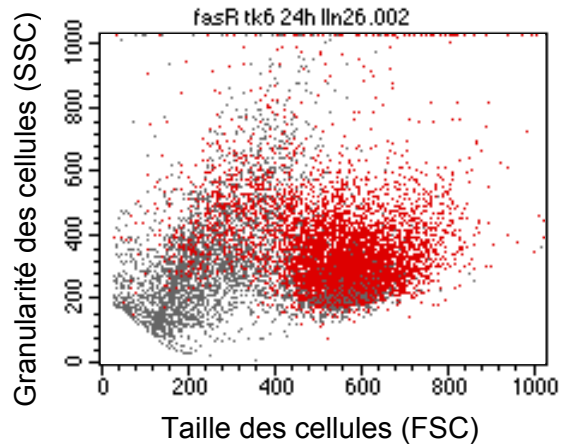
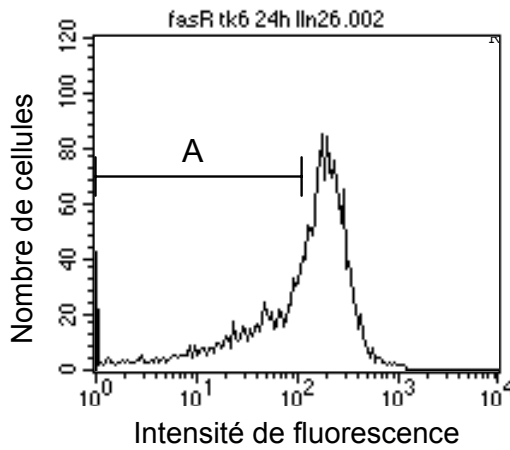
Nous avons également montré par cytométrie en flux, que les cellules présentant cette diminution de l'expression de Fas après irradiation présentent également les principales caractéristiques des cellules apoptotiques. En effet, ces cellules ont une plus petite taille ainsi qu'une granularité plus importante que les cellules non irradiées, exprimant Fas normalement (Figure 87).

**Sur la page suivante :**

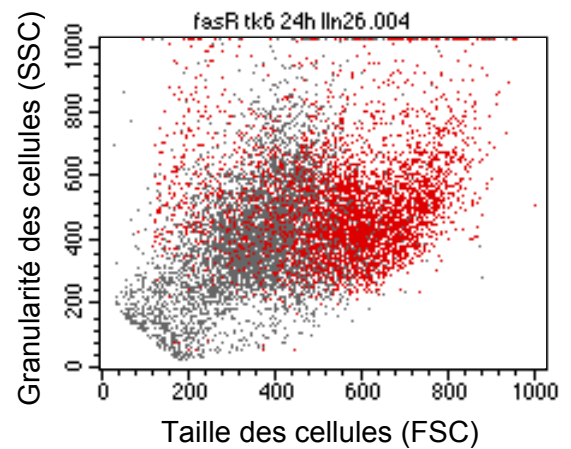
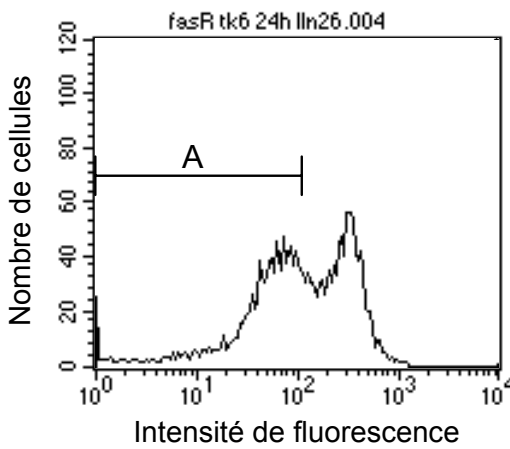
**Figure 87 :** Les cellules montrant une diminution de l'expression de Fas présentent les caractéristiques des cellules apoptotiques. Les cellules TK6 (en haut) et les cellules NH32 (en bas) ont été irradiées à 4 Gy par les neutrons rapides et leur expression de Fas a été mesurée comme précédemment. A gauche sont représentés les histogrammes avec les expressions de Fas avant et après irradiation. A droite, les graphiques en nuage de points montrent la granularité ainsi que la taille des cellules figurant sur l'histogramme de gauche. Le marqueur « A » délimite les cellules avec une baisse de l'expression de Fas, et ces cellules sont représentées en gris sur le graphique en nuage de points de droite. On peut remarquer qu'après l'irradiation, les cellules mises en évidence par le marqueur « A » sont plus petites et ont une granularité importante, ceci aussi bien pour les cellules TK6 que pour les cellules NH32.

**TK6**

**0 Gy**

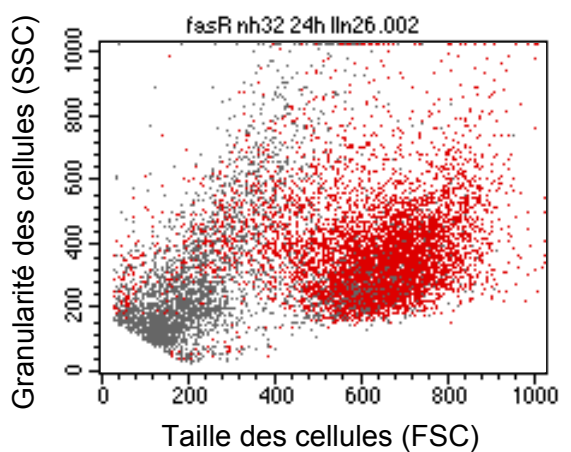
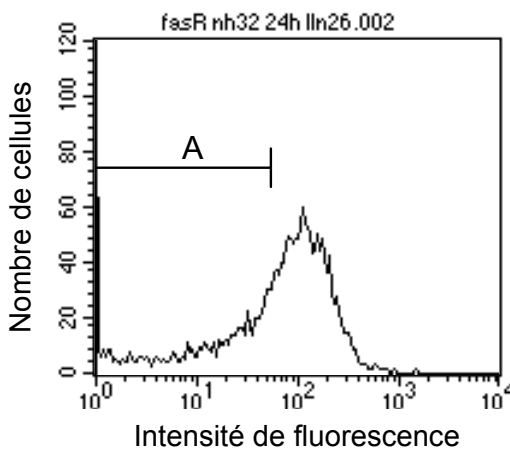


**4 Gy**

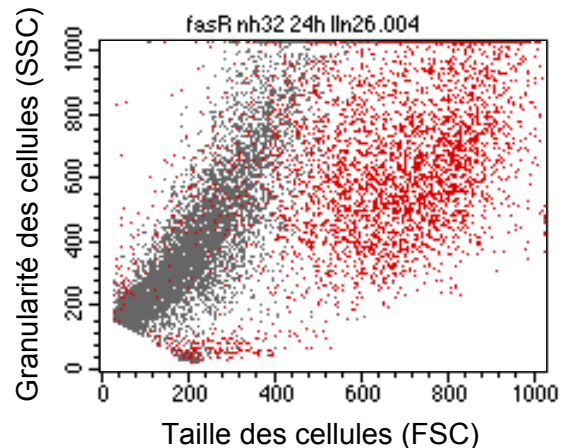
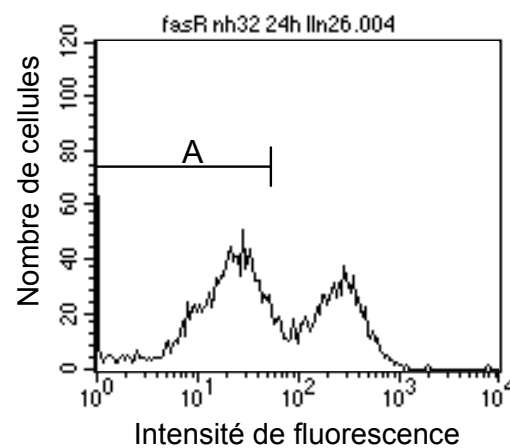


**NH32**

**0 Gy**

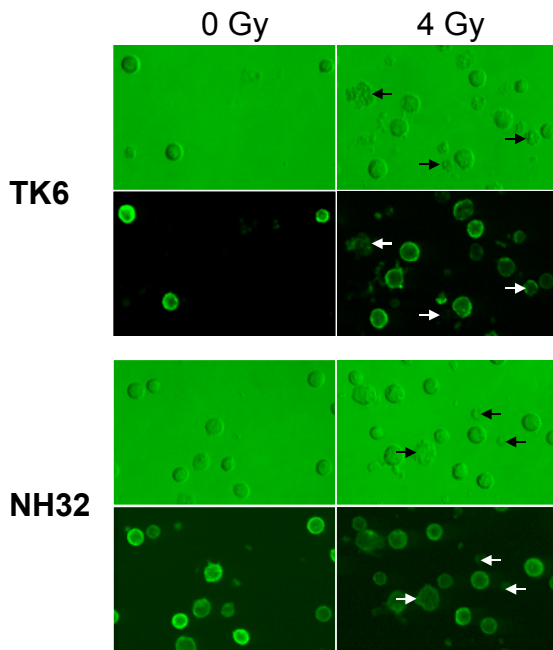


**4 Gy**





De plus, nous avons également analysé les cellules TK6 et NH32 irradiées par les neutrons rapides en immunohistochimie, après marquage par l'anticorps anti-Fas-FITC (Figure 88). Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les cellules apoptotiques à cause de la condensation de leur cytoplasme et la formation de corps apoptotiques. Ces cellules apoptotiques, indiquées par des flèches dans la Figure 88, sont aussi celles qui présentent le marquage à l'anticorps anti-Fas-FITC le plus faible, ce qui indique que la perte de l'expression de Fas n'apparaît que dans les cellules ayant déjà entrepris un processus apoptotique.



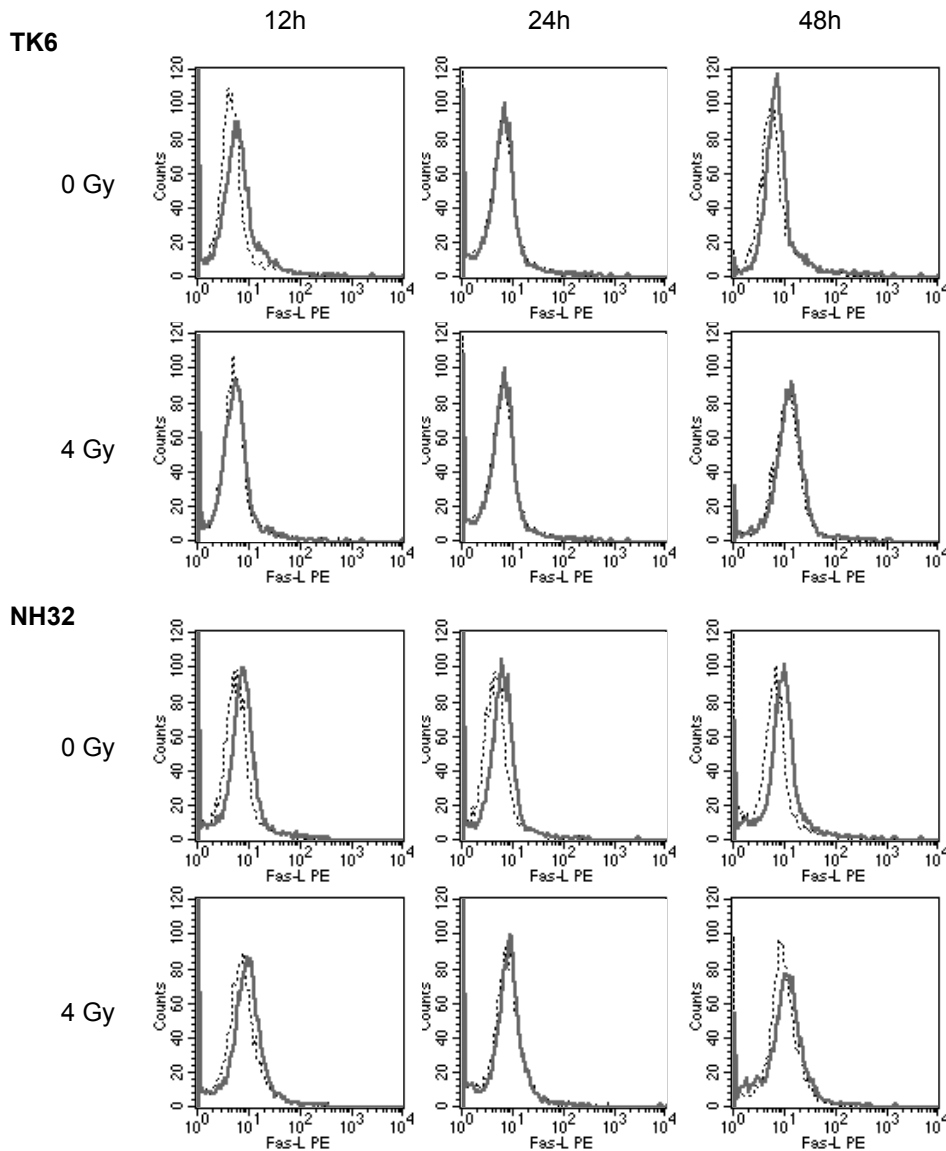
*Figure 88 : L'expression de Fas diminue dans les cellules apoptotiques. Les cellules TK6 et NH32 ont été marquées, 24 h après irradiation, par l'anticorps anti-Fas-FITC pendant 1 h à 4°C, et visualisées sous microscope optique (photos du haut) ou sous microscope à fluorescence (photos du bas). Les flèches indiquent les cellules apoptotiques. Grossissement : 40X.*

Ces résultats révèlent que l'irradiation par les neutrons rapides n'induit pas de sur-expression de Fas, quel que soit le statut p53 des cellules.

#### 2.4. Influence des neutrons rapides sur l'expression de FasL

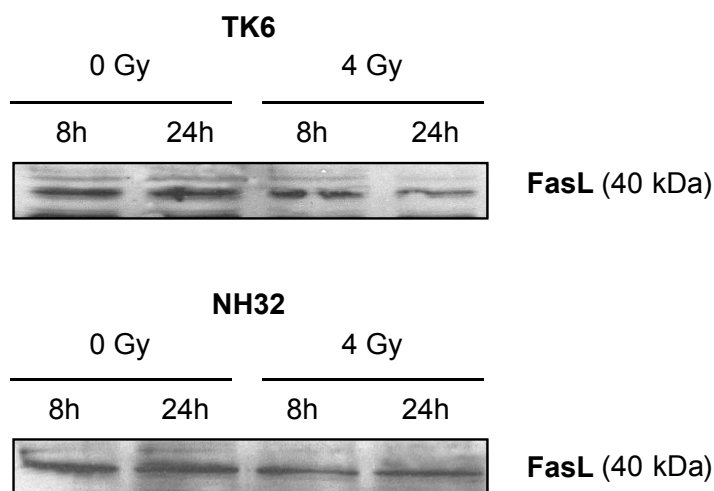
Les cellules TK6 et NH32 expriment constitutivement Fas et cette expression n'est pas augmentée après irradiation par les neutrons rapides. Néanmoins, ces récepteurs pourraient être activés par leur ligand lui-même induit par l'irradiation. Afin de déterminer si FasL est impliqué dans l'apoptose induite par les neutrons rapides,

l'expression de cette protéine a été quantifiée par cytométrie en flux, à différents temps après irradiation dans nos deux lignées cellulaires (Figure 89). Dans les cellules non irradiées, aucune expression de FasL n'a pu être mesurée. Après irradiation par les neutrons rapides, les deux pics de fluorescence correspondant à FasL avant et après irradiation sont identiques à 12 h, 24 h et 48 h. Cela signifie qu'il n'y a pas d'induction de FasL par les neutrons rapides, ni dans les cellules TK6, ni dans les cellules NH32.



**Figure 89 : Expression de FasL après irradiation par les neutrons rapides.** Les cellules TK6 et NH32 ont été irradiées à 4 Gy et l'expression de FasL a été analysée par cytométrie en flux, à différents temps après irradiation : les cellules ont été marquées à 4°C, par le contrôle isotype IgG1-PE (en pointillés) et par l'anticorps anti-FasL-PE et l'intensité de fluorescence a été mesurée. Ces données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Ces résultats concordent avec l'analyse de FasL par western blot, que nous avons effectué avec l'anticorps monoclonal FasL G247-4, qui reconnaît la forme soluble de FasL ainsi que celle associée à la membrane (Figure 90). Une bande faible de 40 kDa est observée dans les lysats des cellules TK6 et NH32 irradiées, ce qui suggère que ces deux lignées cellulaires expriment FasL mais à un niveau très faible, qui ne peut être détecté par cytométrie en flux, avec un anticorps spécifique.



**Figure 90 : Analyse par western blot de l'expression de Fas ligand après irradiation aux neutrons rapides.** Aux temps indiqués après irradiation à 4 Gy, les protéines extraites des cellules ont été séparées par électrophorèse puis transférées sur une membrane de nitrocellulose, qui a été incubée avec l'anticorps monoclonal anti-FasL G247-4. La bande de 40 kDa correspond à FasL. Ces résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes.

Par ailleurs, 8 h et 24 h après irradiation, aucune différence concernant l'expression de FasL ne peut être distinguée sur les western blot par rapport aux contrôles non irradiés. Dans leur ensemble, ces données indiquent que l'apoptose induite par les neutrons rapides ne dépend pas de l'interaction entre FasL et Fas.

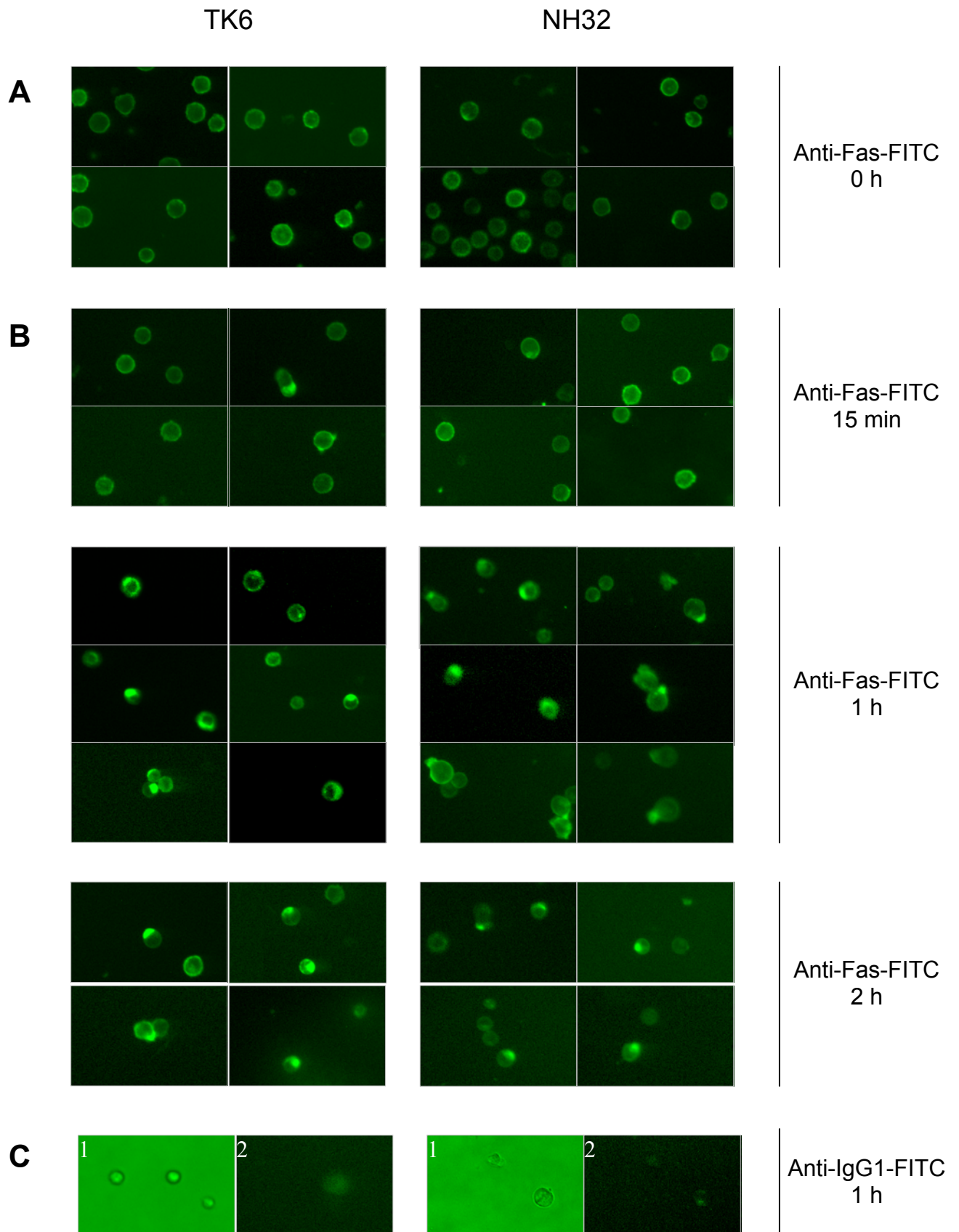
## 2.5. Les neutrons rapides n'induisent pas d'agrégation des récepteurs Fas

Des recherches précédentes ont montré que la stimulation de Fas par son ligand conduit à l'agrégation des récepteurs Fas (Grassmé *et al.* 2001, Algeciras-Schimnich *et al.* 2002). Par ailleurs, d'autres études ont rapporté que les agents génotoxiques comme le cisplatine, les rayons  $\gamma$  ou UV peuvent provoquer l'apoptose par induction directe de cette agrégation des récepteurs Fas, indépendamment de leur ligand et sans sur-expression des récepteurs (Aragane *et al.* 1998, Huang *et al.* 2003). Ainsi, pour s'assurer que la voie de signalisation de Fas n'est pas activée par agrégation directe des récepteurs dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, nous avons vérifié si l'irradiation par les neutrons rapides peut induire le regroupement de Fas dans les cellules TK6 et NH32.

Initialement, nous avons vérifié que la stimulation de Fas avec l'anticorps anti-Fas résulte bien en une agrégation de ces récepteurs dans nos deux types cellulaires. La redistribution des récepteurs Fas à la surface des cellules a été examinée après traitement des cellules avec l'anticorps anti-Fas conjugué au FITC. L'utilisation directe de l'anticorps anti-Fas-FITC permet d'éviter les réactions croisées qui peuvent avoir lieu lorsqu'un anticorps est utilisé pour stimuler le récepteur Fas et un autre pour visualiser ce même récepteur. Ici, l'anticorps anti-Fas-FITC active les récepteurs Fas et nous permet de suivre leur localisation en microscopie à fluorescence, grâce au fluorochrome FITC. L'observation des cellules sous microscope à fluorescence a été effectuée 15 min, 1 h et 2 h après traitement pour détecter la formation des agrégats de Fas (Figure 91).

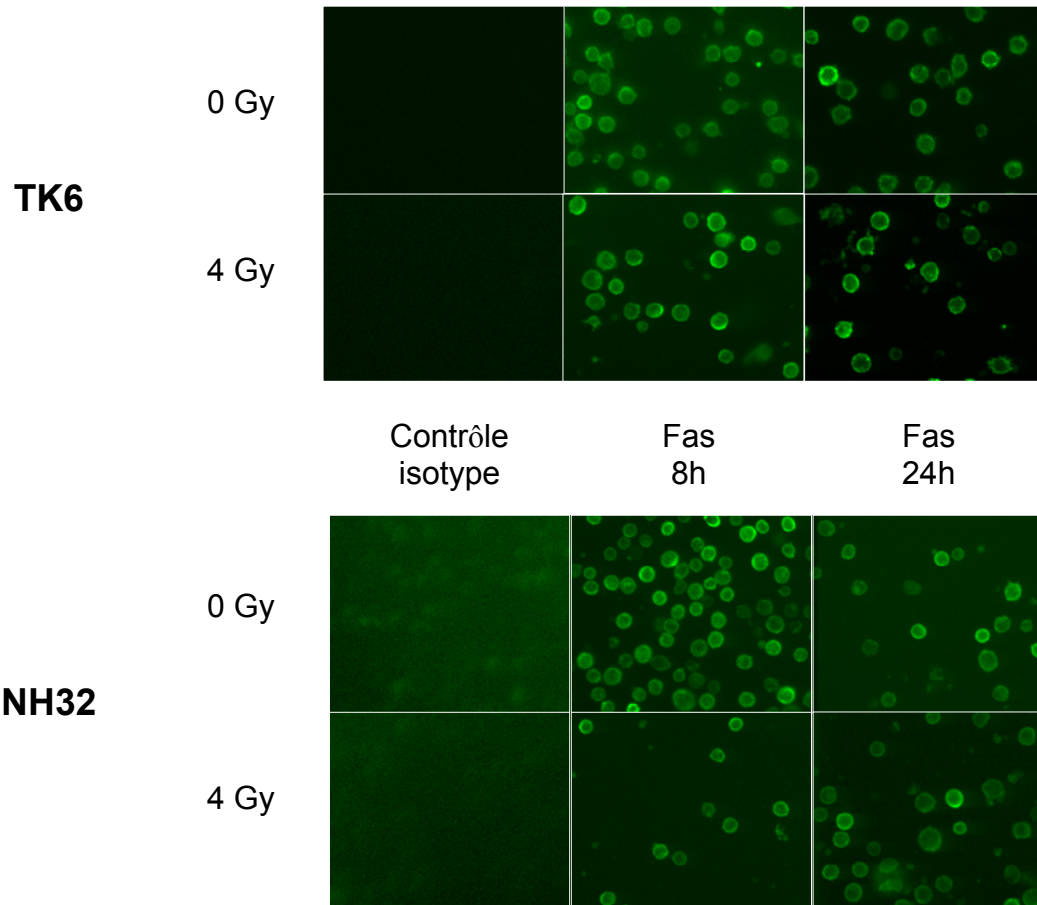
### Sur la page suivante :

**Figure 91 : Agrégation des récepteurs Fas après stimulation.** Les cellules TK6 (à gauche) et NH32 (à droite) ont été traitées par l'anticorps anti-Fas-FITC pendant 45 min dans la glace pour la fixation de l'anticorps sur les récepteurs. Puis après lavage, les cellules ont été analysées directement par microscopie à fluorescence (A, contrôle) ou 15 min, 1 h ou 2 h après incubation à 37°C (B) pour permettre la stimulation du récepteur Fas par l'anticorps anti-Fas couplé au FITC. (C) : Pour contrôler la spécificité de l'anticorps anti-Fas, les cellules ont également été traitées par le contrôle isotype anti-IgG1-FITC pendant 45 min dans la glace, lavées et incubées 1 h à 37°C. Puis les échantillons ont été observés sous microscope optique (1) ou microscope à fluorescence (2). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Grossissement : 40X.



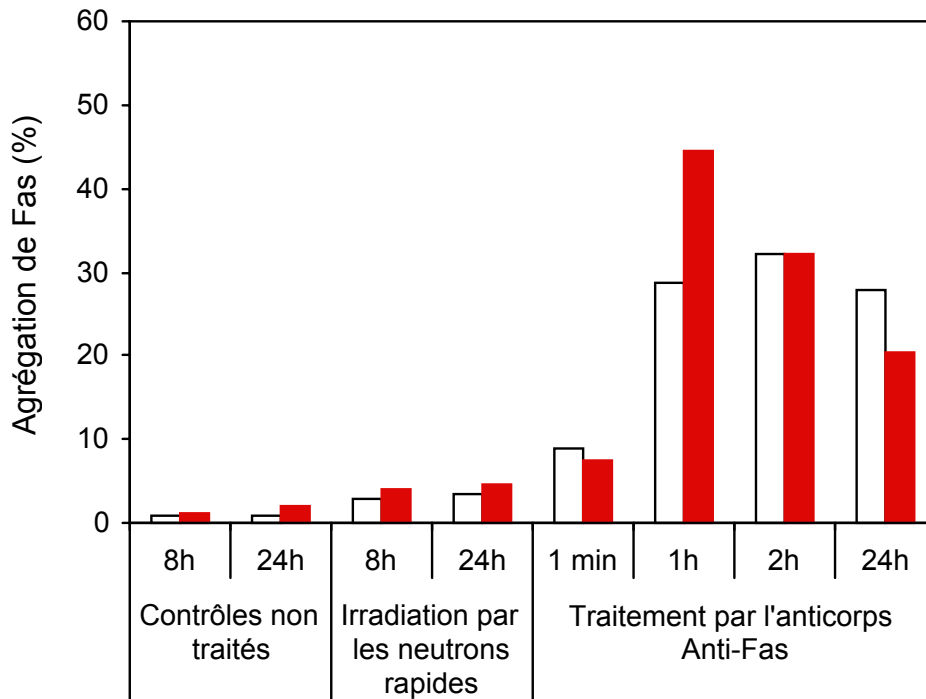
Aucune modification significative de la distribution cellulaire de Fas n'est détectable avant 1 h de stimulation. Au contraire, après 1 h et 2 h de traitement, des agrégats de récepteurs apparaissent dans les cellules TK6 et NH32 : les récepteurs Fas sont fortement polarisés (Figure 91B). Donc, la stimulation des récepteurs Fas entraîne l'agrégation de ceux-ci dans les cellules TK6 quel que soit leur statut p53.

Nous avons ensuite testé l'effet des neutrons rapides sur la distribution de Fas à la surface des cellules TK6 et NH32. Les cellules irradiées à 4 Gy ont été incubées avec l'anticorps anti-Fas-FITC et visualisées sous microscope à fluorescence. L'incubation avec l'anticorps a été réalisée à 4°C pour empêcher l'activation des récepteurs par ce dernier.



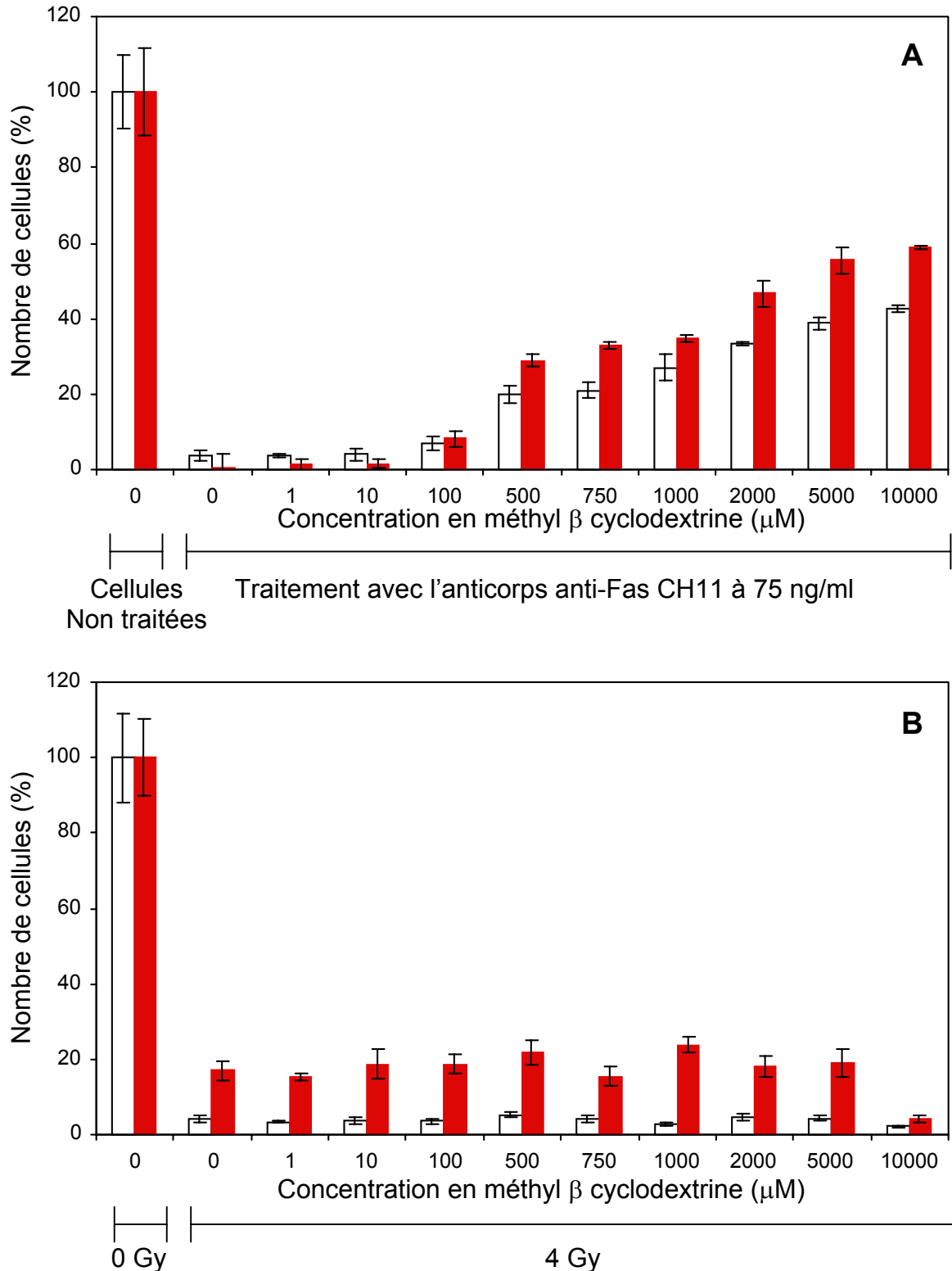
**Figure 92 :** Analyse de la distribution de Fas après irradiation par les neutrons rapides, par microscopie à fluorescence. Les cellules TK6 (en haut) et NH32 (en bas) ont été irradiées à 4 Gy par les neutrons rapides. 8 h et 24 h après irradiation, les cellules ont été marquées par l'anticorps anti-Fas-FITC pendant 45 min dans la glace et placées entre lame et lamelles pour analyse en microscopie. Les cellules irradiées ont été comparées aux contrôles non irradiés. Le marquage avec l'anti-IgG1-FITC a aussi été réalisé pour vérifier la spécificité de la fluorescence et éliminer le bruit de fond éventuel. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Grossissement : 40X.

Les résultats montrent que la distribution de Fas à la surface des cellules n'est pas modifiée dans les deux lignées cellulaires, 8 h et 24 h après irradiation (Figure 92). L'étude statistique confirme ces résultats. Seulement 3,4% et 4,6% d'agrégats de Fas sont dénombrés dans les cellules TK6 et NH32 respectivement, 24 h après irradiation, en comparaison avec 0,9% et 1,9% dans les cellules non irradiées (Figure 93). Ces valeurs sont largement inférieures à celles mesurées après stimulation des cellules avec l'anticorps anti-Fas, puisque 2 h après traitement avec l'anticorps anti-Fas-FITC, l'agrégation des récepteurs Fas a lieu dans 32,2% des cellules TK6 et 32,1% des cellules NH32. Cette agrégation de Fas est encore observée dans plus de 20% des cellules, 24 h après traitement (Figure 93).



**Figure 93 : Agrégation de Fas après traitement par l'anticorps anti-Fas ou après irradiation par les neutrons rapides.** Les cellules TK6 (□) et NH32 (■) ont été irradiées à 4 Gy ou traitées par l'anticorps anti-Fas-FITC et analysées aux temps indiqués par microscopie à fluorescence. L'agrégation de Fas est exprimée par le pourcentage de cellules présentant des agrégats de Fas. Ce pourcentage a été calculé à partir de plus de 200 cellules pour chaque échantillon.

En outre, il a été démontré que les récepteurs Fas forment leurs agrégats dans des microdomaines spécifiques de la membrane plasmique, riches en cholestérol, appelés « lipid rafts ».



**Figure 94 :** Effets de la méthyl β cyclodextrine sur la prolifération cellulaire après traitement par l'anticorps anti-Fas ou par les neutrons rapides. Les cellules TK6 (□) et NH32 (■) ont été incubées pendant 1 h, avec des concentrations croissantes de méthyl β cyclodextrine et traitées avec 75 ng/ml d'anticorps anti-Fas CH11 (A) ou avec 4 Gy de neutrons rapides (B). La prolifération cellulaire a été mesurée par le test UptiBlue après 2 jours de culture. Les données sont les moyennes ± SD des valeurs pour quatre échantillons différents.



La déplétion du cholestérol de la membrane par la méthyl  $\beta$  cyclodextrine entraîne une désorganisation de ces microdomaines, prévenant ainsi le regroupement des récepteurs Fas (Scheel-Toellner *et al.* 2002).

Pour valider les résultats obtenus ci-dessus, nous avons prétraité les cellules TK6 et NH32 avec de la méthyl  $\beta$  cyclodextrine à différentes concentrations, avant irradiation par les neutrons rapides à 4 Gy ou traitement par l'anticorps anti-Fas CH11 à 75 ng/ml, et mesuré la croissance cellulaire par le test UptiBlue (Figure 94). La méthyl  $\beta$  cyclodextrine induit une augmentation de la prolifération des cellules qui est dépendante de sa concentration, après traitement à l'anticorps anti-Fas CH11 dans les cellules TK6 et NH32 (Figure 94A). La désorganisation des microdomaines riches en cholestérol de la membrane réduit donc significativement la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par Fas. A l'opposé, aucune élévation de la prolifération cellulaire n'a pu être observée pour les cellules prétraitées à la méthyl  $\beta$  cyclodextrine et irradiées par les neutrons rapides, quel que soit le type cellulaire (Figure 94B). Ainsi, l'inhibition de la formation des agrégats de Fas n'a pas d'effet sur la mort cellulaire provoquée par l'irradiation. En conclusion, ces résultats montrent que la voie de Fas n'est pas activée par les neutrons rapides, via une agrégation directe de Fas.

### 3. DISCUSSION

Les mécanismes à l'origine de l'activation de la caspase-8 dans les deux voies apoptotiques induite par les neutrons rapides en fonction de p53 dans notre modèle cellulaire n'ont pas encore été définis. Certains auteurs ont identifié Fas comme initiateur de la cascade apoptotique induite par des drogues chimiothérapeutiques ou les radiations ionisantes (Friesen *et al.* 1996, Fulda *et al.* 1998, Belka *et al.* 2000, Abdulkarim *et al.* 2000, Ciccolini *et al.* 2002), alors que d'autres n'ont pas réussi à détecter l'implication de ce récepteur de mort dans les effets cytotoxiques de ces traitements (Gamen *et al.* 1997, You *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001). Par conséquent, dans cette étude, nous avons essayé de déterminer le rôle potentiel de Fas et FasL dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, en fonction de p53.

Tout d'abord, après confirmation de l'activation de la caspase-8 par les neutrons rapides, nous avons montré que les cellules TK6 et NH32 expriment constitutivement le récepteur Fas et que ce récepteur est capable de transmettre un signal de mort après stimulation. Ces données sont en contradiction avec d'autres travaux, qui montrent la perte de l'expression de Fas ou de sa fonction dans de nombreuses tumeurs, ce qui constitue un moyen de résistance aux traitements pour ces cellules cancéreuses (Viard-Leveugle *et al.* 2003). De même, certaines cellules tumorales sont protégées de l'apoptose induite par Fas par augmentation de l'expression de protéines telles que cFLIP, qui inhibe ce récepteur (Tschopp *et al.* 1998). Les cellules TK6 et NH32 ne semblent pas avoir développé de telles résistances, puisque l'activation de Fas avec un anticorps « agoniste » ou le ligand FasL conduit à l'induction d'apoptose et à une diminution importante de la croissance dans ces cellules. De plus, il n'y a pas de différence entre les cellules TK6 et NH32 concernant l'expression basale de Fas, par opposition à une étude réalisée par Sheard *et al.* dans laquelle les cellules déficientes en p53 sont caractérisées par un niveau d'expression constitutive de Fas plus faible que les cellules avec une protéine p53 sauvage (Sheard *et al.* 2003). Dans notre modèle cellulaire, p53 ne semble pas jouer de rôle particulier dans la régulation de l'expression basale du récepteur Fas. Par contre, il pourrait

intervenir dans la réponse des cellules à l'activation de Fas par l'anticorps anti-Fas, étant donné la diminution plus importante de la prolifération cellulaire dans les cellules TK6 par rapport aux cellules NH32.

L'étude de Fas après irradiation par les neutrons rapides indique que l'expression de ce récepteur n'est pas modifiée 12 h après irradiation dans les deux types cellulaires et qu'une diminution de l'expression de celui-ci se produit 24 h et 48 h après irradiation. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés par d'autres équipes, qui démontrent une sur-expression de Fas après exposition à une irradiation  $\gamma$  ou à des drogues cytotoxiques (Fulda *et al.* 1998, Müller *et al.* 1998, Backus *et al.* 2001, Ciccolini *et al.* 2002). D'autres études ont également indiqué que cette sur-expression de Fas après traitement était induite par p53. En effet, p53 peut activer transcriptionnellement le gène de Fas (Owen-Schaub *et al.* 1995). Il a été rapporté que l'irradiation par des rayons X ou  $\gamma$  entraîne un accroissement de Fas uniquement dans les cellules exprimant une protéine p53 sauvage et ceci dans de nombreux types cellulaires : des cellules tumorales de cerveau (Fulda *et al.* 1998), des cellules de carcinome colorectal, des cellules cancéreuses du sein (Sheard *et al.* 2003), et des cellules germinales (Embree-Ku *et al.* 2002). Par ailleurs, un agent toxique, la MNNG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), qui induit une oxydation de la méthylguanine de l'ADN résultant en des cassures double brin suite aux mécanismes de réparation, provoque une sur-expression de Fas, contrôlée par p53 dans les cellules TK6 (Dunkern *et al.* 2003). Ce n'est pas le cas dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, puisqu'aucune sur-expression de Fas n'est détectée dans les cellules TK6 irradiées, alors que p53 est activé après irradiation (chapitre 1). Des résultats similaires ont été obtenus par Streffer *et al.* dans plusieurs lignées cellulaires de gliome où quel que soit le statut p53 des cellules, l'irradiation par des photons ne modifie pas l'expression de Fas (Streffer *et al.* 1999).

La raison de la diminution de l'expression de Fas induite par les neutrons rapides dans nos cellules reste à définir. Une explication possible serait l'internalisation des récepteurs Fas après leur activation, ce qui a déjà été décrit pour d'autres cellules lymphoblastoïdes (Algeciras-Schimmich *et al.* 2002). Cependant l'internalisation de Fas à l'intérieur de la cellule semble être une caractéristique propre des cellules de

type I (Algeciras-Schimnich *et al.* 2003, Barnhart 2003), et comme la mitochondrie est impliquée dans l'apoptose des cellules TK6 (chapitre 2), nos cellules sont plutôt de type II. En outre, si les récepteurs Fas étaient internalisés, nous aurions tout de même dû trouver ces récepteurs dans les lysats totaux des cellules et aucune différence n'aurait été observée sur les western blot. Or, nos analyses en western blot montrent également la perte de l'expression de Fas dans les deux lignées cellulaires après irradiation, ce qui suggère que la diminution de Fas n'est pas causée par son internalisation. D'autre part, certains auteurs ont révélé que le traitement de cellules d'hépatome à l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque une diminution de l'expression de la protéine Fas et en ont conclu que Fas est impliqué dans l'apoptose induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, probablement à cause d'une oxydation de ces récepteurs (Huang *et al.* 2000). Cependant, nous ne pouvons conclure en une intervention de Fas, en se basant uniquement sur la baisse d'expression de ces récepteurs, car ces protéines peuvent être dégradées et ne plus exercer leur fonction. Nous avons aussi mis en évidence que la diminution de l'expression de Fas après irradiation est dépendante de la caspase-8 et apparaît seulement dans les cellules, qui sont déjà en apoptose. Ainsi la diminution de Fas résulterait de la dégradation de ces récepteurs induite par la machinerie apoptotique. Cette baisse peut aussi être expliquée par le fait que les corps apoptotiques formés sont plus petits que les cellules normales et présentent alors une surface membranaire moins importante contenant une quantité plus faible de protéines Fas. Une autre explication possible serait la perturbation du transport de la protéine Fas à travers l'appareil de Golgi, due à l'apoptose. En effet, il a été démontré que l'expression de Fas est régulée par séquestration de ce récepteur dans l'appareil de Golgi dans les cellules de lymphome B (Haynes *et al.* 2002). Ainsi, pour conclure, le récepteur Fas n'est ni sur-exprimé, ni internalisé suite à l'exposition aux neutrons rapides de nos lignées cellulaires.

Des expériences précédentes ont décrit une induction de FasL par les radiations ionisantes dans des cellules de carcinome nasopharyngé, alors que l'expression des récepteurs Fas n'est pas affectée par l'irradiation dans ces cellules (Abdulkarim *et al.* 2000). Par contre, dans les cellules TK6 et NH32, nous avons montré que les neutrons rapides sont incapables d'augmenter l'expression de FasL, 8 h et 24 h après

irradiation. Une induction de FasL plus précoce, avant 8 h, ne semble pas concevable, puisqu'il a été rapporté que la sur-expression de FasL par les radiations est un processus persistant dans le temps, qui atteint son maximum 24 h après irradiation (Abdulkarim *et al.* 2000, Belka *et al.* 1998). Donc, nous avons démontré que l'irradiation par les neutrons rapides n'induit la sur-expression ni de Fas ni de son ligand FasL dans les cellules positives pour p53 et dans les cellules déficientes en p53. Ces résultats ont été confirmés par des tests d'expression d'ADNc, réalisés sur les cellules irradiées avec des neutrons rapides et indiquant que les ARNm de Fas et FasL ne sont pas augmentés après irradiation (voir chapitre 4). Ces données s'accordent également avec une autre étude, où une activation de la caspase-8, indépendante de Fas a été mise en évidence après irradiation par les rayons  $\gamma$ , dans des cellules de leucémie lymphocytaire chronique B (Jones *et al.* 2001). Ainsi, l'interaction Fas/FasL n'est pas à l'origine de l'activation de la caspase-8 après exposition aux neutrons rapides, quel que soit le statut p53 des cellules.

Cependant, malgré l'absence de sur-expression de Fas ou FasL, nous ne pouvons conclure que Fas n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par les neutrons rapides. En effet, la voie de signalisation de Fas peut être activée directement de façon indépendante du ligand FasL, par les rayons UV dans des kératinocytes, par induction de l'agrégation des récepteurs Fas (Aragane *et al.* 1998, Takahashi *et al.* 2001). De plus, Huang *et al.* ont suggéré que, comme l'irradiation  $\gamma$  induit elle-aussi le regroupement des récepteurs Fas, l'agrégation de Fas pourrait être un mécanisme commun reliant les dommages génotoxiques à la voie des récepteurs de mort (Huang *et al.* 2003). Cette agrégation de Fas est nécessaire pour la transmission efficace du signal de mort induit par ces récepteurs, même après stimulation par FasL ou par un anticorps anti-Fas (Grassme *et al.* 2001, Scheel-Toellner *et al.* 2002, Algeciras-Schimmich *et al.* 2002). Nous avons confirmé que la stimulation de Fas avec l'anticorps anti-Fas résulte en un regroupement des récepteurs à partir d'1 h de traitement. Les cellules présentant ces agrégats de Fas sont encore observées à 24 h, mais leur nombre est légèrement plus faible, probablement à cause de changements morphologiques des membranes cellulaires induits par l'apoptose. Après irradiation par les neutrons rapides, nous n'avons pas détecté de regroupement des récepteurs

Fas, même 24 h après irradiation. Ces résultats révèlent que les neutrons n'induisent pas d'agrégation des récepteurs Fas dans les cellules TK6 et NH32. Par ailleurs, les microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol, les « lipid rafts » sont requis pour la propagation du signal apoptotique par Fas (Scheel-Toellner *et al.* 2002, Muppidi *et al.* 2004). En effet, les récepteurs Fas s'agrègent au niveau de ces microdomaines. La méthyl  $\beta$  cyclodextrine provoque l'efflux du cholestérol de la membrane plasmique et par conséquent déstabilise les « lipid rafts » (Brown et London 2000). La désorganisation de ces microdomaines par cette molécule empêche l'agrégation de Fas et prévient l'apoptose induite par ce récepteur (Garofalo *et al.* 2003, Scheel-Toellner *et al.* 2002, Grassmé *et al.* 2001). Des résultats identiques ont été obtenus dans nos lignées cellulaires traitées par l'anticorps anti-Fas. Nous avons montré que la méthyl  $\beta$  cyclodextrine réduit l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas dans les cellules TK6 et NH32. Par contre, ce composé est incapable d'inhiber l'apoptose provoquée par les neutrons rapides dans les deux types cellulaires. Ces données confirment que l'activation directe de Fas par induction de son agrégation ne contribue pas à l'apoptose induite par les neutrons rapides.

En conclusion, nos résultats apportent la preuve que les neutrons rapides induisent l'apoptose par un mécanisme indépendant de Fas, dans des cellules lymphoblastoïdes différant par leur statut p53. Nous pouvons exclure une interaction FasL/Fas dans l'apoptose provoquée par les neutrons. De même, une induction directe de l'agrégation de Fas à la surface des cellules est également à écarter. Ces données sont similaires aux résultats obtenus par d'autres équipes, qui montrent que les radiations ionisantes ainsi que certaines drogues peuvent induire l'apoptose dans des souris ou cellules déficientes en récepteur Fas (Newton et Strasser 2000, You *et al.* 2001). You *et al.* mettent d'ailleurs en évidence une activation de la caspase-8 indépendante de Fas, qui est responsable de l'initiation du processus apoptotique induit par un agent chimique. Bien que notre étude rejette clairement l'implication de la voie Fas dans l'activation de la caspase-8, nous ne pouvons exclure un rôle possible d'autres récepteurs de mort comme les récepteurs du TNF ou de TRAIL dans le déclenchement de l'apoptose induite par les neutrons rapides. En effet, ces

récepteurs peuvent intervenir dans la réponse cellulaire après irradiation par les photons (Inagaki-Ohara *et al.* 2001, Gong et Almasan 2000) et induire l'activation de la caspase-8 (Sawada *et al.* 2004). De plus, les récepteurs de TRAIL sont aussi régulés transcriptionnellement par p53 (Takimoto et El-Deiry 2000, Guan *et al.* 2001).

D'autres hypothèses restent à examiner concernant l'activation de la caspase-8. Il a notamment été suggéré qu'une tyrosine kinase lck pourrait être à l'origine de l'activation de la caspase-8, indépendante de Fas (Belka *et al.* 1999). Il serait également intéressant d'étudier l'importance du stress oxydatif radio-induit dans l'activation de la caspase-8 de même que la voie des céramides, les céramides pouvant activer la caspase-8 (Darios *et al.* 2003, Wang *et al.* 2000). Par ailleurs, certains articles ont révélé une activation de la caspase-8 et de la caspase-2 dans l'apoptose induite par la sur-expression de facteurs de transcription (Chen *et al.* 2004) ou par des drogues telles que le paclitaxel et l'étoposide (Wang *et al.* 2003), avec même dans certains cas, une activation séquentielle de la caspase-2 puis de la caspase-8 (Lin *et al.* 2004). La caspase-2 pourrait intervenir dans notre modèle en amont de la caspase-8. En outre, pour mettre en évidence les mécanismes responsables du clivage de la caspase-8, une autre approche consisterait à identifier les gènes induits par l'irradiation et différentiellement exprimés selon le statut p53.

Chapitre 4

**IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS L' APOPTOSE  
INDUITE PAR DES NEUTRONS RAPIDES DANS DES LIGNEES  
LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES**

*RESUME*

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes conduisant au déclenchement des deux voies apoptotiques suite à l'exposition aux neutrons rapides, nous avons ensuite étudié l'expression des gènes après irradiation, afin d'identifier les gènes qui seraient impliqués dans la réponse des cellules TK6 et NH32 à ces rayonnements. Nous avons utilisé la technique de « cDNA expression arrays » qui consiste à hybrider sur une membrane de nylon où sont fixés des cDNA de gènes connus ayant un rôle dans l'apoptose, les cDNA synthétisés à partir de l'ARN extrait de nos cellules. L'analyse des signaux d'hybridation permet de comparer l'expression des gènes des cellules non irradiées avec celle des cellules irradiées et d'identifier les gènes sous- ou sur-exprimés après irradiation. Les résultats obtenus montrent que 6 gènes pour les cellules TK6 et 12 gènes pour les cellules NH32 présentent une expression différentielle après irradiation par les neutrons rapides. Parmi ces gènes, *CRAF1* et *DAP kinase 1* sont sur-exprimés dans les deux lignées cellulaires, ils sont donc indépendants du statut p53. Ces résultats nous apportent des données préliminaires sur les mécanismes apoptotiques mis en jeu après irradiation par les neutrons rapides et permettent d'orienter nos futures investigations vers la voie des récepteurs TNF, celle des MAPKinases ou encore celle des céramides.



## 1. INTRODUCTION

Nous avons montré précédemment que l'irradiation par les neutrons rapides induit l'apoptose des cellules TK6 par deux voies distinctes en fonction de p53. Les intervenants dans ces différentes voies de signalisation de l'apoptose ont été en partie identifiés. En effet, la voie apoptotique dépendante de p53 fait intervenir la caspase-8 qui clive la protéine pro-apoptotique BID. BID activé interagit avec la mitochondrie provoquant ainsi la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la libération dans le cytoplasme du cytochrome c qui conduit à l'activation de la caspase-9. Cette dernière active à son tour les caspases-3 et -7. La deuxième voie d'apoptose, indépendante de p53 est plus lente et caractérisée par l'activation de la caspase-8 et de la caspase-7 uniquement (chapitre 2). Nous avons également démontré que le récepteur de mort Fas n'est impliqué dans aucune de ces deux voies (chapitre 3). Cependant, ce premier modèle de signalisation de l'apoptose induit par les neutrons rapides est incomplet. Certains mécanismes restent inexplicables, en particulier l'activation de la caspase-7 dans l'apoptose p53-indépendante, ainsi que celle de la caspase-8, qui est responsable de l'initiation de la cascade apoptotique dans les deux voies induites par les neutrons. Dans le but de définir ces mécanismes, nous avons entrepris d'analyser l'expression de gènes après irradiation. En effet, les gènes dont la transcription est activée ou réprimée suite à l'irradiation déterminent en général la réponse des cellules aux radiations ionisantes. Ainsi, la mise en évidence de ces gènes après irradiation par les neutrons rapides nous apportera des données complémentaires sur les mécanismes conduisant au déclenchement du processus apoptotique. Par ailleurs, la comparaison des gènes en relation avec l'induction d'apoptose par les neutrons rapides, entre les cellules TK6 et les cellules NH32 nous permettra de préciser les différences existant entre les deux voies de signalisation apoptotiques déjà définies en fonction de p53.

Afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée après l'irradiation par les neutrons rapides dans les cellules TK6 et les cellules NH32, nous avons choisi d'employer une technique d'hybridation appelée « cDNA expression arrays ». Cette

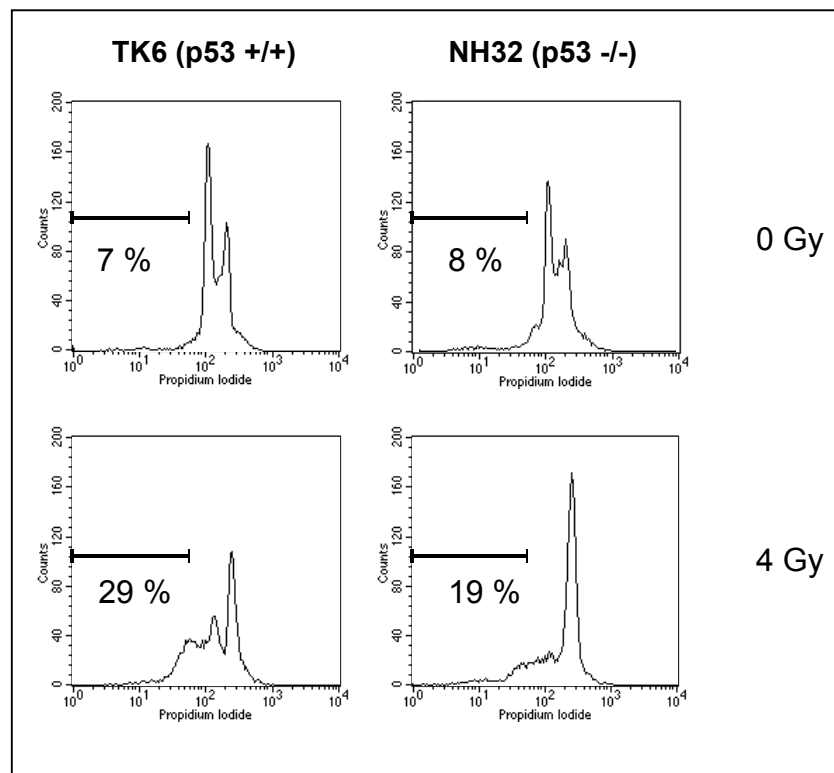
méthode est basée sur l'hybridation d'ADN complémentaires (ADNc) marqués radioactivement, synthétisés à partir des ARN extraits de nos cellules, sur des membranes de nylon où sont préalablement fixés des spots d'ADNc simple brin représentatifs de gènes connus ayant un rôle dans une fonction cellulaire donnée (Duggan *et al.* 1999). Pour ces expériences, nous avons choisi une membrane contenant les ADNc de 205 gènes jouant un rôle dans l'apoptose : « BD Atlas Human Apoptosis cDNA expression array » (Clontech Becton Dickinson).

Jusqu'à récemment, les études d'expression de gènes étaient limitées à l'analyse de l'expression de quelques gènes seulement. Par contre, le développement de techniques telles que les « cDNA expression array » offre la possibilité d'évaluer simultanément l'expression de nombreux gènes et de déterminer parmi ceux-ci lesquels sont exprimés différemment avant et après irradiation (Marshall et Hodgson 1998, Cheung *et al.* 1999). Ces tests d'hybridation d'ADNc ont plusieurs applications et sont utilisés dans de nombreuses études, notamment pour identifier les gènes exprimés différemment dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales (DeRisi *et al.* 1996, Zhang *et al.* 1997), pour déterminer les gènes responsables de la transformation tumorale (Chang *et al.* 1998, Welford *et al.* 1998) ainsi que pour définir les gènes activés par différents stress (Heinloth *et al.* 2003) ou encore les gènes impliqués dans certaines maladies (Muller *et al.* 2002, Magee *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2004). De même, certains travaux ont grâce à cette technique, mis en évidence des gènes spécifiques de réponse aux radiations ionisantes dans plusieurs types cellulaires (Amundson *et al.* 2000, Hanna *et al.* 2001, Kitahara *et al.* 2002) et même dans des lignées lymphoblastoïdes (Ford *et al.* 2001). La plupart de ces études portent sur les gènes régulés par les rayons X ou  $\gamma$ , et peu d'entre eux concernent les gènes activés par les radiations à TEL élevé. Ainsi l'application des « cDNA expression arrays » à l'étude de l'apoptose induite par les neutrons rapides pourra fournir des informations nouvelles sur les mécanismes induits par ces rayonnements à TEL élevé.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Mesure de l'apoptose

Comme nous étudions les gènes impliqués dans l'apoptose induite par les neutrons rapides, nous avons vérifié l'induction de ce type de mort cellulaire dans nos échantillons cellulaires suite à l'exposition à ces rayonnements. Après irradiation à 4 Gy des cellules TK6 et NH32, nous avons prélevé la quantité de cellules nécessaires pour les expériences de « cDNA expression arrays » et placé les cellules restantes en culture. L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux dans ces cellules par la formation des particules hypodiploïdes, 24 h après irradiation (Figure 95). Les résultats montrent que les neutrons induisent l'apoptose dans les deux lignées mais de façon plus importante dans les cellules TK6 que dans les cellules NH32, ce qui confirme les résultats précédents (chapitre 1).



**Figure 95 : Induction d'apoptose par les neutrons rapides dans les cellules TK6 et NH32.** Les cellules ont été perméabilisées 24 h après irradiation à 4 Gy, marquées par l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux. Les cellules contenant de l'ADN SubG0G1 c'est-à-dire une quantité d'ADN inférieure à 2n sont définies comme apoptotiques et le pourcentage indique leur nombre.

## 2.2. Rappel de la technique de « cDNA expression arrays »

La technique de « cDNA expression arrays » nécessite tout d'abord l'extraction des ARN des cellules irradiées et des contrôles non irradiés. Ces ARN sont convertis en ADNc par rétrotranscription, en utilisant des amorces spécifiques de gènes impliqués dans l'apoptose. Ces ADNc sont marqués radioactivement grâce à l'utilisation pour la transcription inverse de dATP contenant un  $^{32}\text{P}$ . Après purification, ces sondes d'ADNc sont hybridées sur la membrane contenant les spots de cDNA déposés en doublet et représentatifs de 205 gènes connus, jouant un rôle dans l'apoptose. Après lavage des membranes, les signaux émis par les ADNc radioactifs hybridés sont lus à l'aide d'un phosphorimager. Une image des signaux émis pour chaque spot est alors obtenue. L'analyse de ces signaux d'hybridation et leur quantification sont réalisées grâce au logiciel AtlasImage 1.01. Ce logiciel compare les résultats obtenus à partir de deux échantillons différents hybridés sur deux membranes différentes et donne la liste des gènes dont l'expression est modifiée de manière significative entre ces deux échantillons. Dans notre cas, ces expériences ont été réalisées pour les cellules TK6 et pour les cellules NH32. Les ARN totaux ont été extraits des cellules, 2 h après irradiation par les neutrons rapides à 4 Gy. Les résultats de l'hybridation des ADNc provenant des cellules irradiées ont été comparés à ceux de l'hybridation des ADNc des cellules non irradiées. La Figure 96 récapitule toute la manipulation.

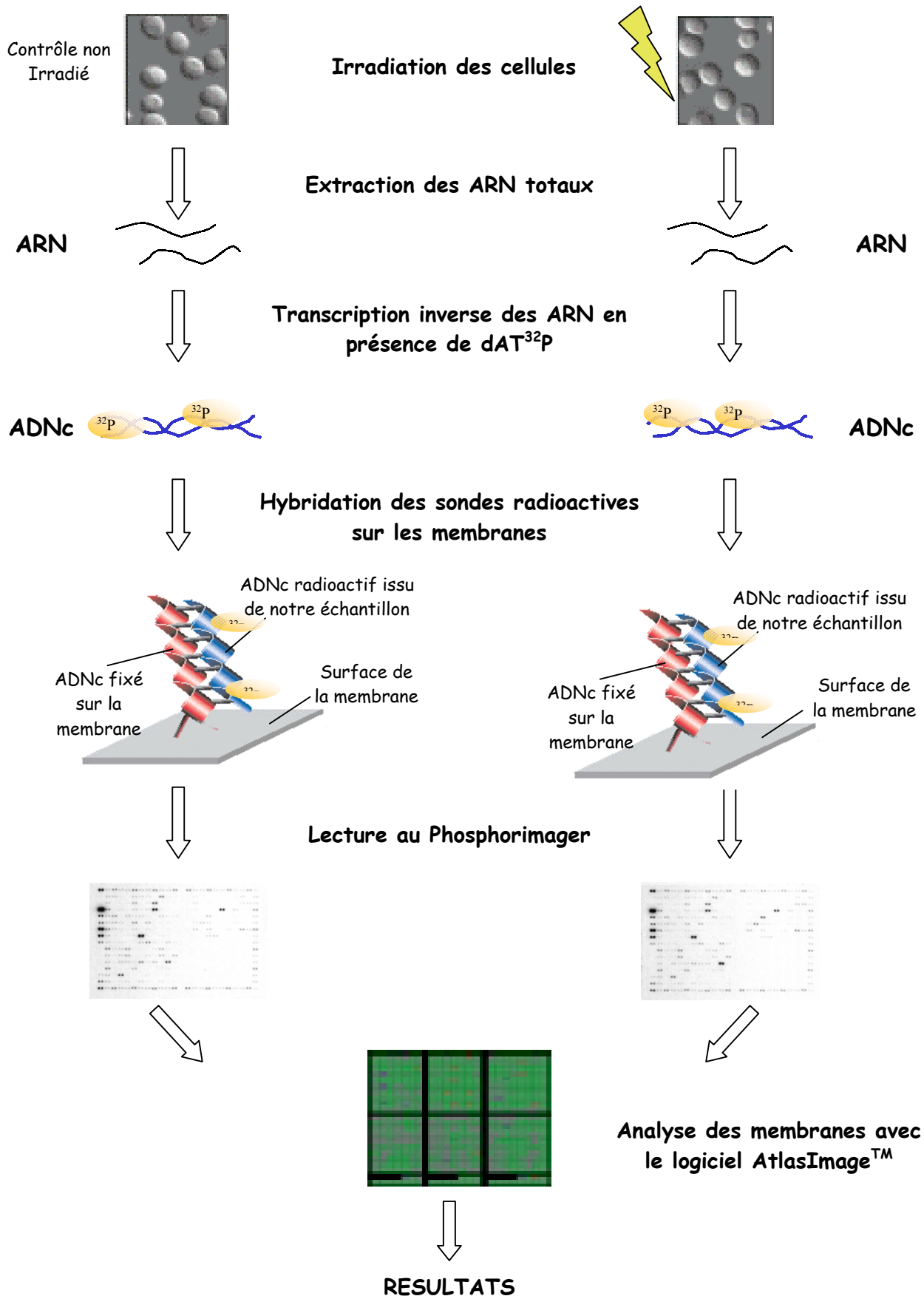
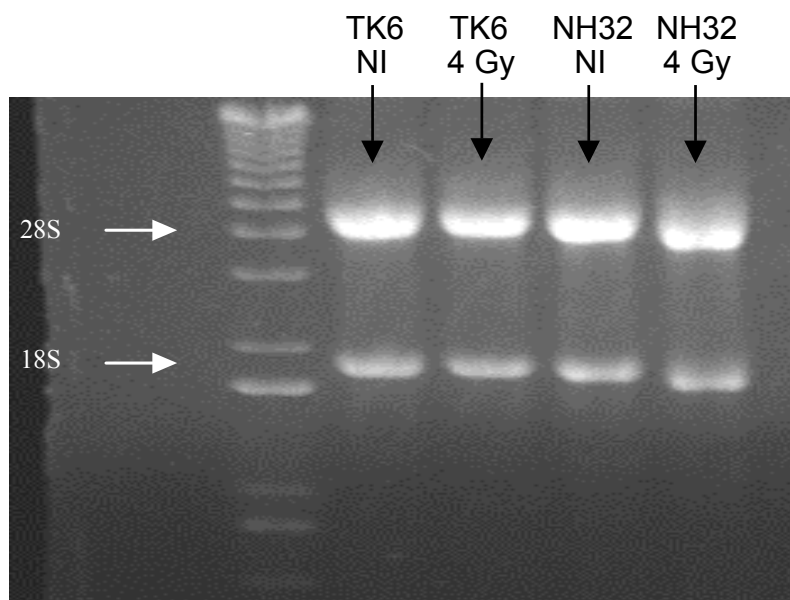


Figure 96 : Schéma récapitulatif de l'expérience de « cDNA expression array ».

### 2.3. Vérification de la qualité des ARN extraits des cellules

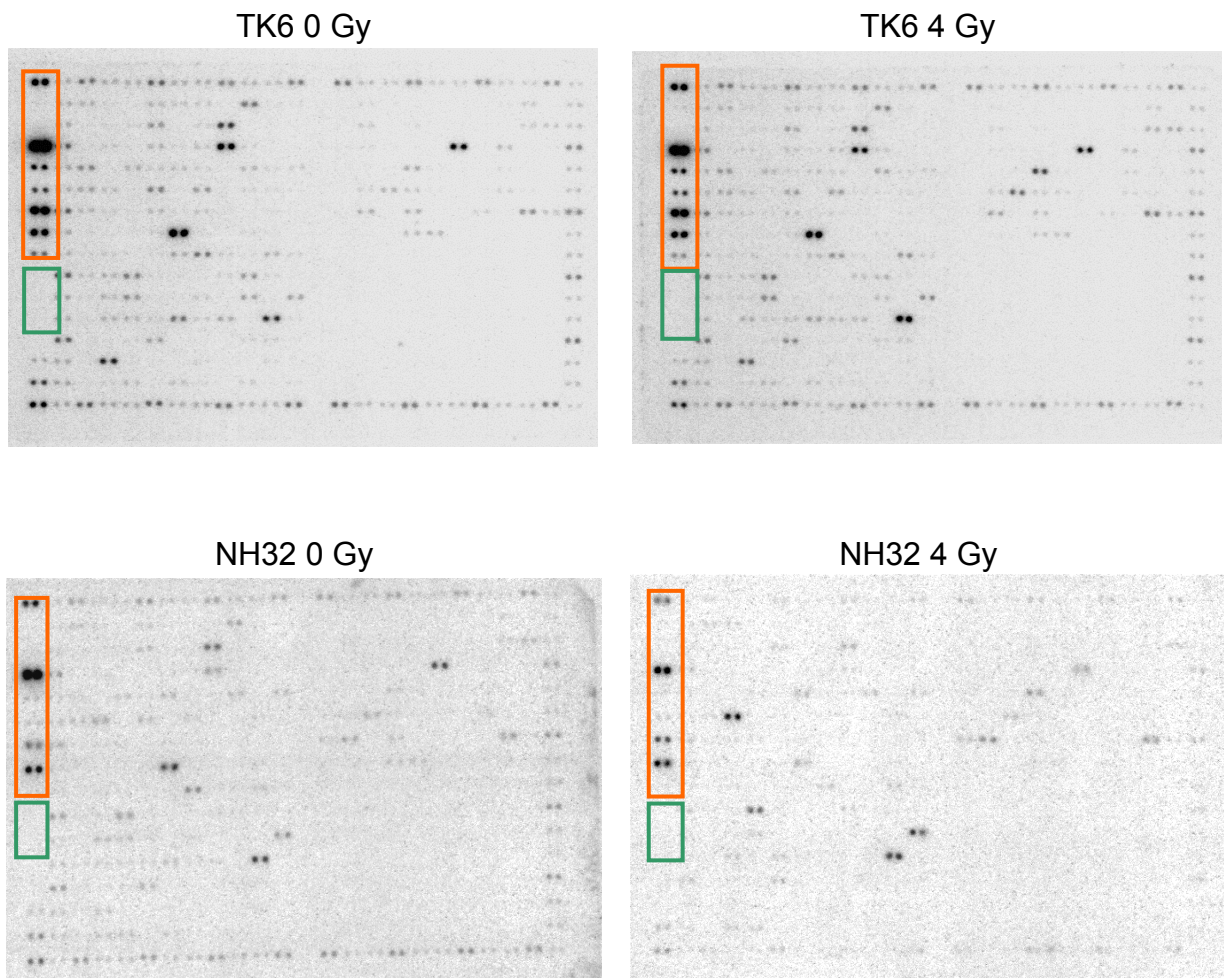
Après irradiation par les neutrons rapides, la première étape de la technique de « cDNA expression array » consiste à extraire les ARN des cellules. Pour cela, nous avons utilisé le kit Rneasy. Ces ARN ont ensuite été déposés sur un gel dénaturant de formaldéhyde et d'agarose et séparés par électrophorèse, afin de vérifier la qualité de ces derniers. En effet, des ARN dégradés conduisent à un bruit de fond important lors de l'analyse des membranes après hybridation. L'ARN est intact si les bandes des ARN ribosomiques 28S et 18S sont bien définies sur le gel d'agarose et si la bande de l'ARNr 28S a une intensité deux fois supérieure à la bande de l'ARNr 18S. La Figure 97 montre le profil de migration des ARN des cellules TK6 et NH32 avant et après irradiation. Pour chaque échantillon, nous observons deux bandes d'ARN d'intensité relativement élevée qui correspondent aux ARN ribosomiques 28S et 18S. L'intensité de la bande de l'ARNr 28S est le double de celle de la bande de l'ARNr 18S, ce qui nous permet de conclure que les ARN extraits de nos cellules sont de bonne qualité. Nous avons donc réalisé l'expérience de « cDNA expression arrays » avec ces ARN.



**Figure 97 : Profil de migration des ARN extraits des cellules TK6 et NH32 avant et après l'irradiation par les neutrons rapides.** 2 µg de chaque ARN extrait ont été déposés sur gel dénaturant de formaldéhyde/agarose 1%. Après électrophorèse, les bandes ont été révélées par exposition aux UV. Le premier puits correspond aux marqueurs de poids moléculaires. (NI : non irradié)

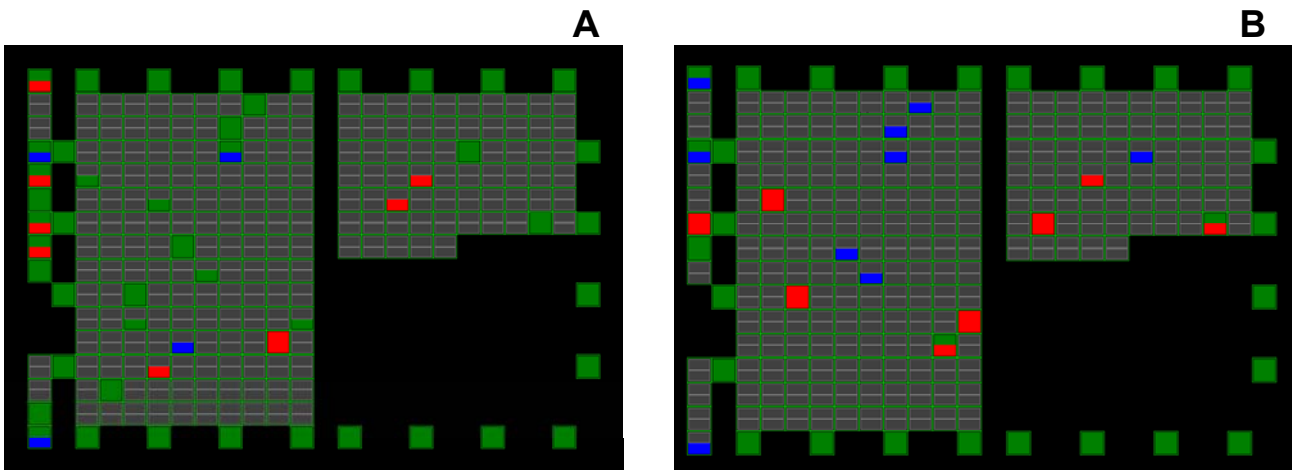
## 2.4. Analyse de l'expression des gènes après irradiation par les neutrons rapides

Les résultats des « cDNA expression arrays » obtenus avec les cellules TK6 et NH32 irradiées par les neutrons rapides sont présentés dans la Figure 98. Sur les membranes sont déposés en doublets les ADNc correspondants à 205 gènes ayant un rôle connu dans le processus d'apoptose. De plus, les membranes contiennent également des cDNA de 9 gènes domestiques, qui interviennent dans le métabolisme basal de la cellule et qui servent de contrôles positifs et 3 cDNA de plasmide ou de bactériophage qui sont des contrôles négatifs pour vérifier la spécificité de l'hybridation.



*Figure 98 : Expression de gènes d'apoptose avant et après irradiation par les neutrons rapides dans les cellules TK6 et NH32. Les images présentées sont celles obtenues après lecture des signaux des membranes au phosphorimager. Chaque doublet de points représente un gène exprimé. Les signaux correspondant aux neuf gènes domestiques sont encadrés en rouge, ceux correspondant aux contrôles négatifs sont notés en vert.*

Sur chacune de nos membranes, les contrôles négatifs n'émettent aucun signal. L'hybridation est donc spécifique et il n'y a pas de contamination de nos échantillons. Nous pouvons également observer que certains gènes domestiques sont exprimés dans les cellules TK6 et NH32 mais leur expression varie après irradiation. Ces images ont ensuite été traitées par ordinateur avec le logiciel AtlasImage. Grâce à ce logiciel, nous avons comparé l'expression des gènes avant et après irradiation dans les deux types cellulaires. Pour cette analyse, il faut normaliser les signaux obtenus, afin de compenser une hybridation globalement plus forte sur une des deux membranes. Etant donné que les gènes domestiques varient après irradiation, nous ne pouvons les utiliser pour cette normalisation. Donc, nous avons effectué une normalisation globale des signaux en comparant la somme des signaux détectés sur une membrane par rapport à l'autre. Le logiciel nous fournit ainsi la liste des 205 gènes avec leurs intensités sur les deux membranes comparées. Il signale également les gènes dont l'expression est significativement modifiée entre les membranes et dans notre cas, les gènes modulés par l'irradiation dans les cellules TK6 et dans les cellules NH32 (Figure 99). Pour que les résultats soient significatifs, nous n'avons choisi de retenir que les gènes dont l'expression est doublée ou diminuée de moitié après irradiation.



**Figure 99:** Schémas des membranes représentant les gènes dont l'expression est modifiée après irradiation par les neutrons rapides. (A) Comparaison de la membrane correspondant aux cellules TK6 irradiées à 4 Gy avec celle des cellules TK6 non irradiées. (B) Comparaison de la membrane correspondant aux cellules NH32 irradiées à 4 Gy avec celle des cellules NH32 non irradiées. Les gènes sur-exprimés après irradiation sont indiqués en rouge, les gènes sous-exprimés en bleu. Les gènes représentés en vert ne présentent pas de modification de leur expression après irradiation. Ces schémas sont issus de l'analyse des résultats par le logiciel Atlas Image.



Les gènes correspondant aux signaux mis en évidence dans la Figure 99, sont indiqués pour les cellules TK6 et pour les cellules NH32 dans la Figure 100.

A	Gène	Code	NI	4 Gy	Rapport
	chromatin assembly factor 1 p48 subunit (CAF1 p48 subunit)	7L	46	20	0,4
	CD40 receptor-associated factor 1 (CRAF1)	12K	18	40	2,2
	extracellular signal-regulated kinase 6 (ERK6)	6M	15	44	2,9
	Procaspase-9 (CASP9)	11L	82	242	3,0
	insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	16 F	9	57	6,3
	death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1; DAPK1)	17E	12	88	7,3
B	Gène	Code	NI	4 Gy	Rapport
	c-myc purine-binding transcription factor puf	9D	19	0	Down
	glutathione-S-transferase (GST) homolog	10B	18	0	Down
	transforming protein rhoA H12 (RHO12; ARH12; ARHA)	19D	66	3	0,0
	c-myc binding protein MM-1	9C	47	5	0,1
	proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin	7H	74	15	0,2
	growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform	8I	30	7	0,2
	cytoplasmic beta-actin (ACTB)	1G	45	98	2,2
	WSL protein + TRAMP + Apo-3 + death domain receptor 3 (DDR3)	15G	16	42	2,6
	CD40 receptor-associated factor 1 (CRAF1)	12K	23	87	3,8
	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (CDKN2D); p19-INK4D	5J	16	68	4,3
	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 3 (PCTK3)	4 F	15	147	9,8
	death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1; DAPK1)	17E	0	35	Up

**Figure 100 : Gènes exprimés différemment après irradiation des cellules TK6 (A) et NH32 (B) par les neutrons rapides.** Les gènes en blanc sont sur-exprimés, les gènes en vert sont sous-exprimés après irradiation. Le code correspond à la position des gènes sur les membranes de cDNA array. NI et 4 Gy indiquent l'intensité des signaux mesurés sur la membrane correspondant aux cellules non irradiées et sur la membrane des cellules irradiées par les neutrons respectivement. Ces intensités sont ajustées par rapport au bruit de fond. Le rapport entre ces deux intensités est également indiqué.

D'après ces résultats, plusieurs gènes présentent une expression différentielle dans les cellules TK6 et NH32 après irradiation par les neutrons rapides. L'expression de 6 gènes pour les cellules TK6 et de 12 gènes pour les cellules NH32 est modulée par ces radiations. Parmi ces gènes, les gènes CRAF1 et DAP kinase 1 sont sur-exprimés dans les deux lignées cellulaires après l'irradiation. Ils sont donc indépendants du statut p53 des cellules.

### 3. DISCUSSION

Sachant que l'irradiation par les neutrons rapides induit l'apoptose par deux voies de signalisation différentes (l'une dépendante de p53, l'autre indépendante de p53), notre objectif était d'effectuer un criblage des gènes exprimés après irradiation aux neutrons, afin de pouvoir mieux comprendre les mécanismes encore inexpliqués du processus apoptotique (Fischer *et al*, 2003). Pour cela, nous avons irradié les cellules TK6 et NH32 et comparé l'expression de leurs gènes radio-induits en utilisant la technique de « cDNA expression arrays ». Nous avons émis l'hypothèse que les variations observées dans l'induction d'apoptose par les neutrons dans ces deux types cellulaires sont dues à des différences dans les gènes activés en réponse aux radiations. L'étude des modifications d'expression des gènes après irradiation nous sert donc à mettre en évidence les mécanismes moléculaires de l'apoptose.

Nos résultats font apparaître une expression différentielle de plusieurs gènes après exposition aux neutrons rapides. Certains de ces gènes sont sur-exprimés dans les deux lignées cellulaires TK6 et NH32. C'est le cas du gène CD40 receptor-associated factor 1 (CRAF1) et du gène « death-associated protein kinase 1 » (DAPK1), ce dernier étant le plus exprimé dans les deux types cellulaires après irradiation. D'autres gènes présentent une expression modifiée après irradiation, mais uniquement dans les cellules TK6 : le gène « chromatin assembly factor 1 p48 subunit » (CAF1 p48 subunit, encore appelé retinoblastoma -binding protein 4) est sous-exprimé tandis que les gènes : « extracellular signal-regulated kinase 6 » (ERK6), « procaspase-9 » (CASP9), et « insulin-like growth factor binding protein 2 » (IGFBP2) sont sur-exprimés. Par contre, dans les cellules NH32, d'autres gènes sont régulés par les neutrons rapides : « c-myc purine-binding transcription factor puf », « glutathione-S-transferase (GST) homolog », « transforming protein rhoA H12 » (RHO12), « c-myc binding protein MM-1 », « proliferating cyclic nuclear antigen » (PCNA) et « growth factor receptor-bound protein 2 » (GRB2 isoform) sont sous-exprimés alors que les gènes : « cytoplasmic beta-actin » (ACTB), « WSL protein + TRAMP + Apo-3 + death domain receptor 3 » (DDR3), « cyclin-dependent kinase 4

inhibitor D » (CDKN2D), « serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 3 » (PCTK3) sont sur-exprimés par rapport au témoin non-irradié.

Nous avons ici mis en évidence l'expression différentielle de ces gènes en nous basant sur l'expression des ARNm. Comme les caractéristiques d'hybridation dépendent de la séquence de chaque gène et qu'il existe des variations dues à la réaction d'hybridation, la technique de cDNA expression arrays doit être considérée comme semi-quantitative. En effet, il est difficile de distinguer les différences d'expression dues au processus biologique étudié de celles dues à la variabilité expérimentale. Il faudra donc confirmer par RT-PCR les résultats obtenus pour chaque gène identifié. Cependant, Sehgal *et al.* ont démontré que la majorité des gènes identifiés par cette technique de « cDNA expression arrays » étaient similaires à ceux mis en évidence par RT-PCR classique dans des lignées de glioblastome et ont ainsi confirmé la fiabilité de cette méthode (Sehgal *et al.* 1998). Par contre, pour savoir si les produits de ces gènes interviennent dans les processus d'apoptose induits par l'irradiation par les neutrons rapides, il reste à vérifier que les ARNm transcrits de manière différentielle sont de la même façon traduits en protéines et que ces protéines sont fonctionnelles dans les cellules. Toutefois, ces résultats bien que préliminaires, nous apportent des données complémentaires sur les mécanismes d'apoptose mis en jeu après irradiation par les neutrons rapides (Fischer *et al.* 2003, chapitres précédents). En effet, si ces gènes sont activés ou réprimés par rapport au contrôle non irradié, ils jouent un rôle dans la réponse à l'irradiation, et nous renseignent sur la signalisation de l'apoptose après irradiation.

Ainsi les gènes DAPK1 et CRAF1 qui sont sur-exprimés après exposition aux neutrons dans les cellules TK6 et NH32 interviennent chacun dans des mécanismes apoptotiques bien définis : la protéine DAPK1 est une sérine/thréonine kinase, calcium/calmoduline dépendante qui contient un domaine de mort (DD). Il a été rapporté que la sur-expression de cette protéine réduit la viabilité des cellules HeLa (Cohen O *et al.* 1997). Certaines cellules cancéreuses présentent une délétion du gène de la DAPK1 ce qui souligne son importance dans l'apoptose (Cohen *et al.* 2001). Elle a d'abord été identifiée comme régulateur de la mort cellulaire induite par l'interféron gamma mais elle semble également jouer un rôle dans l'apoptose induite

par le TNF $\alpha$  ou Fas (Cohen *et al.* 1999) où elle semble agir en aval du récepteur et en amont des caspases. Nous avons déjà montré que la voie Fas n'intervient pas dans l'apoptose induite par les neutrons rapides mais il reste à déterminer l'intervention du récepteur TNF $\alpha$ . DAPK1 peut également intervenir dans la mort cellulaire induite par les céramides (Pelled *et al.* 2002). La voie des céramides pourrait être à l'origine de l'activation de la caspase-8 dans l'apoptose induite par les neutrons dans nos cellules. En effet, il a été démontré que les céramides conduisent à l'activation de la caspase-8 (Darios *et al.* 2003) et le rôle des céramides dans l'apoptose induite par les rayons  $\gamma$  a été établi (Vit et Rosselli 2003). Des expériences ultérieures permettront de préciser si les céramides interviennent dans l'une des voies que nous avons déjà caractérisées. De plus, il a même été suggéré que la voie du TNF $\alpha$  stimule la formation des céramides, ce qui établit une relation entre les deux voies dans lesquelles la protéine DAPK1 semble être impliquée (Sawada *et al.* 2004). Le gène CRAF1 quant à lui code pour une protéine adaptatrice, appartenant à la famille TRAFs, des facteurs associés aux récepteurs du TNF. Ce gène CRAF1 encore appelé « TNF receptor associated factor 3 » ou TRAF3 est également sur-exprimé dans l'apoptose induite par les rayons UV, ce qui suggère un mécanisme commun d'activation de cette protéine entre les UV et les neutrons (Murakami *et al.* 2001). Cette protéine cytoplasmique intervient dans la transduction du signal des récepteurs TNF et oriente ainsi également nos recherches vers la voie de ce récepteur. Elle interagit plus précisément avec le récepteur CD40, situé à la surface des lymphocytes B, auquel elle se lie après stimulation de ce dernier par CD40L (CD40 ligand) (Cheng *et al.* 1995). CRAF1 joue également un rôle dans l'apoptose induite par le récepteur CD40. Le récepteur CD40, présent à la surface des cellules B pourrait donc être exprimé au niveau des cellules TK6 et NH32 et intervenir dans l'apoptose induite par les neutrons en liant CRAF1. Par ailleurs, la sur-expression de CRAF1 conduit à l'inhibition du facteur de survie NF $\kappa$ B et à l'activation de la voie des MAPkinases, plus particulièrement p38 et la kinase Jun (JNK), qui vont induire l'apoptose (Takaori-Kondo *et al.* 2000, Grammer *et al.* 1998). Les gènes de ces protéines p38 et JNK ne sont sur-exprimés ni dans les cellules TK6, ni dans les cellules NH32. Mais ces protéines peuvent être activées sans sur-expression de leur

gène, par phosphorylation. La protéine JNK, une fois activée, va inhiber l'action de BCL-2 et favoriser l'apoptose. La voie des MAPK pourrait donc intervenir dans l'apoptose induite par les neutrons rapides.

Par opposition à ces deux protéines, certains gènes sont activés ou réprimés spécifiquement dans les cellules TK6, notamment le gène ERK6 dont l'expression après irradiation est trois fois supérieure à celle du témoin non-irradié. Ce gène code également pour une MAPKinase : ERK6 encore appelé MAPK12 ou MAPK p38  $\gamma$ . La protéine ERK6 est activée suite à un stress ou par des cytokines pro-inflammatoires et elle inhibe la prolifération cellulaire. L'activation de ERK6 a déjà été montrée après irradiation  $\gamma$ , où elle est nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Wang *et al.* 2000). Son activation est alors dépendante de ATM, qui régule aussi l'activation de p53. Cette protéine peut donc contribuer à l'induction de l'apoptose dans les cellules TK6, après avoir bloqué les cellules en phase G2. Elle nous incite, comme CRAF1, à étudier la voie des MAPK, après irradiation par les neutrons. Deux autres gènes sont également sur-exprimés dans les cellules TK6 : le gène de la procaspase-9 et celui de l'IGFBP2. La sur-expression de la procaspase-9 confirme son rôle dans l'apoptose dépendante de p53 après exposition aux neutrons. En effet, nous avons déjà montré que la caspase-9 intervient après relargage du cytochrome c par la mitochondrie dans l'apoptose déclenchée par les neutrons rapides, mais uniquement en présence de p53 (chapitre 2, Fischer *et al.* 2003). Cette sur-expression n'est pas observée dans les cellules NH32, ce qui confirme également notre modèle d'apoptose dans lequel seules les caspases-8 et -7 semblent intervenir dans la voie p53-indépendante. Le gène IGFBP2 est aussi sur-exprimé dans les cellules TK6. Ce gène code pour une protéine qui lie l'IGF (facteur de croissance de l'insuline) et qui régule les effets de ce facteur de croissance. La protéine IGFBP2 est sur-exprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses où suivant le type cellulaire, elle inhibe ou stimule la prolifération (Hoefflich *et al.* 2001). D'autres investigations seront nécessaires pour déterminer la contribution de cette protéine dans la réponse aux neutrons rapides dans nos cellules. De plus, nous avons également détecté la répression du gène de la sous-unité p48 de CAF1, dans les cellules TK6. CAF1 est une protéine nucléaire constituée de trois sous-unités : p48, p60 et p150. Ce complexe est responsable de

l'assemblage de la chromatine durant la phase S pendant la réplication de l'ADN, et pendant sa réparation suite à un dommage. Il se lie aux histones et permet la formation des nucléosomes. L'inactivation de CAF1 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S (Ye *et al.* 2003). Si ce gène est sous-exprimé après irradiation dans nos cellules, il peut conduire à un défaut de réparation des dommages causés par les neutrons rapides et ainsi à l'apoptose. Par la suite, nous devons également nous intéresser aux voies de réparation des dommages causés par l'irradiation.

D'autre part, certains gènes sont activés ou sous-exprimés seulement dans les cellules NH32. Parmi les gènes spécifiquement réprimés dans ces cellules, figure le gène de l'homologue de la « glutathione-S-transferase » dont le produit intervient dans les mécanismes de détoxification. Cette enzyme permet la destruction des radicaux libres en interagissant avec le glutathion et fait ainsi partie des défenses de la cellule contre le stress oxydant. Son inhibition conduit à l'accumulation d'espèces réactives qui vont provoquer des dommages cellulaires. Sa répression après irradiation pourrait activer l'apoptose, les radiations étant à l'origine d'un stress oxydatif important. Les autres gènes réprimés dans les cellules NH32 semblent tous jouer un rôle dans la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire. Leur répression conduit à une inhibition de ces processus et par conséquent à la mort des cellules. Nous avons notamment mis en évidence deux gènes : « c-myc binding protein MM-1 » et « c-myc purine-binding transcription factor puf » dont les produits sont associés à c-myc, un oncogène souvent sur-exprimé dans les cellules cancéreuses entraînant alors une prolifération accrue. Le premier de ces gènes « c-myc binding protein MM-1 » code pour une protéine nucléocytoplasmique qui inhibe l'activité transcriptionnelle de c-myc. Par contre, le second joue un rôle majeur dans la synthèse des nucléosides triphosphates et active la transcription du gène c-myc. Ces deux gènes dont les activités sont opposées, sont tous les deux sous-exprimés suite à l'exposition aux neutrons rapides. D'autres expériences seront nécessaires pour évaluer l'influence de c-myc dans l'apoptose induite par les neutrons rapides. Le gène « growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform » intervenant dans la régulation d'un autre oncogène ras est également réprimé dans les cellules NH32 irradiées, ce qui empêche ainsi son interaction avec ras et l'activation de la prolifération cellulaire. En outre,

deux autres gènes jouant un rôle dans la synthèse d'ADN sont sous-régulés après irradiation dans cette lignée : le gène de la protéine RHO12 et le gène PCNA. La protéine RHO12 est un membre de la famille des petites GTPases, qui lient et hydrolysent le GTP. Elle stimule la synthèse d'ADN suite à l'activation de diverses voies de signalisation (récepteurs couplés aux protéines G). Il a été montré que son inhibition conduit à l'apoptose des cellules endothéliales (Hippenstiel *et al.* 2002). Le gène PCNA quant à lui code pour une protéine nucléaire impliquée dans le contrôle de la réplication de l'ADN et dans sa réparation (Paunesku *et al.* 2001). En effet, ce facteur est indispensable à l'activité de l'ADN polymérase  $\delta$ . Cependant, l'irradiation par les neutrons rapides induit également une sur-expression de trois gènes dans les cellules NH32 : le gène du récepteur DDR3 qui est un membre de la famille TNF, le gène de CDKN2D qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire et le gène PCK3 qui code pour une sérine/thréonine kinase qui favorise la différenciation des cellules et donc un arrêt du cycle cellulaire. Comme CRAF1 sur-exprimé dans cette lignée, DDR3 est impliqué dans la voie des récepteurs TNF et semble réguler négativement l'activité du facteur de survie NF $\kappa$ B. Il joue également un rôle dans l'homéostasie des lymphocytes (Kaptein *et al.* 2000). Par contre, CDKN2D est un inhibiteur de la kinase cycline dépendante 4 (cdk4) et sa sur-expression conduit à un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Sherr et Roberts 1999).

Pour résumer, les gènes exprimés différemment après irradiation nous apportent des indications sur les voies de signalisation activées après exposition aux neutrons rapides. La présence de gènes sous- ou sur-exprimés uniquement dans les cellules TK6 et uniquement dans les cellules NH32 met en évidence une régulation directe ou indirecte de ces gènes par ce suppresseur de tumeur. En effet, les gènes activés après irradiation dans les cellules NH32 seulement, peuvent être des gènes sur lesquels p53 exerce une inhibition dans les cellules TK6. Par conséquent la plupart des gènes dont l'expression est modifiée après irradiation par les neutrons rapides dépendent du statut p53 des cellules. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Park *et al.* et Amundson *et al.* qui ont montré que les gènes de réponse aux rayons  $\gamma$  étaient indépendants de p53 (Park *et al.* 2002, Amundson *et al.* 1999). Il est également important de remarquer que le gène p53 n'est pas sur-exprimé dans les cellules TK6,

ce qui semble relativement normal étant donné que l'activation de cette protéine n'est pas causée par sa sur-expression mais par son accumulation dans les cellules du fait d'une inhibition de sa dégradation. Dans notre étude, seuls les gènes DAPK1 et CRAF1 sont sur-exprimés dans les deux types cellulaires. Ils semblent donc être impliqués dans des voies indépendantes de p53. Ces gènes sont tous les deux impliqués dans la voie des récepteurs TNF. De même, le récepteur DDR3 activé dans les cellules NH32 est également un composant de la signalisation cellulaire des récepteurs TNF. Par ailleurs, certains travaux ont montré que le TNF $\alpha$  pouvait jouer un rôle dans l'induction d'apoptose par les photons (Inagaki-Ohara *et al.* 2001). Cette voie de signalisation pourrait être responsable de l'apoptose p53-indépendante. De même, les gènes ERK6 et CRAF1 soulignent le rôle éventuel de la voie des MAPKinases après irradiation (Dent *et al.* 2003) Enfin, parmi les gènes identifiés, plusieurs d'entre eux entraînent l'apoptose en induisant un arrêt dans le cycle cellulaire ou en inhibant la réparation de l'ADN ou sa réplication. Des résultats similaires ont été obtenus après irradiation  $\gamma$ , où les gènes sur- ou sous-exprimés ont surtout une influence sur la progression du cycle cellulaire et la mitose (Heinloth *et al.* 2003). Il serait également intéressant d'étudier les mécanismes de réparation des dommages ainsi que ceux intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, sachant que les neutrons induisent des dommages à l'ADN très complexes et difficilement réparables (Mustonen *et al.* 1999).

En conclusion, en nous indiquant les gènes activés ou réprimés après irradiation par des neutrons rapides, la technique de « cDNA expression arrays » met en évidence certaines voies de signalisation de l'apoptose non encore étudiées en ce qui concerne ces rayonnements. Les études d'expression différentielle de gènes de réponse aux radiations à TEL élevé sont rares et portent surtout sur les gènes responsables de la cancérogénèse induite par ces rayonnements (Hei *et al.* 2001, Roy *et al.* 2001). Cette technique constitue donc une approche intéressante pour étudier les mécanismes apoptotiques induits par les radiations ionisantes. Cependant, elle reste avant tout informative. En effet, nos résultats ne nous permettent pas de définir en détail les mécanismes à l'origine du processus apoptotique induit par les neutrons rapides, du moins pas aussi précisément que les résultats obtenus précédemment pour la



caractérisation des caspases impliquées ou l'évaluation du rôle de BID ou Fas (chapitres 2 et 3). Néanmoins, l'identification des gènes dont l'expression est modifiée par les neutrons rapides permettent d'orienter nos futures investigations vers la voie des récepteurs TNF, celle des MAPKinases ou encore celle des céramides. Ces études seront utiles pour comprendre les voies de signalisation activées par les neutrons rapides.

**2<sup>ème</sup> PARTIE :**

ETUDE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE DE  
L' APOPTOSE INDUITE PAR LES IONS CARBONE DANS DES  
CELLULES LYMPHOBLASTOÏDES HUMAINES DIFFERANT  
PAR LEUR STATUT P53

## Chapitre 5

# ROLE DE P53 DANS L'INDUCTION D'APOPTOSE PAR LES IONS CARBONE DANS DES LIGNEES TUMORALES HUMAINES D'ORIGINE LYMPHOÏDE

### RESUME

Nous avons déjà évalué les effets des neutrons rapides sur ces lignées cellulaires et démontré le rôle de p53 dans l'apoptose induite par ces derniers. L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle de p53 dans l'apoptose induite par d'autres radiations à TEL élevé et plus particulièrement par des ions carbone dans des cellules tumorales humaines d'origine lymphoïde, afin de définir des caractéristiques communes aux rayonnements à TEL élevé. Nos résultats indiquent que les ions carbone induisent une diminution de la prolifération des lignées TK6 et NH32 plus importante que celle provoquée par les rayons X ou par les neutrons rapides. Comme pour les neutrons rapides, p53 est impliqué dans la sensibilité des cellules TK6 aux ions carbone. Les ions carbone sont aussi plus efficaces que les rayons X en terme d'induction d'apoptose, dans les cellules TK6 et NH32 ainsi que dans les cellules MOLT-4. Nous avons également montré que les caspases interviennent dans l'apoptose induite par ces particules. Les expériences avec l'inhibiteur des caspases de type-3 ont révélé le rôle essentiel de ces dernières dans l'exécution du processus apoptotique déclenché par ces rayonnements à TEL élevé. Comme suite à l'exposition aux neutrons rapides, l'irradiation par les ions carbone induit deux voies apoptotiques : la première dépendante de p53 survient rapidement après irradiation et induit l'activation de la caspase-3. La deuxième voie d'apoptose est plus faible et retardée et ne fait intervenir ni p53 ni la caspase-3.

Ces résultats ont été repris dans deux publications différentes dans les journaux *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* et *Anticancer Research* (Coelho *et al. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2002 ; Fischer *et al. Anticancer Research* 2003).



## 1. INTRODUCTION

La destruction des tumeurs par les radiations ionisantes dépend de facteurs cellulaires liés aux cellules qui constituent la tumeur et les tissus avoisinants, et de facteurs physiques qui incluent la nature des rayonnements ou le fractionnement de la dose. Ces facteurs physiques peuvent être modifiés dans le but d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. L'utilisation des radiations ionisantes à TEL élevé représente notamment une approche prometteuse pour prévenir la radiorésistance des tumeurs.

Les premiers chapitres de ce travail de thèse sont consacrés aux effets induits par l'un de ces rayonnements à TEL élevé, les neutrons rapides dans les lignées lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53. Nous avons démontré qu'à dose égale ces radiations étaient plus efficaces pour induire la mort cellulaire que les rayons X. Nous avons également montré que p53 joue un rôle essentiel dans la sensibilité des cellules aux neutrons rapides et établi un modèle de signalisation cellulaire de l'apoptose induite par ces rayonnements. Cependant il existe d'autres radiations à TEL élevé. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'induction de la mort cellulaire par un autre type de rayonnement à TEL élevé, les ions carbone. Bien que ces ions lourds soient utilisés dans plusieurs grands centres de radiothérapie dans le monde (Orecchia *et al.* 1998, Kraft 1998), peu de données dans la littérature scientifique concernent l'apoptose induite par ces particules (Aoki *et al.* 2000, Takahashi *et al.* 1998). Nous avons donc, comme pour les neutrons rapides, tenté d'évaluer l'implication de la protéine p53 dans les effets cytotoxiques de ces radiations. Nous avons aussi mis en évidence le rôle des caspases dans le déclenchement de la mort cellulaire par ces ions. Un des objectifs de cette étude était également de déterminer si les résultats obtenus avec les neutrons rapides peuvent être généralisés à toutes les radiations à TEL élevé.

Pour cela, les lignées cellulaires TK6 et NH32 ont été irradiées par des ions carbone (95 MeV/nucléon) produits au GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds, Caen). Pour ces expériences avec les ions lourds, nous avons aussi utilisé la lignée

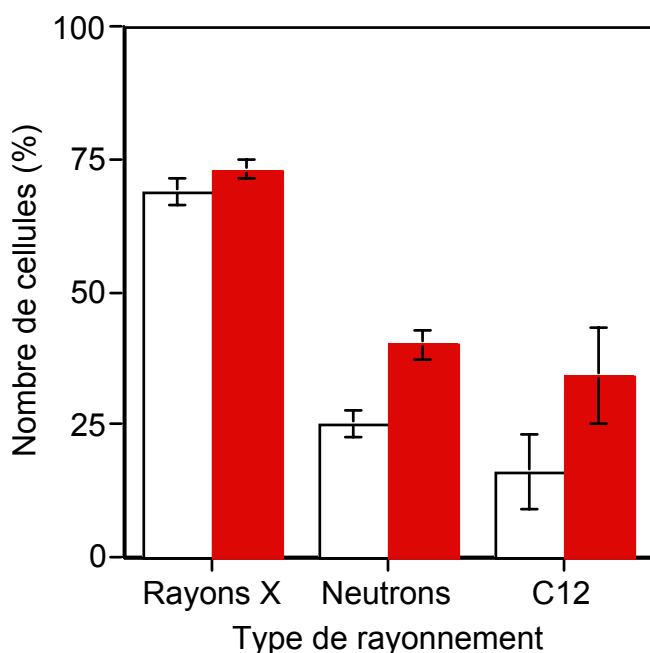
humaine de leucémie lymphoblastique aiguë MOLT-4. Nous avons quantifié l'apoptose et mesuré les effets de l'irradiation par les ions carbone sur la prolifération de ces trois lignées. Ces effets ont été comparés à ceux des rayons X et à ceux des neutrons rapides. Les caspases intervenant dans l'apoptose induite par ces rayonnements ont également été identifiées.

L'étude de la signalisation apoptotique après exposition aux ions carbone est préliminaire. En effet, étant donné la faible disponibilité de l'accélérateur d'ions lourds de Caen (en moyenne une irradiation par an), peu d'expériences ont été réalisées sur les différents mécanismes cellulaires à l'origine du processus apoptotique suite à une exposition aux ions lourds.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Radiosensibilité aux ions carbone

Tout d'abord, nous avons comparé les effets des ions carbone à ceux des rayons X et des neutrons rapides sur la prolifération des cellules TK6 et NH32, afin d'en dégager le rôle de p53 dans la radiosensibilité des cellules aux ions carbone. La croissance des cellules a été mesurée par le test UptiBlue, quatre jours après une irradiation à 2 Gy par des rayons X, des neutrons rapides ou par des ions carbone. La Figure 101 montre que l'irradiation par les ions carbone provoque une diminution de la prolifération des cellules TK6 et NH32 non seulement plus importante que celle induite par les rayons X mais également légèrement plus prononcée que celle induite par les neutrons rapides.



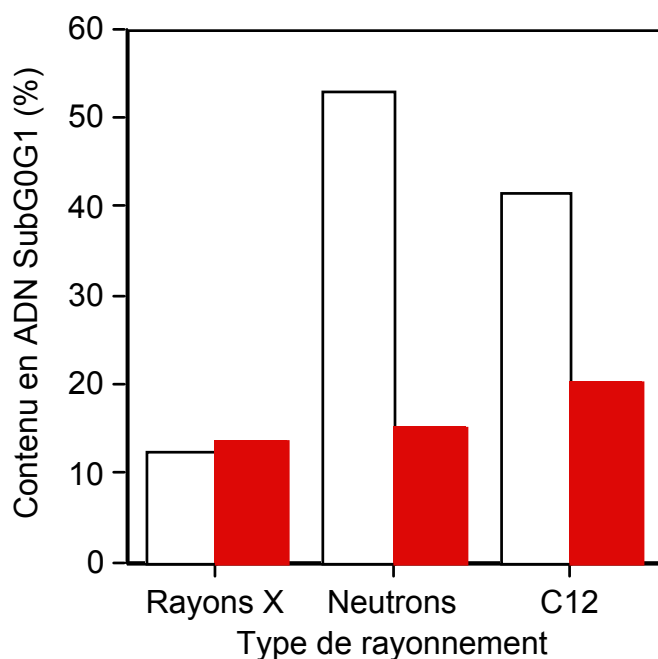
*Figure 101 : Effets comparatifs sur la prolifération cellulaire d'une irradiation avec des rayons X, des neutrons rapides et des ions carbone 12 (C12). Les cellules TK6(□) et NH32 (■) ont été irradiées à 2 Gy par les différents types de rayonnements et la prolifération cellulaire a été mesurée par le test UptiBlue 4 jours après irradiation. Les valeurs sont exprimées en pourcentages par rapport aux valeurs des cellules non irradiées et sont représentatives de trois expériences indépendantes réalisées trois fois.*

La prolifération cellulaire des TK6 atteint 25% suite à une irradiation par les neutrons rapides et 16% après irradiation par les ions carbone. Par ailleurs, bien qu'aucune différence ne soit observée entre les cellules TK6 et NH32 en ce qui concerne

l'inhibition de croissance provoquée par les rayons X, les ions carbone, tout comme les neutrons, entraînent une chute de la prolifération cellulaire plus forte dans les cellules TK6 par opposition aux cellules NH32. En effet, après irradiation par les ions carbone, le nombre de cellules NH32 diminue jusqu'à 34% en comparaison avec 16% pour la lignée TK6. Ces résultats suggèrent que p53 est impliqué dans la sensibilité des cellules TK6 aux ions carbone et plus généralement dans la sensibilité aux radiations à TEL élevé. De plus, ces données indiquent également que les ions carbone sont plus efficaces que les rayons X quel que soit le statut p53 des cellules.

## 2.2. Induction de l'apoptose par les ions carbone

Pour déterminer si les différences observées entre les rayons X, les neutrons rapides et les ions carbone en ce qui concerne la diminution de la prolifération cellulaire, proviennent d'une induction différente d'apoptose, nous avons quantifié par cytométrie en flux la formation des particules hypodiploïdes dans les cellules TK6 et NH32, 24 h après irradiation à 4 Gy. Pour une même dose, les ions carbone sont plus efficaces que les rayons X pour induire l'apoptose des cellules TK6 et NH32 (Figure 102).

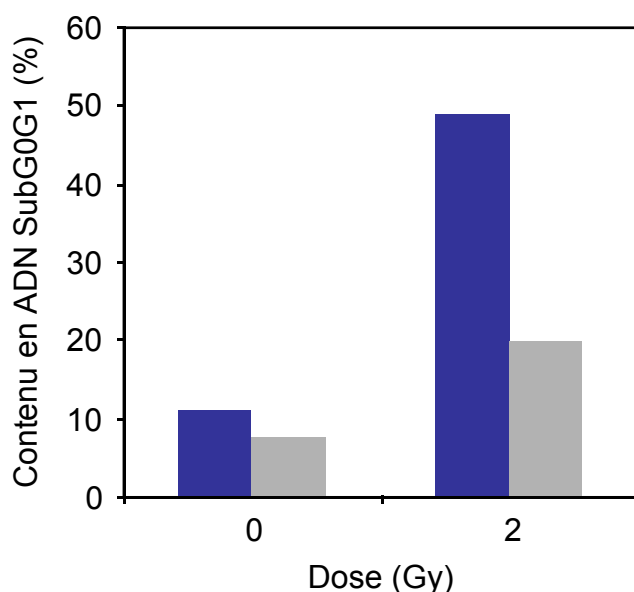


**Figure 102 :** Comparaison de l'induction d'apoptose par les rayons X, les neutrons rapides et les ions carbone. Les cellules TK6 (□) et NH32 (■) ont été perméabilisées 24 h après irradiation à 4 Gy et marquées à l'iodure de propidium, puis analysées par cytométrie en flux. Les cellules contenant de l'ADN SubG0G1 c'est-à-dire une quantité d'ADN inférieure à 2n, sont définies comme apoptotiques. Les valeurs sont représentatives de trois expériences indépendantes.



Cependant, l'apoptose induite par ces ions lourds est plus importante dans les cellules TK6 (42%) que dans les cellules déficientes en p53 (20%), ce qui suggère que p53 est impliqué dans l'induction d'apoptose par les ions carbone. Par ailleurs, l'apoptose induite par ces particules reste inférieure à celle induite par les neutrons rapides dans les cellules TK6, alors que dans les cellules NH32, l'inverse est observé avec une apoptose légèrement plus faible après exposition aux neutrons rapides (15%). Donc, les ions carbone seraient plus efficaces que les neutrons rapides pour induire l'apoptose en l'absence de p53.

De même, nous avons examiné l'apparition des particules hypodiploïdes dans les cellules MOLT-4 après irradiation à 2 Gy par les ions carbone ou les rayons X. Dans cette lignée cellulaire, tout comme dans les cellules TK6 et NH32, le nombre de cellules apoptotiques est plus élevé après exposition aux ions carbone qu'après exposition aux rayons X (Figure 103). Ces résultats confirment la plus grande efficacité des ions lourds en terme d'induction d'apoptose.

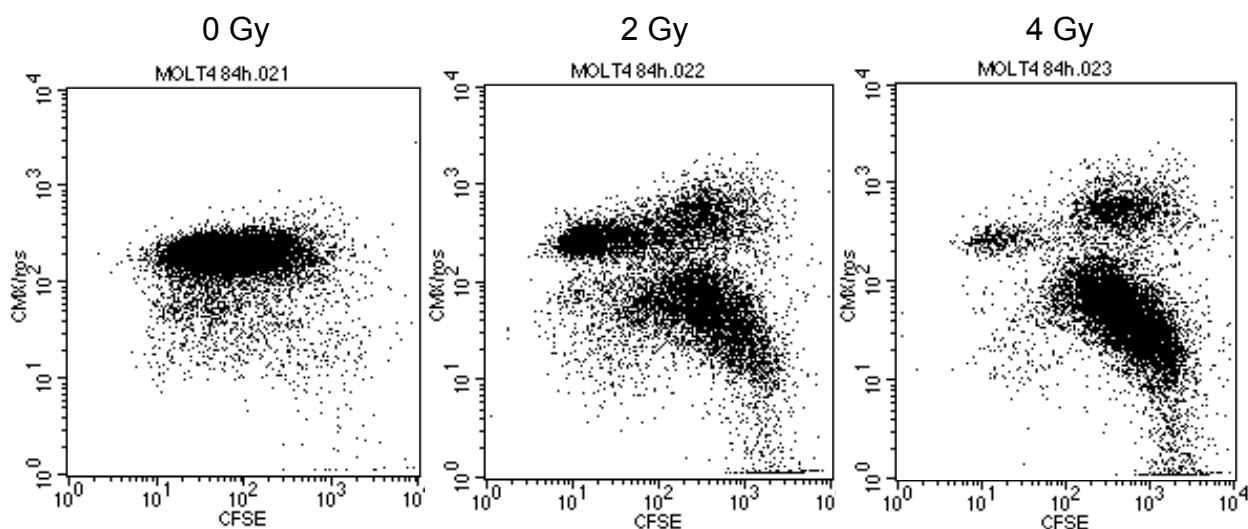


*Figure 103 : Induction de l'apoptose après irradiation des cellules MOLT-4. Les cellules ont été irradiées à 2 Gy par les ions carbone (■) ou par les rayons X (■). La formation de particules hypodiploïdes (ADN SubG0G1) a été mesurée 24 h après irradiation, après perméabilisation des cellules et marquage à l'iodure de propidium. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.*

### **2.3. Corrélation entre l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire, induites par les ions carbone**

En utilisant le test CFSE (5(et 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), nous avons ensuite essayé d'établir une corrélation entre l'induction d'apoptose et la

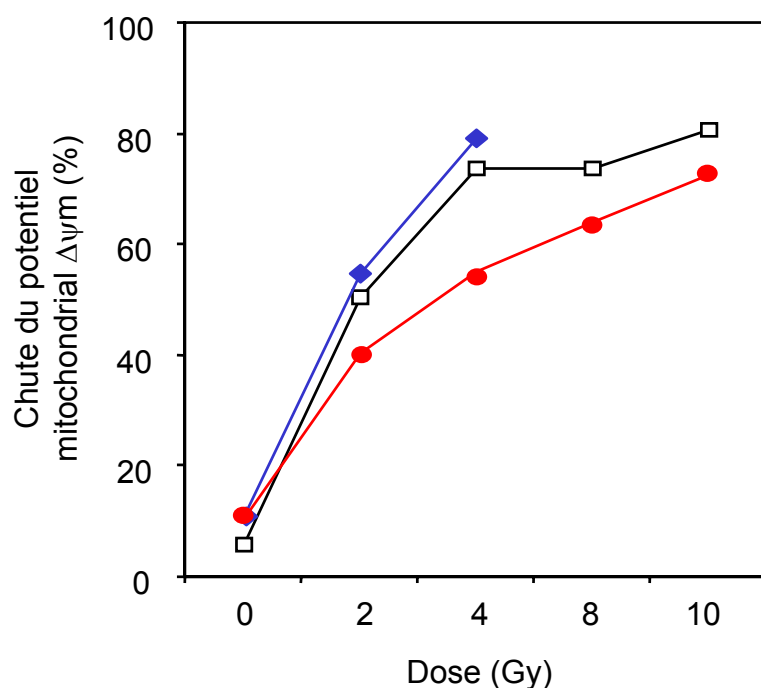
capacité des cellules à se diviser après une irradiation par les ions carbone. Le marqueur CFSE se lie irréversiblement aux protéines intracellulaires ainsi qu'aux protéines situées à la surface des cellules. Lorsque les cellules se divisent, le CFSE va se distribuer également entre les cellules filles. Ainsi, dans une population cellulaire, chaque génération successive sera caractérisée par une intensité de fluorescence diminuée de moitié, qui sera mesurée par cytométrie en flux (Lyons 2000). Le nombre de cellules capables de se diviser après irradiation peut alors être mis en évidence. De plus, si ce test CFSE est associé à un marqueur apoptotique, une étude biparamétrique peut être effectuée. Dans ce but, les cellules MOLT-4 ont été irradiées par des ions carbone à 2 Gy ou 4 Gy, après marquage au CFSE. Puis à différents temps après irradiation, les cellules ont été prélevées et incubées avec la chlorométhyl-X-rosamine (CMX-Ros), un marqueur mitochondrial qui se fixe uniquement sur les cellules présentant un potentiel membranaire mitochondrial normal. L'apoptose est mesurée par la diminution des cellules positives à la CMX-Ros. La Figure 104 présente les résultats obtenus 84 h après irradiation.



**Figure 104 : Analyse biparamétrique de la prolifération et de l'apoptose dans les cellules MOLT-4, après irradiation par les ions carbone.** Les cellules ont été irradiées à 2 Gy ou 4 Gy après marquage au CFSE. Puis les cellules ont été prélevées 84 h après irradiation, marquées à la CMX-Ros et analysées en cytométrie en flux. En abscisse : fluorescence du CFSE et en ordonnée : fluorescence de la CMX-Ros. Les cellules non irradiées sont positives au CFSE et à la CMX-Ros. Les cellules qui ont arrêté leur division sont mesurées par une augmentation du marquage CFSE par rapport au contrôle non irradié. Les cellules apoptotiques sont celles présentant une diminution du marquage CMX-Ros.

Les cellules MOLT-4 non irradiées forment une population relativement étalée, correspondant à une prolifération active. Par contre, après irradiation à 2 Gy, le nombre de cellules positives au CFSE augmente : les cellules cessent de se diviser et par conséquent la concentration de CFSE fixé sur ces cellules reste importante. En outre, une grande partie de ces cellules est également caractérisée par une diminution du marquage à la CMX-Ros, indiquant une chute du potentiel mitochondrial et l'induction d'apoptose. Après irradiation à 4 Gy, ces effets sont encore accentués; le nombre de cellules capables de proliférer est fortement réduit et l'apoptose augmente (Figure 104). Des profils similaires ont été obtenus pour les cellules TK6 et NH32. Ces résultats montrent qu'après irradiation, les cellules qui stoppent leur prolifération entrent en apoptose, suggérant que l'apoptose est corrélée avec un arrêt de la prolifération cellulaire après exposition aux ions carbone.

Le marquage à la CMX-Ros nous a également permis de comparer l'induction d'apoptose par les ions carbone dans les différentes lignées cellulaires, TK6, NH32 et MOLT-4, 84 h après irradiation. Nous pouvons constater que les lignées cellulaires présentent des différences quant à l'induction d'apoptose après plus de 3 jours de culture (Figure 105). Les cellules MOLT-4 ainsi que les cellules TK6 présentent la même sensibilité à ces rayonnements tandis que les cellules NH32 sont plus résistantes à l'apoptose induite par les ions carbone. Ces données confirment les résultats précédents.

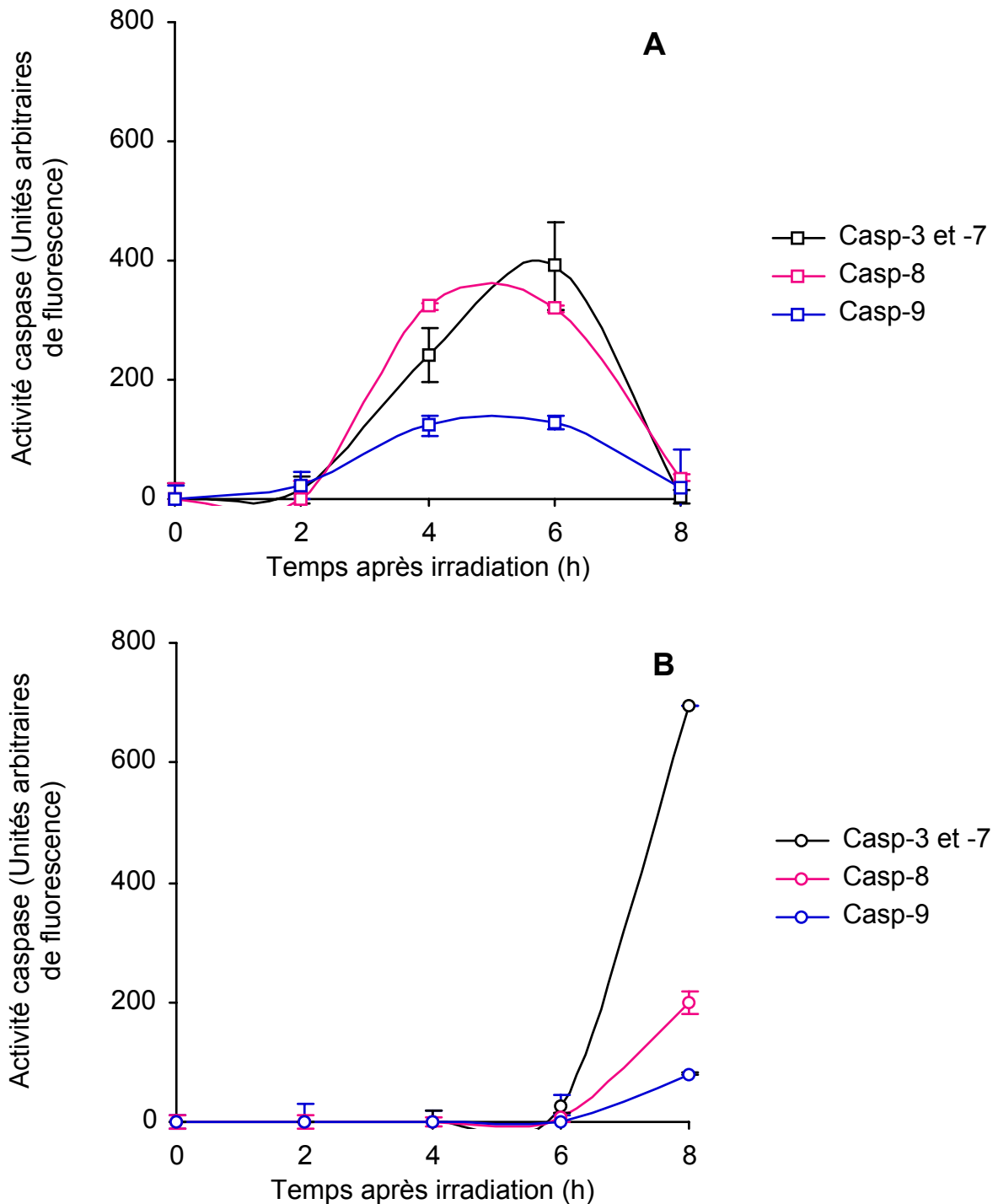


**Figure 105 :** Induction de l'apoptose par les ions carbone en fonction de la dose d'irradiation. Les cellules TK6 (□), NH32 (●) et MOLT-4 (◆) ont été prélevées 84 h après irradiation et analysées par cytométrie en flux après marquage à la CMX-Ros. Les cellules négatives au marquage CMX-Ros présentent une chute du potentiel mitochondrial et sont considérées comme apoptotiques.

#### **2.4. Activation des caspases par les ions carbone**

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que les caspases jouent un rôle essentiel dans l'apoptose induite par les neutrons rapides. De plus, la nature des caspases activées varie selon le statut p53 des cellules. Pour évaluer l'importance des caspases dans l'apoptose induite par les ions carbone, nous avons examiné les cinétiques d'activités de plusieurs caspases après exposition aux ions carbone dans les cellules TK6 et NH32 (Figure 106).

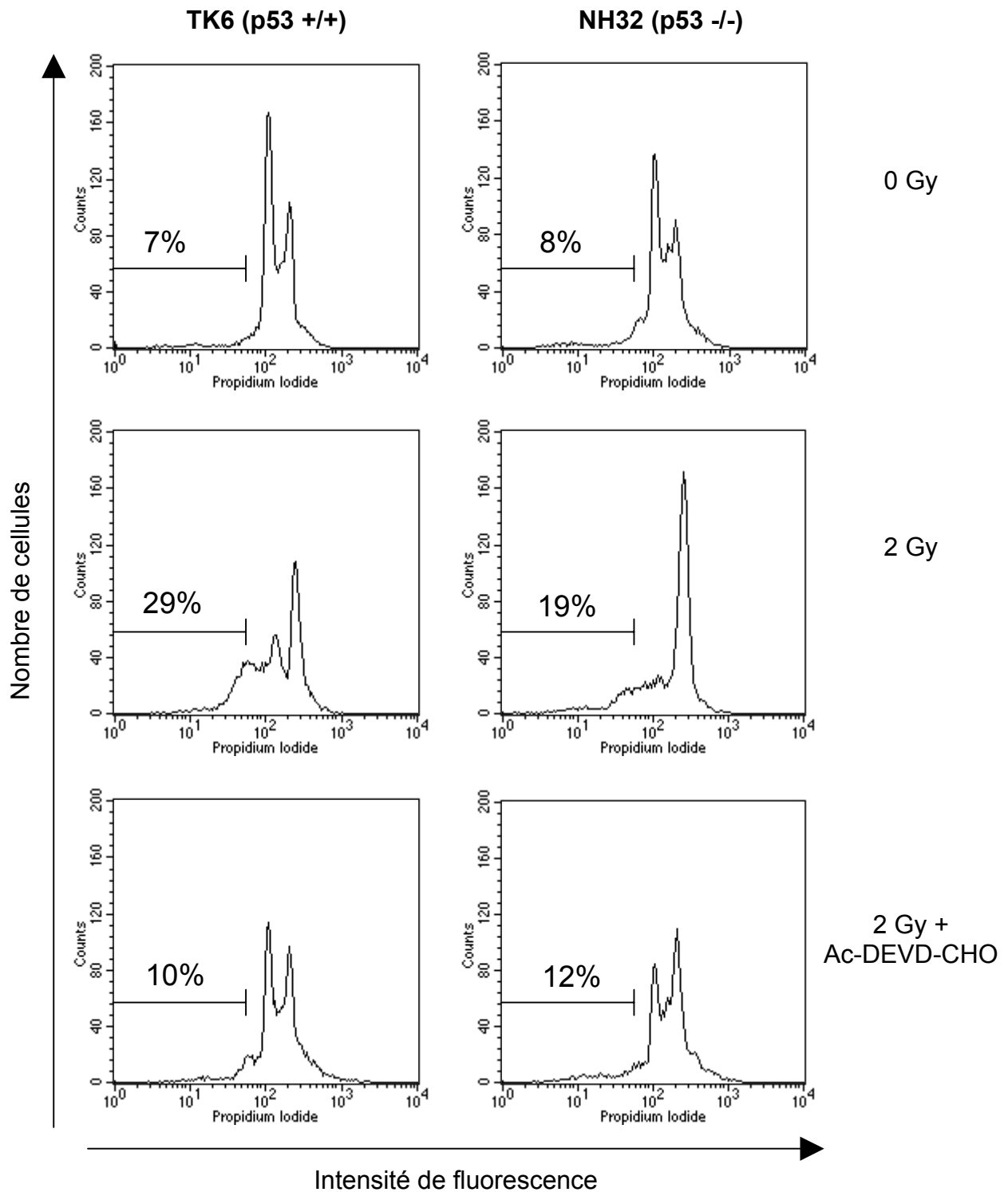
Les activités de ces protéases ont été mesurées grâce aux tests fluorimétriques, à des temps plus précoces que pour les neutrons rapides, car l'induction d'apoptose survient très tôt après irradiation par les ions carbone. Les activités des caspases-8, -9 et -3/-7 augmentent rapidement, à partir de 2 h après irradiation, culminent à 4-6 h et diminuent ensuite à partir de 6 h, dans les cellules TK6. Dans les cellules NH32, ces activités caspases augmentent seulement 6h après l'irradiation. Ces résultats suggèrent que l'activation des caspases et par conséquent l'apparition de l'apoptose est retardée dans les cellules déficientes en p53, ce qui avait également été observé avec les neutrons rapides.



**Figure 106 : Activités des caspases-8, -9 et -3 et -7, induites après irradiation par des ions carbone.** Aux temps indiqués, les cellules TK6 (A) et NH32 (B) ont été lysées et l'hydrolyse de Ac-DEVD-amc (caspases-3 et -7), Ac-IETD-amc (caspase-8) et Ac-LEHD-amc (caspase-9) a été mesurée à l'aide de tests fluorimétriques. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$ SD d'une expérience représentative réalisée avec trois échantillons différents.

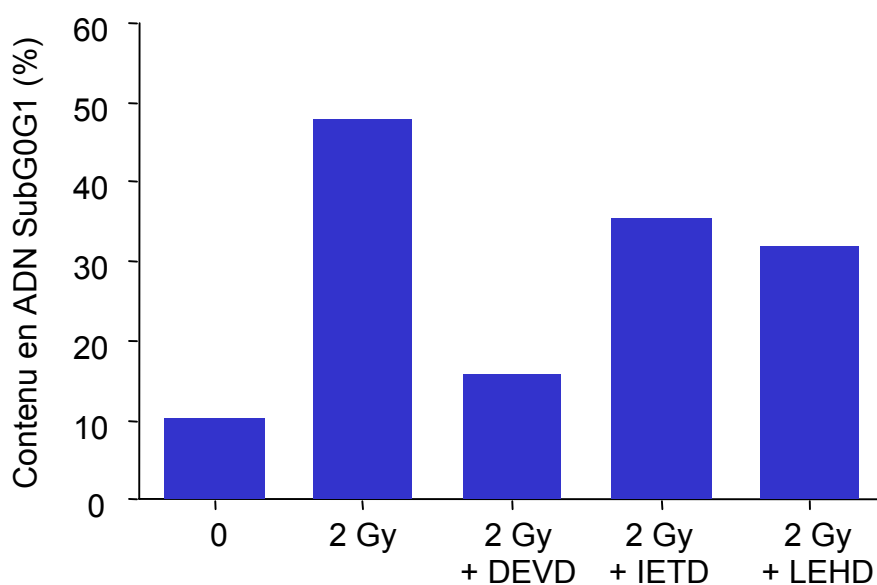
## 2.5. Importance de la caspase-3 dans l'apoptose induite par les ions carbone

La caspase-3 joue un rôle central dans l'apoptose activée par les rayons X (Coelho *et al.* 2000), ainsi que dans celle induite par les neutrons rapides, dans les cellules TK6 (chapitres 1 et 2). Après exposition aux ions carbone, nous avons détecté une activité des caspases de type caspase-3 dans les cellules TK6 et NH32 (Figure 106). Ainsi, pour compléter ces tests enzymatiques et confirmer le rôle de ces caspases dans la phase d'exécution de l'apoptose induite par ces rayonnements à TEL élevé, nous avons traité les cellules TK6 et NH32 avec l'inhibiteur spécifique des caspases de type-3, l'Ac-DEVD-CHO à 100  $\mu$ M, avant l'irradiation à 2 Gy. L'apparition de l'apoptose a été mesurée par la formation de particules hypodiploïdes 24 h après irradiation (Figure 107). Les cellules contenant de l'ADN SubG0G1 ont été définies comme apoptotiques. Les résultats montrent que l'inhibition des caspases-3 et -7 réduit le nombre de particules hypodiploïdes après exposition aux ions carbone, de 26% à 10% dans les cellules TK6 et de 19% à 12% dans les cellules NH32. Donc, l'inhibition des caspases de type-3 prévient l'apoptose induite par les ions carbone. En outre, après irradiation, le pic de cellules en phase G2 augmente dans les cellules TK6 et surtout dans les cellules NH32 déficientes en p53, suggérant que les ions carbone induisent une accumulation des cellules en G2. Cet arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est également inhibé par l'ajout d'Ac-DEVD-CHO. Des résultats similaires ont été obtenus avec les neutrons rapides et illustrent le rôle des caspases effectrices dans le processus apoptotique induit par les radiations à TEL élevé.



**Figure 107 : Effets de l'inhibition des caspases de type-3 sur l'apoptose induite par les ions carbone.** Les cellules TK6 (à gauche) et NH32 (à droite) ont été prétraitées 2 h avant l'irradiation à 2 Gy, avec l'inhibiteur de la caspases-3 et -7, l'Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M). L'apoptose a été quantifiée 24 h après l'irradiation, par mesure de la quantité de particules hypodiploïdes en cytométrie en flux. Le marqueur délimite les cellules hypodiploïdes, c'est-à-dire en apoptose. Le pourcentage indique le nombre de cellules apoptotiques. Les valeurs sont représentatives de trois expériences indépendantes.

De même, le rôle des caspases-3 et -7 a été mis en évidence dans les cellules MOLT-4 (Figure 108). Dans cette lignée, l'inhibition des caspases de type-3 par Ac-DEVD-CHO conduit à une diminution de l'apoptose plus forte après irradiation aux ions carbone que l'inhibition de la caspase-8 par Ac-IETD-CHO ou celle de la caspase-9 par Ac-LEHD-CHO, ce qui confirme l'importance de la caspase-3 après irradiation.

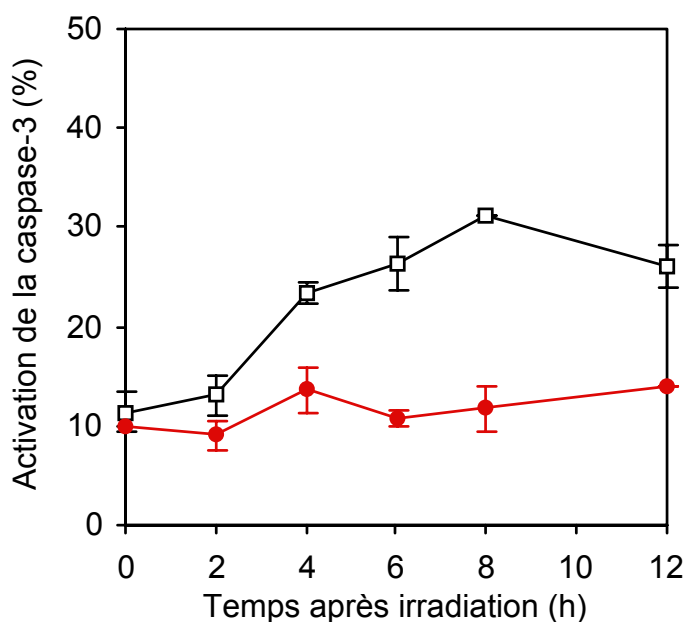


**Figure 108 : Effets de l'inhibition des caspases-8, -9 et de type-3 sur l'apoptose induite par les ions carbone dans les cellules MOLT4.** Les cellules ont été prétraitées 2 h avant l'irradiation à 2 Gy, avec l'inhibiteur des caspases de type-3 l'Ac-DEVD-CHO, l'inhibiteur de la caspase-8 Ac-IETD-CHO et l'inhibiteur de la caspase-9 Ac-LEHD-CHO à 100  $\mu$ M. L'apoptose a été quantifiée 24 h après l'irradiation, par mesure de la quantité de particules hypodiploïdes en cytométrie en flux. Les valeurs sont représentatives de trois expériences indépendantes. (sur la figure : DEVD : Ac-DEVD-CHO, IETD : Ac-IETD-CHO, LEHD : Ac-LEHD-CHO)

Pour les neutrons rapides, nous avons mis en évidence que l'activité de type caspase-3 mesurée dans les cellules TK6 est due à la caspase-3 et à la caspase-7, alors que dans les cellules NH32, elle est uniquement causée par la caspase-7 (chapitre 2). Pour vérifier si la caspase-3 est activée dans les cellules NH32 suite à une irradiation par les ions carbone, nous avons réalisé des mesures de son activation en cytométrie en flux, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme active de cette enzyme. Pour cela, les cellules TK6 et NH32 ont été irradiées à 2 Gy et à différents temps après

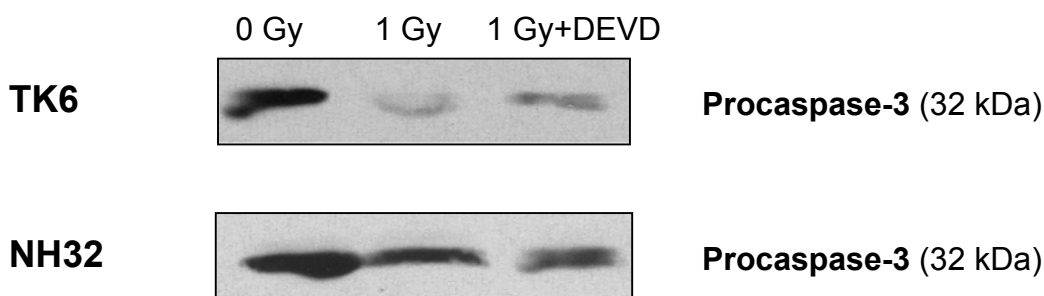


irradiation, les cellules ont été perméabilisées et incubées avec l'anticorps anti-caspase-3-active-FITC avant d'être analysées par cytométrie en flux. La Figure 109 montre que l'activation de la caspase-3 augmente en fonction de temps après irradiation dans les cellules TK6, avec un maximum atteint à 8 h. Par contre, dans les cellules NH32, aucune activation significative de la caspase-3 n'a pu être détectée après irradiation. En effet, il n'y a pas d'augmentation de la forme active de la caspase-3 dans les cellules NH32 irradiées.



**Figure 109 :** Activation de la caspase-3 après irradiation aux ions carbone. Les cellules TK6 (□) et NH32 (●) ont été irradiées à 2 Gy par les ions carbone. A différents temps après irradiation, les cellules ont été perméabilisées, marquées avec l'anticorps anti-caspase-3 active-FITC et analysées par cytométrie en flux. Les cellules positives au marquage présentent une activation de la caspase-3. Les valeurs sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent que l'activation de la caspase-3 est responsable de l'activité enzymatique mesurée après irradiation par les ions carbone dans la lignée TK6 (Figure 106), mais que dans les cellules NH32, une autre protéase intervient pour le clivage du substrat Ac-DEVD-amc. Pour valider ces données de cytométrie en flux, un western blot de la procaspase-3 a été réalisé 10 h après irradiation à 1 Gy par les ions carbone, dans les deux types cellulaires (Figure 110).



**Figure 110 : Analyse de l'activation de la caspase-3 par western blot après irradiation par les ions carbone.** Les cellules TK6 (en haut) et NH32 (en bas) ont été lysées 10 h après irradiation à 1 Gy et 20  $\mu$ g de protéines isolées des cellules ont été séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane de nitrocellulose incubée avec l'anticorps spécifique de la procaspase-3. L'inhibition de la caspase-3 par l'Ac-DEVD-CHO à 100  $\mu$ M sert de contrôle négatif. Cet inhibiteur a été ajouté 1 h avant l'irradiation. (sur la figure : DEVD : Ac-DEVD-CHO) Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Les résultats indiquent une diminution de la proforme de la caspase-3 dans les cellules TK6 après irradiation. Cette baisse de la procaspase-3 résulte de l'activation de cette caspase par clivage protéolytique. En revanche, dans les cellules NH32, aucune différence concernant la procaspase-3 n'est observée après 1 Gy d'ions carbone par rapport aux contrôles non irradiés, ce qui démontre que la caspase-3 n'est pas activée par l'irradiation dans cette lignée cellulaire. Ces résultats de cytométrie en flux et de western blot montrent que la caspase-3 intervient dans l'apoptose induite par les ions carbone uniquement en présence de p53.

### 3. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité des ions carbone à induire l'apoptose dans des cellules tumorales et examiné le rôle de p53 dans le déclenchement de ce type de mort cellulaire. Nous avons également démontré l'implication des caspases dans la mort cellulaire induite par ces rayonnements. De plus, par comparaison avec les résultats obtenus pour les neutrons rapides, nous avons pu mettre en évidence les caractéristiques des radiations à TEL élevé en ce qui concerne l'induction de l'apoptose dans les cellules lymphoblastoïdes.

Les ions carbone, tout comme les neutrons rapides, sont utilisés en clinique contre certains cancers, dans lesquels ils s'avèrent plus efficaces que les rayons X (Schulz-Ertner *et al.* 2004, Sudhamshu *et al.* 2003, Kraft 1998). Cependant, mis à part des dommages plus complexes induits au niveau de l'ADN, l'origine de l'efficacité de ces radiations à TEL élevé par rapport aux rayons X reste encore inexpliquée. Nos résultats apportent des informations supplémentaires concernant les effets de ces rayonnements.

Nous avons montré que les ions carbone diminuent la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose dans les trois lignées cellulaires étudiées : TK6, NH32 et MOLT4. Ces effets sont plus importants que ceux induits par les rayons X, ce qui suggère que l'efficacité des ions carbone peut être expliquée par une plus grande capacité à induire l'apoptose. Ces résultats semblent être en contradiction avec nos travaux portant sur l'induction d'apoptose dans les lymphocytes spléniques normaux de souris irradiées par des ions carbone (Holl *et al.* 2001). En effet, bien que ces travaux montrent une plus grande efficacité des ions carbone par rapport aux rayons X pour réduire le poids et la cellularité de la rate de ces souris irradiées, ils rapportent seulement une faible augmentation de l'apoptose des lymphocytes mis en culture après irradiation. Cependant, nos résultats *in vitro* s'accordent avec d'autres études démontrant une plus grande efficacité biologique relative des ions lourds pour l'induction d'apoptose (Aoki *et al.* 2000, Meijer *et al.* 1998). Ces résultats opposés prouvent que l'induction d'apoptose varie selon le type cellulaire étudié.

Par ailleurs, nous avons observé que la baisse de la prolifération cellulaire après irradiation par les ions carbone était liée à l'induction de l'apoptose. En effet, le double marquage CFSE/chlorométhyl-X-rosamine montre que l'apoptose est induite dans les cellules qui arrêtent de se diviser après irradiation, suggérant ainsi que l'apoptose est responsable de la diminution de la croissance cellulaire. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec les neutrons rapides. En effet, dans le cas d'une irradiation par les neutrons rapides, l'apoptose est seulement en partie responsable de la diminution de survie cellulaire et l'efficacité des neutrons est aussi expliquée par l'induction d'une mort clonogénique plus importante (chapitre 1, Coelho *et al.* 2002). Des tests de formation de colonies après irradiation par les ions carbone sont nécessaires pour déterminer si seule l'apoptose est responsable de l'efficacité des ions carbone (Sasaki *et al.* 1997).

Nous avons également démontré que les cellules MOLT-4 et TK6 qui présentent une protéine p53 sauvage sont plus sensibles aux ions carbone que les cellules NH32, déficientes en p53, ce qui souligne le rôle de p53 dans les effets cytotoxiques des ions carbone. L'apoptose induite est également supérieure dans les cellules TK6 par rapport aux cellules NH32, ce qui suggère que p53 est impliqué dans l'induction d'apoptose par les ions carbone. Toutefois, des travaux effectués sur des lignées tumorales différentes ont révélé que les effets des ions carbone sont indépendants du statut p53 des cellules (Iwadate *et al.* 2001, Asakawa *et al.* 2002, Baggio *et al.* 2002). D'autres expériences réalisées sur des cellules de glioblastome ont au contraire, obtenu des résultats similaires aux nôtres, indiquant que les cellules mutées pour p53 étaient plus résistantes aux ions carbone que les cellules avec une protéine p53 sauvage (Tsuboi *et al.* 1998). De même, Fournier *et al.* ont rapporté une accumulation de p53 dans des fibroblastes humains après irradiation par les ions carbone (Fournier *et al.* 2004). En outre, nos résultats mettent également en évidence l'influence de p53 dans l'induction d'apoptose par les neutrons rapides (Figure 102, chapitre 1). Ainsi, les dommages cellulaires infligés par les ions carbone et les neutrons rapides sont sous le contrôle de p53. De plus, les ions carbone semblent être plus efficaces que les neutrons pour induire l'apoptose des cellules déficientes en p53, ce qui prouve l'efficacité élevée de ces rayonnements contre les tumeurs radiorésistantes, les

cellules déficientes en p53 étant généralement plus résistantes à la radiothérapie conventionnelle (Takahashi *et al.* 1998, Matsui *et al.* 2004).

L'apoptose induite par les ions carbone est aussi corrélée avec l'activation des caspases. Les activités caspases décrites dans les cellules TK6 et NH32 mettent en évidence, comme pour les neutrons rapides, l'induction de deux voies d'apoptose par les ions carbone, l'une précoce en présence de p53 et l'autre indépendante de p53 et plus tardive (Figure 106, chapitre 2). De même, l'induction de l'apoptose par les ions carbone nécessite l'activation des caspases de type-3, puisque leur inhibition prévient l'apparition de ce type de mort cellulaire dans les cellules TK6 et MOLT-4 mais aussi dans les cellules NH32. Les caspases-8 et -9 semblent également jouer un rôle dans l'apoptose induite par ces radiations. Ces résultats apportent des données nouvelles concernant les mécanismes cellulaires d'induction de l'apoptose en réponse aux ions carbone, puisque peu d'informations sont disponibles sur les voies de signalisation apoptotiques activées par ces particules (Mitra *et al.* 2004, Fournier *et al.* 2004).

Les études de western blot de la procaspase-3 ainsi que les données obtenues par cytométrie en flux avec l'anticorps spécifique de la caspase-3 active révèlent une activation différentielle de la caspase-3 suivant le statut p53 des cellules irradiées. En effet, la caspase-3 est activée uniquement en présence de p53. Une autre caspase est donc responsable de l'activité DEVDase détectée 8 h après irradiation par les ions carbone dans les cellules NH32. Des résultats identiques sont obtenus dans le même type cellulaire après irradiation par les neutrons rapides. Comme nous avons démontré que suite à ces rayonnements, la caspase-7 est la caspase effectrice dans les cellules NH32, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette dernière est également responsable de l'exécution du processus apoptotique en réponse aux ions carbone en absence de p53. Néanmoins, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

En conclusion, les ions carbone sont plus efficaces que les rayons X et les neutrons pour diminuer la prolifération cellulaire. Cette étude nous a permis de comparer

l'apoptose induite par les ions carbone à celle induite par les neutrons rapides dans des cellules tumorales humaines d'origine lymphoïde. En dégagant les points communs entre ces deux types de rayonnement en ce qui concerne l'induction d'apoptose, nous avons pu définir les mécanismes apoptotiques spécifiques des radiations à TEL élevé. En effet, p53 est impliqué dans la sensibilité des cellules aux neutrons rapides et aux ions carbone, suggérant le rôle essentiel de cette protéine dans les effets des radiations à TEL élevé. Ainsi les dommages à l'ADN, constituent un type de lésions déterminant dans la cytotoxicité des rayonnements à TEL élevé. De même, l'apoptose induite par les ions carbone et par les neutrons rapides fait intervenir les caspases et la caspase-3 n'est activée qu'en présence de p53. Donc les radiations à TEL élevé activent dans les cellules TK6 deux voies d'apoptose différentes selon le statut p53. Il reste cependant à déterminer si ces voies de signalisation induites par ces rayonnements à TEL élevé sont spécifiques de notre type cellulaire. Des expériences avec d'autres lignées cellulaires présentant des différences au niveau de la protéine p53 seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

---

# *Conclusion*

---

## CONCLUSION

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'apoptose induite par les neutrons rapides et les ions carbone dans les cellules lymphoblastoïdes. Pris dans leur ensemble, nos résultats apportent des informations nouvelles concernant l'induction de ce type de mort par les radiations ionisantes à TEL élevé. Ils soulignent également la complexité des mécanismes cellulaires mis en jeu suite à une irradiation.

Nous avons montré que les neutrons rapides et les ions carbone sont plus efficaces que les rayons X en terme d'induction d'apoptose et de baisse de la survie clonogénique. L'étude des effets des radiations à TEL élevé a débuté il y a plusieurs années (Ijiri et Potten 1983, Hendry *et al.* 1982, Palayoor *et al.* 1993). Cependant, bien que quelques travaux ont montré que l'apoptose induite par les neutrons rapides était identique à celle induite par les photons (Vral *et al.* 1998, Warenius et Down 1995), la plupart des études démontre l'efficacité biologique supérieure des neutrons rapides et des ions carbone par rapport aux rayons X et confirment nos résultats (Goto *et al.* 2002, Wang *et al.* 2001, Fujikawa *et al.* 2000, Aoki *et al.* 2000). Nous pouvons ainsi conclure qu'il existe une dépendance entre le TEL et l'induction d'apoptose.

Par ailleurs, nos travaux démontrent clairement pour la première fois l'implication de p53 dans l'apoptose induite par les rayonnements à TEL élevé. D'autres équipes se sont penchées sur le rôle de p53 dans le déclenchement de l'apoptose suite à une irradiation par des neutrons rapides ou des ions carbone. Wang *et al.* ont montré que la quantité de p53 ne variait pas après exposition aux neutrons rapides (Wang *et al.* 2001). Les expériences réalisées par Iwadate *et al.* ont également indiqué que p53 n'intervient pas dans la cytotoxicité des ions carbone sur des cellules de glioblastome (Iwadate *et al.* 2001). Des résultats similaires ont été obtenus par Asakawa *et al.* (Asakawa *et al.* 2002). Ces données semblent contradictoires avec nos propres



résultats. Cependant, ces équipes ont utilisé pour leurs expériences des cellules exprimant une protéine p53 sauvage et des mutants p53 : aucune étude n'a été réalisée avec des cellules où p53 a été inactivé, ce qui nuance les conclusions de ces auteurs. Par ailleurs, Masunaga *et al.* ont montré que le statut p53 des cellules tumorales affecte la réponse cellulaire aux neutrons et confirment nos résultats (Masunaga *et al.* 2002).

Nous avons également mis en évidence des différences quantitatives et qualitatives dans le déroulement de l'apoptose induite par les neutrons rapides en fonction de p53. Ceci nous a permis d'établir un modèle de signalisation de l'apoptose induite par les neutrons rapides. Deux voies d'apoptose sont induites suite à l'exposition aux neutrons rapides : une voie précoce dépendante de p53, qui conduit au clivage de BID par la caspase-8 et fait intervenir la mitochondrie avec une diminution du potentiel mitochondrial et une libération du cytochrome c de la mitochondrie. Suite au relargage du cytochrome c, la caspase-9 est activée et résulte en l'activation des caspases-3 et -7. La deuxième voie apoptotique déclenchée par les neutrons rapides est indépendante de p53 et est caractérisée uniquement par l'activation des caspases-8 et -7, sans implication de la mitochondrie. Cependant, ce modèle reste incomplet. Il reste à déterminer les mécanismes à l'origine de l'activation de la caspase-8, initiatrice du processus apoptotique quel que soit le statut p53, ainsi que ceux responsables de l'activation de la caspase-7. L'analyse de l'expression des gènes après irradiation nous a permis d'orienter nos futures recherches vers la voie du TNF $\alpha$ , la voie des céramides, ou celle des MAPKinases. D'autres travaux seront nécessaires pour préciser si ce modèle s'applique également à d'autres types cellulaires. L'induction de l'apoptose par les ions carbone a aussi été étudiée. Même si les résultats concernant les voies de signalisation activées par ces ions lourds restent préliminaires, nous avons observé que l'activation de la caspase-3 dépendante de p53 semble être une particularité commune aux deux types de rayonnements à TEL élevé. Des expériences complémentaires permettront de déterminer plus en détail les caractéristiques de l'apoptose induite par les radiations à TEL élevé.

Cependant, nos résultats démontrent également que la réponse biologique aux radiations ionisantes ne doit pas être réduite à la seule induction d'apoptose. En effet, les tests de survie clonogénique ont montré que l'efficacité biologique relative (EBR) élevée des neutrons pourrait être due à une capacité accrue d'induction d'apoptose mais aussi à une mort clonogénique plus importante. De plus, l'inhibition de l'apoptose après irradiation (par inhibition des caspases de type caspase-3) induit une conversion vers une mort de type nécrose. Il faut donc tenir compte de cette mort clonogénique dans les effets de ces rayonnements à TEL élevé.

Récemment, plusieurs publications sont parues sur l'efficacité des ions lourds et des neutrons par rapport aux rayons X (Matsui *et al.* 2004, Holgersson *et al.* 2003, Persson *et al.* 2002). Nos travaux s'inscrivent dans cet intérêt récent pour l'étude des mécanismes d'induction de la mort cellulaire par ces radiations à TEL élevé. En effet, ces rayonnements sont de plus en plus utilisés dans les centres de radiothérapie et la construction de centres d'hadronthérapie est actuellement en projet dans plusieurs pays. L'élucidation des réponses cellulaires induites par ces rayonnements à TEL élevé dans des cellules tumorales humaines s'avère nécessaire pour moduler et ajuster l'utilisation de ce type de rayonnement en clinique. De plus, l'étude des effets des rayonnements à TEL élevé est aussi de première importance pour la recherche spatiale.

---

# *Références bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Vaganay S, Marangoni E, Vainchenker W, Bongrand P, Busson P, Bourhis J. *Int J Cancer*. 2000, 86 : 229-237. Radiation-induced expression of functional Fas ligand in EBV-positive human nasopharyngeal carcinoma cells.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. *Mol Cell*. 2002, 9 : 423-432. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. *Nature*. 1999, 399 : 809-813. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis.

Akakura K, Tsujii H, Morita S, Tsuji H, Yagishita T, Isaka S, Ito H, Akaza H, Hata M, Fujime M, Harada M, Shimazaki J. *Prostate*. 2004, 58 : 252-258. Phase I/II clinical trials of carbon ion therapy for prostate cancer.

Akyuz N, Boehden GS, Susse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH, Wiesmuller L. *Mol Cell Biol*. 2002, 22 : 6306-6317. DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair.

Albanese J, Dainiak N. *Exp Hematology*. 2003, 31 : 455-464. Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation.

Algeciras-Schimnich A, Peter ME. *FEBS Lett*. 2003, 546 : 185-188. Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells.

Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. *Mol Cell Biol*. 2002, 22 : 207-220. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95.

Alphonse G, Aloy MT, Broquet P, Gerard JP, Louisot P, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. *Int J Radiat Biol*. 2002, 78 : 821-835. Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells.

Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ Jr. *Radiat Res*. 2000, 154 : 342-346. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation.

Amundson SA, Bittner M, Chen Y, Trent J, Meltzer P, Fornace AJ Jr. *Oncogene*. 1999, 18 : 3666-3672. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses.

Andrieu-Abadie N, Gouaze V, Salvayre R, Levade T. *Free Radic Biol Med*. 2001, 31 : 717-728. Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress.

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. *Biochem J*. 2000, 345 : 271-278. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria.

Aoki M, Furusawa Y, Yamada T. *J Radiat Res*. 2000, 41 :163-175. LET dependency of heavy-ion induced apoptosis in V79 cells.

Appella E, Anderson CW. *Eur. J. Biochem*. 2001, 268 : 2764-2772. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses.

Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Poppelmann B, Luger TA, Schwarz T. *J Cell Biol*. 1998, 140 : 171-182. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L.

Aref A, Yudelev MS, Mohammad R, Choudhuri R, Orton C, Al-Katib A. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999, 45 :999-1003. Neutron and photon clonogenic survival curves of two chemotherapy resistant human intermediate-grade non-hodgkin lymphoma cell lines.

Asakawa I, Yoshimura H, Takahashi A, Ohnishi K, Nakagawa H, Ota I, Furusawa Y, Tamamoto T, Ohishi H, Ohnishi T. *Anticancer Res*. 2002, 22 : 2037-2043. Radiation-induced growth inhibition in transplanted human tongue carcinomas with different p53 gene status.

Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. *Oncogene*. 2003, 22 : 7050-7057. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect.

Baatout S, Derradji H, Petitfour O, Von Suchodoletz H, Mergeay M. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001, 80 : 629-637. Mécanismes de l'apoptose radio-induite.

Backus HH, Dukers DF, van Groeningen CJ, Vos W, Bloemena E, Wouters D, van Riel JM, Smid K, Giaccone G, Pinedo HM, Peters GJ. *Ann Oncol*. 2001, 12 : 209-216. 5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients.

Bae I, Smith ML, Sheikh MS, Zhan Q, Scudiero DA, Friend SH, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. *Cancer Res.* 1996, 56 : 840-847. An abnormality in the p53 pathway following gamma-irradiation in many wild-type p53 human melanoma lines.

Baggio L, Cavinato M, Cherubini R, Conzato M, Cucinotta F, Favaretto S, Gerardi S, Lora S, Stoppa P, Williams JR. *Radiat Prot Dosimetry.* 2002, 99 : 211-214. Relative biological effectiveness of light ions in human tumoural cell lines: role of protein p53.

Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. *Semin Immunol.* 2003, 15 : 185-193. The CD95 type I/type II model.

Battino M, Ferri E, Gattavecchia E, Breccia A, Genova ML, Littarru GP, Lenaz G. *Free Radiat Res.* 1997, 26 : 431-438. Mitochondrial respiratory chain features after gamma-irradiation.

Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K. *Oncogene.* 2000, 19 : 1181-1190. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis.

Belka C, Marini P, Lepple-Wienhues A, Budach W, Jekle A, Los M, Lang F, Schulze-Osthoff K, Gulbins E, Bamberg M. *Oncogene.* 1999, 18 : 4983-4392. The tyrosine kinase Ick is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation.

Belka, C., Marini, P., Budach, W., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Gulbins, E. and Bamberg, M. *Radiat. Res.* 1998, 149 : 588-595. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand.

Benderitter M, Vincent-Genod L, Pouget JP, Voisin P. *Radiat Res.* 2003, 159 : 471-483. The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation.

Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Muller S, Donner M, Voisin P. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999, 75 : 1043-1053. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure ?

Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. *Science.* 1998, 282 : 290-293. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis.

Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. *Mol Cell Biol.* 2004, 24 : 1341-1350. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members.

Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, O'Connor DJ, Zhong S, Campargue I, Tomlinson ML, Kuwabara PE, Lu X. *Nat Genet.* 2003, 33 :162-167. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. *Nat Rev Cancer.* 2004, 4 : 737-747. Radiation oncology: a century of achievements.

Blakely E, Kronenberg A. *Radiat Res* 1998, 150 (Suppl.) S126-S145. Heavy-ion radiobiology : new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness.

Boatright KM, Salvesen GS. *Curr Opin Cell Biol.* 2003, 15 : 725-731. Mechanisms of caspase activation.

Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. *J Biol Chem.* 1999, 274 : 14255-14261. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation.

Borges HL, Chao C, Xu Y, Linden R, Wang JY. *Cell Death Differ.* 2004, 11 : 494-502. Radiation-induced apoptosis in developing mouse retina exhibits dose-dependent requirement for ATM phosphorylation of p53.

Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. *Exp Hematol.* 2003, 31 : 446-454. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage.

Bouillet P, Strasser A. *J Cell Sci.* 2002, 115 : 1567-1574. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death.

Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. *Nature.* 2002, 415 : 922-926. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes.

Bourdon JC, Renzing J, Robertson PL, Fernandes KN, Lane DP. *J Cell Biol.* 2002, 158 : 235-246. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane.

Boyce M, Degterev A, Yuan J. *Cell Death Differ.* 2004, 11 : 29-37. Caspases: an ancient cellular sword of Damocles.

Brancolini C, Sgorbissa A, Schneider C. *Cell Death Differ.* 1998, 5 : 1042-1050. Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis.

Breteau N, Demasure M, Favre A, Leloup R, Lescrainier J, Sabattier R. *Bull Cancer Radiother.* 1996, 83 Suppl : 142s-145s. Fast neutron therapy for inoperable or recurrent sacrococcygeal chordomas.

Britten RA, Warenus HM, White R, Browning PG, Green JA. *Radiother Oncol.* 1990, 18 : 357-363. Melphalan resistant human ovarian tumour cells are cross-resistant to photons, but not to high LET neutrons.

Brown DA, London E. *J Biol Chem.* 2000, 275 :17221-17224. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.

Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P. *Science.* 1995, 269 : 1885-1888. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35.

Burns TF, El-Deiry WS. *Cancer Biol Ther.* 2003, 2 : 431-443. Microarray analysis of p53 target gene expression patterns in the spleen and thymus in response to ionizing radiation.

Burns TF, Bernhard EJ, El-Deiry WS. *Oncogene.* 2001, 20 : 4601-4612. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo.

Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. *Biochimie.* 2002, 84 : 215-222. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria.

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. *Science.* 1998, 281 : 1677-1679. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53.

Castro JR, Reimers MM. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988, 14 : 711-720. Charged particle radiotherapy of selected tumors in the head and neck.

Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 10815-10818. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver.



Chang DD, Park NH, Denny CT, Nelson SF, Pe M. *Oncogene*. 1998, 16 : 1921-1930. Characterization of transformation related genes in oral cancer cells.

Chao C, Saito S, Kang J, Anderson CW, Appella E, Xu Y. *EMBO J*. 2000, 19 : 4967-4975. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage.

Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Krett N, Halgren R, Rosen S, Kufe D, Kharbanda S, Anderson K. *J Biol Chem*. 1997, 272 : 29995-29997. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells.

Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. *Genes Dev*. 2000, 14 : 278-288. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53.

Chen H, Chung S, Sukumar S. *Mol Cell Biol*. 2004, 24 : 924-935. HOXA5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8.

Chen Q, Gong B, Almasan A. *Cell Death Differ*. 2000, 7 : 227-233. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. *Genes Dev*. 1996, 10 : 2438-2451. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. *Science*. 1997, 278 : 1966-1968. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases.

Cheng G, Cleary AM, Ye ZS, Hong DI, Lederman S, Baltimore D. *Science*. 1995, 267 : 1494-1498. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling.

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. *Nat Genet*. 1999, 21 : 15-19. Making and reading microarrays.

Chmura SJ, Nodzenski E, Kharbanda S, Pandey P, Quintans J, Kufe DW, Weichselbaum RR. *Mol Pharmacol*. 2000, 57 : 792-796. Down-regulation of ceramide production abrogates ionizing radiation-induced cytochrome c release and apoptosis.

Choi J, Donehower LA. *Cell Mol Life Sci*. 1999, 55 : 38-47. p53 in embryonic development: maintaining a fine balance.

Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer HL. *Mol Cell Biol.* 1994, 14 : 1997-2003. Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway.

Chuang YY, Chen Q, Brown JP, Sedivy JM, Liber HL. *Cancer Res.* 1999, 59 : 3073-3076. Radiation-induced mutations at the autosomal thymidine kinase locus are not elevated in p53-null cells.

Ciccolini J, Fina F, Bezulier K, Giacometti S, Roussel M, Evrard A, Cuq P, Romain S, Martin PM, Aubert C. *Mol Cancer Ther.* 2002, 1 : 923-937. Transmission of apoptosis in human colorectal tumor cells exposed to capecitabine, Xeloda, is mediated via Fas.

Cikala M, Wilm B, Homayer E, Bottger A, David CN. *Curr Biol.* 1999, 9 :959-962. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra.

Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V. *Biomed Pharmacoth.* 1998, 52 : 356-362. Neuronal death in the central nervous system during development.

Cohen O, Kimchi A. *Cell Death Differ.* 2001, 8 : 6-15. DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer.

Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A. *J Cell Biol.* 1999, 146 : 141-148. DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.

Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. *EMBO J.* 1997, 16 : 998-1008. DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity.

Cohen GM. *Biochem J.* 1997, 326 : 1-16. Caspases : the executioners of apoptosis.

Coelho D, Fischer B, Holl V, Dufour P, Denis JM, Guoulette J, Bergerat JP, Bischoff P. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002, 80 : 644-649. Induction of apoptosis by high linear energy transfer radiation: role of p53.

Coelho D, Fischer B, Holl V, Jung GM, Dufour P, Bergerat JP, Denis JM, Gueulette J, Bischoff P. *Radiat Res.* 2002, 157 : 446-452. Involvement of TP53 in apoptosis induced in human lymphoblastoid cells by fast neutrons.

Coelho D, Holl V, Weltin D, Lacornerie T, Magnenet P, Dufour P, Bischoff P. *Br J Cancer.* 2000, 83 : 642-649. Caspase-3-like activity determines the type of cell death following ionizing radiation in MOLT-4 human leukaemia cells.

Concin N, Stimpfl M, Zeillinger C, Wolff U, Hefler L, Sedlak J, Leodolter S, Zeillinger R. *Int J Oncol.* 2003, 22 : 51-57. Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines.

Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levrero M. *Mol Cell.* 2002, 9 : 175-186. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes.

Cory S, Huang DC, Adams JM. *Oncogene.* 2003, 22 : 8590-8607. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis.

Cory S, Adams JM. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2 : 647-656. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.

Cossarizza A, Baccarani Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993, 197 : 40-45. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. *Nature.* 2003, 424 : 952-956. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. *Biochimie.* 1999, 81 : 69-75. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair.

Darios F, Lambeng N, Troadec JD, Michel PP, Ruberg M. *J Neurochem.* 2003, 84 : 643-654. Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death.

Deb SP. *Front Biosci.* 2002, 7 : d235-d243. Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. *Oncogene.* 2003, 22 : 8543-8567. A decade of caspases.

de Jager M, Wyman C, van Gent DC, Kanaar R. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30 : 4425-4431. DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP.

Deng Y, Lin Y, Wu X. *Genes Dev.* 2002, 16 : 33-45. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO.

Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995, 33 : 781-796. Radiation-induced apoptosis : Relevance to radiotherapy.

Denis J-M, Bischoff P, Gueulette J. *Présentation par affiche lors du 6ème Colloque de Radiothérapie Fondamentale et Appliquée, Batz-sur-Mer (France).* 2003. Le Centre d'expérimentations Radiobiologiques auprès du Cyclotron de Louvain-la-Neuve : CERCYL.

Denis JM, Meulders JP, Lannoye E, Longree Y, Ryckewaert G, Richard F, Vynckier S, Wambersie A. *Bull Cancer Radiother.* 1996, 83 Suppl : 160-169. The multileaf collimator for fast neutron therapy at Louvain-la-Neuve.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. *Oncogene.* 2003, 22: 5885-5896. MAPK pathways in radiation responses.

DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. *Nat Genet.* 1996, 14 : 457-460. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer.

Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B. *Int J Radiat Biol.* 1998, 73 : 269-278. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.

Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher DE. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 38905-38911. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53.

Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. *J Biol Chem.* 1993, 268 : 15523-15530. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A.

Donehower LA. *Semin Cancer Biol.* 1996, 7 : 269-278. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies.

Douglas JD, Koh W-J, Austin-Seymour M, Laramore GE. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003, 129 : 944-948. Treatment of salivary gland neoplasms with fast neutron radiotherapy.

Droin NM, Green DR. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1644 : 179-188. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. *Cell.* 2000, 102 : 33-42. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.

- Duan H, Dixit VM. *Nature*. 1997, 385 : 86-89. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. *Nat Genet*. 1999, 21 : 10-14. Expression profiling using cDNA microarrays.
- Dunkern T, Roos W, Kaina B. *Mutat Res*. 2003, 544 : 167-172. Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related.
- Edwards GO, Botchway SW, Hirst G, Wharton CW, Chipman JK, Meldrum RA. *Br J Cancer*. 2004, 90 : 1450-1456. Gap junction communication dynamics and bystander effects from ultrasoft X-rays.
- Eguchi Y, Shimizu S and Tsujimoto Y. *Cancer Res*. 1997, 57 : 1835-1840. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis.
- Embree-Ku M, Venturini D, Boekelheide K. *Biol Reprod*. 2002, 66 : 1456-1461. Fas is involved in the p53-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. *Nature*. 1998, 391 : 43-50. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
- Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CG, Parolini I, Lotti F, Sette G, Peschle C, De Maria R. *Eur J Immunol*. 2004, 34 : 1930-1940. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells.
- Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM. *Mol Cell Biol*. 2004, 24 : 6728-6741. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. *Mol Cell Biol*. 2000, 20 : 929-935. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.
- Evan GI, Vousden KH. *Nature*. 2001, 411 : 342-348. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz Ra, Henson PM. *Nature*. 2000, 405: 85-90. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.

Faris M, Kokot N, Latinis K, Kasibhatla S, Green DR, Koretzky GA. *J Immunol.* 1998, 160 : 134-144. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating FAS ligand expression.

Fei P, El-Deiry WS. *Oncogene.* 2003, 22 : 5774-5783. P53 and radiation responses.

Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. *Cancer Res.* 2002, 62 : 7316-7327. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo.

Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D, Pessayre D. *Hepatology.* 2000, 31 : 674-683. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice.

Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FA, Giaccone G. *Cancer Res.* 2000, 60 : 7133-7141. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460.

Ferri KF, Kroemer G. *Nat Cell Biol.* 2001, 3 :E255-263. Organelle-specific initiation of cell death pathways.

Ferri KF, Kroemer G. *Nat Cell Biol.* 2000, 2 : E63-64. Control of apoptotic DNA degradation.

Fertil B, Deschavanne PJ, Gueulette J, Possoz A, Wamberssie A, Malaise EP. *Radiat Res.* 1982, 90 : 526-537. In vitro radiosensitivity of six human cell lines. II. Relation to the RBE of 50-MeV neutrons.

Fischer B, Coelho D, Dufour P, Bergerat JP, Denis JM, Gueulette J, Bischoff P. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 306 : 516-522. Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis.

Fischer B, Coelho D, Valenti L, Florentin I, Denis JM, Gueulette J, Dufour P, Bischoff P. *Anticancer Res.* 2003, 23 : 4601-4606. Carbon ions-induced apoptosis in hematopoietic tumor cell lines.

Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. *Biochimie.* 2002, 84 : 131-141. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling.

Follezou JY, Emerit J, Bricaire F. *Presse Med.* 1999, 28 : 1661-1666. Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis.

Ford BN, Wilkinson D, Thorleifson EM, Tracy BL. *Radiat Res.* 2001, 156 : 668-671. Gene expression responses in lymphoblastoid cells after radiation exposure.

Fournier C, Wiese C, Taucher-Scholz G. *Radiat Res.* 2004, 161 : 675-684. Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation.

Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. *Nat. Med.* 1996, 2 : 574-577. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells.

Fujikawa K, Hasegawa Y, Matsuzawa S, Fukunaga A, Itoh T, Kondo S. *J Radiat Res.* 2000, 41 :113-127. Dose and dose-rate effects of X rays and fission neutrons on lymphocyte apoptosis in p53(+ / +) and p53(- / -) mice.

Fulda S, Meyer E, Debatin KM. *Oncogene.* 2002, 21 : 2283-2294. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by BCL-2 overexpression.

Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. *Cell Death Differ.* 1998, 5 : 884-893. Activation of CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells.

Furusawa Y, Fukutsu K, Aoki M, Itsukaichi H, Eguchi-Kasai K, Ohara H, Yatagai F, Kanai T, Ando K. *Radiat Res.* 1998, 154 : 485-496. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)He-, (12)C- and (20)Ne-ion beams.

Gamen S, Anel A, Lasierra P, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ, Pineiro A, Naval J. *FEBS Lett.* 1997, 417 : 360-364. Doxorubicin-induced apoptosis in T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way.

Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N. *Exp Cell Res.* 2001, 265 : 145-151. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-dependent apoptosis.

Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 32608-32613. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors.

Garofalo T, Misasi R, Mattei V, Giammarioli AM, Malorni W, Pontieri GM, Pavan A, Sorice M. *J Biol Chem.* 2003, 278 : 8309-8315. Association of the death-inducing signaling complex with microdomains after triggering through CD95/Fas. Evidence for caspase-8-ganglioside interaction in T cells.

Giaccia AJ, Kastan MB. *Genes Dev.* 1998, 12 : 2973-2983. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals.

Gong B, Almasan A. *Cancer Res.* 2000, 60 : 5754-5760. Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells.

Gong B, Chen Q, Endlich B, Mazumder S, Almasan A. *Cell Growth Diff.* 1999, 10 : 491-502. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases.

Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nunez G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92 : 4304-4308. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death.

Goodhead DT. *J. Radiat. Res.* 1999, 40 : Suppl. 1-13. Mechanisms for the biological effectiveness of High LET radiations.

Goodhead DT. *Int J Radiat Biol.* 1994, 65 : 7-17. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA.

Goodhead DT. *Int J Radiat Biol.* 1989, 56 :623-634. The initial physical damage produced by ionizing radiations.

Goto S, Watanabe M, Yatagai F. *Radiat Res.* 2002, 158 : 678-686. Delayed cell cycle progression in human lymphoblastoid cells after exposure to high-LET radiation correlates with extremely localized DNA damage.

Grammer AC, Swantek JL, McFarland RD, Miura Y, Geppert T, Lipsky PE. *J Immunol.* 1998, 161 : 1183-1193. TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells.

Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E. *J Biol Chem.* 2001, 276 : 20589-20596. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts.

Green DR, Kroemer G. *Science.* 2004, 305 : 626-629. The pathophysiology of mitochondrial cell death.

Green LM, Murray DK, Bant AM, Kazarians G, Moyers MF, Nelson GA, Tran DT. *Radiat Res.* 2001, 155 : 32-42. Response of thyroid follicular cells to gamma irradiation compared to proton irradiation. I. Initial characterization of DNA damage, micronucleus formation, apoptosis, cell survival, and cell cycle phase redistribution.



Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Gross A. *J Biol Chem.* 2002, 277 :12237-12245. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis.

Gu J, Nie L, Wiederschain D, Yuan ZM. *Mol Cell Biol.* 2001, 21 : 8533-8546. Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export.

Guan B, Yue P, Clayman GL, Sun SY. *J Cell Physiol.* 2001, 188 : 98-105. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene.

Gueulette J. *Symposium: Update problems of neutron and neutron therapy 1997*, Radiobiological characteristics of fast neutrons and rationale of their use in radiation therapy.

Gurtu V, Kain SR, Zhang G. *Anal Biochem.* 1997, 251 : 98-102. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis.

Ha HC, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96 : 13978-13982. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion.

Haber JE. *Trends Genet.* 2000, 16 : 259-264. Partners and pathways repairing a double-strand break.

Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. *J Exp Med.* 1994, 180 : 525-535. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis.

Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. *Cancer Res.* 1994, 54 : 2095-2097 Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells.

Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist, Second Edition.* 1978 par Harper & Row Publishers, Inc.

Hamer G, Gademan IS, Kal HB, de Rooij DG. *Oncogene.* 2001, 20 : 4298-4304. Role for c-Abl and p73 in the radiation response of male germ cells.

Hanna E, Shrieve DC, Ratanatharathorn V, Xia X, Breau R, Suen J, Li S. *Cancer Res.* 2001, 61 : 2376-2380. A novel alternative approach for prediction of radiation response of squamous cell carcinoma of head and neck.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. *J Cell Science.* 2003, 116 : 4077-4085. Apoptosis-the p53 network.

Haupt Y, Maya R, Kaza A, Oren M. *Nature*. 1997, 387 : 296-299. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.

Haynes AP, Daniels I, Abhulayha AM, Carter GI, Metheringham R, Gregory CD, Thomson BJ. *Br J Haematol*. 2002, 118 : 488-494. CD95 (Fas) expression is regulated by sequestration in the Golgi complex in B-cell lymphoma.

Heeg P, Eickhoff H, Haberer T. *Z Med Phys*. 2004, 14 : 17-24. Conception of heavy ion beam therapy at Heidelberg University (HICAT).

Hei TK, Zhao YL, Roy D, Piao CQ, Calaf G, Hall EJ. *Adv Space Res*. 2001, 27 : 411-419. Molecular alterations in tumorigenic human bronchial and breast epithelial cells induced by high LET radiation.

Heilmann J, Taucher-Scholz G, Kraft G. *Int J Radiat Biol*. 1995, 68 : 153-162. Induction of DNA double-strand breaks in CHO-K1 cells by carbon ions.

Heinloth AN, Shackelford RE, Innes CL, Bennett L, Li L, Amin RP, Sieber SO, Flores KG, Bushel PR, Paules RS. *Mol Carcinog*. 2003, 37 : 65-82. Identification of distinct and common gene expression changes after oxidative stress and gamma and ultraviolet radiation.

Held J, Schulze-Osthoff K. *Drug Resist Updat*. 2001, 4 : 243-252. Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy.

Held KD. *Apoptosis* 1997, 2 : 265-282. Radiation-induced apoptosis and its relationship to loss of clonogenic survival.

Hendry JH. *Radiat Res*. 1991, 128 (Suppl) : S111-113. The slower cellular recovery after higher-LET irradiations, including neutrons, focuses on the quality of DNA breaks.

Hendry JH, Potten CS, Chadwick C, Bianchi M. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1982, 42 :611-620. Cell death (apoptosis) in the mouse small intestine after low doses : effects of dose-rate, 14,7 MeV neutrons, and 600 MeV (maximum energy) neutrons.

Hentgartner MO. *Nature*. 2000, 407 : 770-776. The biochemistry of apoptosis.

Hengartner MO, Horvitz HR. (a) *Curr Opin Genet Dev*. 1994, 4 : 581-586. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*.

Hengartner MO, Horvitz HR. (b) *Cell*. 1994, 76 : 665-676. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. *Mol Cell*. 1997, 1 : 3-11. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression.

Hickman AW, Jaramillo RJ, Lechner JF, Johnson NF. *Cancer Res*. 1994, 54 : 5797-5800. Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain.

Hill MM, Adrain C, Martin SJ. *Mol Interv*. 2003, 3 : 19-26. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows.

Hinata N, Shirakawa T, Zhang Z, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Gotoh A. *Urol Res*. 2003, 31 : 387-396. Radiation induces p53-dependent cell apoptosis in bladder cancer cells with wild-type- p53 but not in p53-mutated bladder cancer cells.

Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD, Seybold J, Krull M, Preissner K, Eichel-Streiber CV, Suttrop N. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002, 283 : L830-838. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells.

Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. *Cancer Res*. 2001, 61 : 8601-8610. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter ?

Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. *J Biol Chem*. 2002, 277 : 3247-3257. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53.

Hoglund E, Blomquist E, Carlsson J, Stenerlow B. *Int J Radiat Biol*. 2000, 76 : 539-547. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation.

Holgerson A, Jernberg AR, Persson LM, Edgren MR, Lewensohn R, Nilsson A, Brahme A, Meijer AE. *Int J Radiat Biol*. 2003, 79 : 611-621. Low and high LET radiation-induced apoptosis in M059J and M059K cells.

Holl V, Coelho D, Weltin D, Dufour P, Denis JM, Florentin I, Mathieu J, Gueulette J, Bischoff P. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001, 79 : 109-113. Induction of apoptosis of splenic lymphocytes in mice by accelerated carbon ions.

Holl V, Coelho D, Weltin D, Dufour P, Gueulette J, Bischoff P. *Radiat Res*. 2000, 154 : 301-306. Ex vivo determination of the effect of whole-body exposure to fast neutrons on murine spleen cell viability and apoptosis.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *Science*. 1991, 253 : 49-53. p53 mutations in human cancers.

Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94 : 12401-12406. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members.

Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. *EMBO J*. 1999, 18 : 3586-3595. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis.

Huang HL, Fang LW, Lu SP, Chou CK, Luh TY, Lai MZ. *Oncogene*. 2003, 22 : 8168-8177. DNA damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation.

Huang C, Li J, Zheng R, Cui K. *Mol Biol Rep*. 2000, 27 : 1-11. Hydrogen peroxide - induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of p53.

Hulboy DL, Lozano G. *Cell Growth Differ*. 1994, 5 : 1023-1031. Structural and functional analysis of p53: the acidic activation domain has transforming capability.

Hwang PM, Bunz F, Yu J, Rago C, Chan TA, Murphy MP, Kelso GF, Smith RA, Kinzler KW, Vogelstein B. *Nat Med*. 2001, 7 : 1111-1117. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells.

Ichas F, Mazat JP. *Biochem Biophys Acta*. 1998, 1366 : 33-55. From calcium signaling to cell death: Two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state.

Igney FH, Krammer PH. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2 : 277-288. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.

Ihrie RA, Reczek E, Horner JS, Khachatryan L, Sage J, Jacks T, Attardi LD. *Curr Biol*. 2003, 13 : 1985-1990. Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types.

Ijiri K, Potten CS. *Br J Cancer*. 1983, 47 : 175-185. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation.

Iliakis GE, Okayasu R. *Int J Radiat Biol.* 1990, 57 : 1195-1211. Radiosensitivity throughout the cell cycle and repair of potentially lethal damage and DNA double-strand breaks in an X-ray-sensitive CHO mutant.

Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 : 7975-7981. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein.

Inagaki-Ohara K, Yada S, Takamura N, Reaves M, Yu X, Liu E, Rooney I, Nicholas S, Castro A, Ware CF, Green DR, Lin T. *Oncogene.* 2001, 20 : 812-818. p53-dependent radiation-induced crypt intestinal epithelial cells apoptosis is mediated in part through TNF-TNFR1 system.

Innocente SA, Abrahamson JLA, Cogswell JP, Lee JM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96 : 2147-2152. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. *Cell.* 1991, 66 :233-243. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.

Iwadate Y, Mizoe J-E, Osaka Y, Yamaura A, Tsujii H. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001, 50 :803-808. High linear transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53.

Jackson SP. *Carcinogenesis* 2002, 23 : 687-696. Sensing and repairing DNA double-strand breaks.

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. *Science.* 1995, 267 : 1498-1502. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms.

Jenner TJ, Cunniffe SM, Stevens DL, O'Neill P. *Radiat Res.* 1998, 150 : 593-599. Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation.

Jiang YL, Escano MF, Sasaki R, Fujii S, Kusuhara S, Matsumoto A, Sugimura K, Negi A. *Jpn J Ophthalmol.* 2004, 48 : 106-114. Ionizing radiation induces a p53-dependent apoptotic mechanism in ARPE-19 cells.

Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 30256-30263. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells.

Johnston CJ, Williams JP, Elder A, Hernady E, Finkelstein JN. *Exp Lung Res.* 2004, 30 : 369-382. Inflammatory cell recruitment following thoracic irradiation.

Jones DT, Ganeshaguru K, Virchis AE, Folarin NI, Lowdell MW, Mehta AB, Prentice HG, Hoffbrand, A.V. and Wickremasinghe, R.G. *Blood.* 2001, 98 : 2800-2807. Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation.

Joseph B, Ekedahl J, Lewensohn R, Marchetti P, Formstecher P, Zhivotovsky B. *Oncogene.* 2001, 20 : 2877-2888. Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. *Curr Biol.* 1998, 8 : 1001-1008. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95 : 4997-5002. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria.

Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M. *Oncogene.* 1993, 8 : 3411-3416. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene.

Kang CM, Park KP, Song JE, Jeoung DI, Cho CK, Kim TH, Bae S, Lee SJ, Lee YS. *Radiat Res.* 2003, 159 : 312-319. Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes.

Kaptein A, Jansen M, Dilaver G, Kitson J, Dash L, Wang E, Owen MJ, Bodmer JL, Tschopp J, Farrow SN. *FEBS Lett.* 2000, 485 : 135-141. Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3).

Katz R, Cucinotta FA. *Radiat Meas.* 1999, 31 : 379-388. Tracks to therapy.

Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen YN, Campbell A, Sudha T, Yuan ZM, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 322-327. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage.

Kemp LM, Jeggo PA. *Mutat. Res.* 1986, 166 : 255-263. Radiation-induced chromosome damage in X-ray-sensitive mutants (xrs) of the Chinese hamster cell line.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. *Br J Cancer.* 1972, 26 : 239-257. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. *PNAS*. 1999, 96 : 14973-14977. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage

Kim K, Takimoto R, Dicker DT, Chen Y, Gazitt Y, El-Deiry WS. *Int J Oncol*. 2001, 18 : 241-247. Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not normal cell lines.

Kim HE , Krug MA, Han I, Ensley J, Yoo GH, Forman JD, Kim HR. *Clin Cancer Res*. 2000, 6 : 4142-4147. Neutron radiation enhances cisplatin cytotoxicity independently of apoptosis in human head and neck carcinoma cells.

Kim TH (b), Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. *J Biol Chem*. 2000, 275 : 39474-39481. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax.

Kimura K, Gelman EP. *J Biol Chem*. 2000, 275 : 8610-8617. Tumor necrosis factor-alpha and Fas activate complementary Fas-associated death domain- dependent pathways that enhance apoptosis induced by gamma-irradiation.

Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y. *Neoplasia*. 2002, 4 : 295-303. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. *Science*. 1995, 270 : 96-99. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death.

Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 285 : 1150-1154. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. *Cell Death Differ*. 2000, 7 : 1166-1173. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. *Science*. 1997, 278 : 294-298. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.

Kraft G. *Tumori*. 1998, 84 :200-204. Radiotherapy with heavy ions : Radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt.

Kraxenberger F, Weber KJ, Friedl AA, Eckardt-Schupp F., Flentje M, Quicken P, Kellerer AM. *Radiat. Environ. Biophys.* 1998, 37 : 107-115. DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to  $\gamma$ -rays and very heavy ions.

Krammer PH. *Nature.* 2000, 407 : 789-795. CD95's deadly mission in the immune system.

Kuo SS, Saad AH, Koong AC, Hahn GM, Giaccia AJ. *Proc Natl Acad Sci* 1993, 90: 908-912. Potassium-channel activation in response to low doses of gamma-irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells.

Kurz EU, Lees-Miller SP. *DNA Repair (Amst).* 2004, 3 :889-900. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways.

Kysela BP, Arrand JE, Michael BD. *Int J Radiat Biol.* 1993, 64 :531-538. Relative contributions of levels of initial damage and repair of double-strand breaks to the ionizing radiation-sensitive phenotype of the Chinese hamster cell mutant, XR-V15B. Part II. Neutrons.

Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P. *Cell Death Differ.* 2004, 11 : 365-368. Caspase-12 : an overview.

LaVerne JA. *Radiat. Res.* 2000, 153 : 196-200. OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water.

Lee SH, Kim CH. *Mol Cell.* 2002, 13 : 159-166. DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint.

Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, Hendrickson EA. *Mol Cell Biol.* 1997, 17 : 1425-1433. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S and Nicotera P. *J Exp Med.* 1997, 185 : 1481-1486. Intracellular Adenosine triphosphate concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.

Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. *Cell Prolif.* 1991, 24 : 203-214. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli.

Li LY, Luo X, Wang X. *Nature.* 2001, 412 : 95-99. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria.



Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. *EMBO J.* 1999, 18: 6027-6036. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. *Cell.* 1998, 94 : 491-501. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. *Cell.* 1997, 91 : 479-489. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. *Nature.* 1994, 371 : 534-537. Differential effects of p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair.

Liang Y, Yan C, Schor NF. *Oncogene.* 2001, 20 : 6570-6578. Apoptosis in the absence of caspase 3.

Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Tang MJ, Chang WC, Lin YS. *J Biol Chem.* 2004, 279 : 40755-40761. Sequential Caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis.

Lin AW, Lowe SW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98 : 5025-5030. Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation.

Lin Y, Ma W, Benchimol S. *Nat Genet.* 2000, 26 : 122-127. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis.

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. *Oncogene.* 2003, 22 : 8568-8580. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2.

Little JB. *Carcinogenesis* 2000, 21 : 397-404. Radiation carcinogenesis.

Liu FT, Newland AC, Jia L. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310 : 956-962. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia.

Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL. *Mol Cell Biol.* 1999, 19 : 1202-1209. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. *Cell.* 1997, 89 : 175-184. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.

Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B. *Int J Radiat Biol.* 1996, 70 : 493-503. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation.

Lockshin RA, Zakeri Z. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, 2 : 545-550. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory.

Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. *Nature.* 1993, 362 : 847-849. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes.

Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101 : 2259-2264. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both *in vitro* and *in vivo*.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. *Cell.* 1998, 94 : 481-490. Bid, a bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. Apoptosis. 2003, 8 :115-128. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update.

Lyons AB. *J Immunol Meth.* 2000. 243 : 147-154. Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution.

Magee TR, Qian A, Rajfer J, Sander FC, Levine LA, Gonzalez-Cadavid NF. *Urology.* 2002, 59 : 451-457. Gene expression profiles in the Peyronie's disease plaque.

Mallya SM, Sikpi MO. *Int J Radiat Biol.* 1998, 74 : 231-238. Evidence of the involvement of p53 in gamma-radiation-induced DNA repair in human lymphoblasts.

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 16202-16212. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling.

Marshall A, Hodgson J. *Nat Biotechnol* 1998, 16 : 27-31. DNA chips: an array of possibilities.

Marshman E, Ottewell PD, Potten CS, Watson AJM. *J Pathol.* 2001, 195 : 285-292. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine.

Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. *J Biol Chem.* 1996, 271 :28753-28756. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. *J Exp Med.* 1998, 187 : 1261-1271. The permeability transition pore complex : a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins.

Masunaga S, Ono K, Takahashi A, Sakurai Y, Ohnishi K, Kobayashi T, Kinashi Y, Takagaki M, Ohnishi T. *Jpn J Cancer Res.* 2002, 93 : 1366-1377. Impact of the p53 status of the tumor cells on the effect of reactor neutron beam irradiation, with emphasis on the response of intratumor quiescent cells.

Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y, Arakawa H. *Cancer Res.* 2002, 62 : 2883-2889. p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway.

Matsui Y, Asano T, Kenmochi T, Iwakawa M, Imai T, Ochiai T. *Am J Clin Oncol.* 2004, 27 : 24-28. Effects of carbon-ion beams on human pancreatic cancer cell lines that differ in genetic status.

Mattson MP. *Nature.* 2004, 430 : 631-639. Pathways towards and away from Alzheimer's disease.

McBride WH, Chiang CS, Olson JL, Wang CC, Hong JH, Pajonk F, Dougherty GJ, Iwamoto KS, Pervan M, Liao YP. *Radiat Res.* 2004, 162 : 1-19. A sense of danger from radiation.

McCarthy NJ, Whyte MKB, Gilbert CS and Evan GI. *J Cell Biol.* 1997, 136 : 215-227. Inhibition of Ced-3/ICE related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak.

McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. *Genes Dev.* 2000, 14 : 549-558. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes.

Meijer AE, Kronqvist USE, Lewensohn R, Harms-Ringdahl M. *Int J Radiat Biol.* 1998, 73 : 169-177. RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed *in vitro* to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions.

Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH. *Biol Chem.* 2004, 279 : 8076-8083. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation.

Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, Hall PA. *Cancer Res.* 1994, 54 : 614-617. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice.

Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P. *J Biol Chem.* 2003, 278 : 5367-5376. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release.

Mikolajczyk J, Scott FL, Krajewski S, Sutherlin DP, Salvesen GS. *Biochemistry.* 2004, 43 : 10560-10569. Activation and substrate specificity of caspase-14.

Mitchell SA, Randers-Pehrson G, Brenner DJ, Hall EJ. *Radiat Res.* 2004, 161 : 397-401. The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact.

Mitra AK, Sarma A, Krishna M, Verma NC. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2004, 23 : 53-59. Expression of NF-kappaB and ERK following heavy ion irradiation.

Miyashita T, Reed JC. *Cell.* 1995, 80 : 293-299. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. *Oncogene.* 1994, 9 : 1799-805. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.

Muller BT, Modlich O, Prisack HB, Bojar H, Schipke JD, Goecke T, Feindt P, Petzold T, Gams E, Muller W, Hort W, Sandmann W. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002, 24 : 356-364. Gene expression profiles in the acutely dissected human aorta.

Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. *J Exp Med.* 1998, 188 : 2033-2045. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.

Muppidi JR, Siegel RM. *Nat Immunol.* 2004, 5 : 182-189. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death.

Murakami T, Fujimoto M, Ohtsuki M, Nakagawa H. *J Dermatol Sci.* 2001, 27 : 121-129. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation.

Murphy M, Hinman A, Levine AJ. *Genes Dev.* 1996, 10 : 2971-2980. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein.

Murray D, Mirzayans R, Scott AL, Allalunis-Turner MJ. *Am J Clin Oncol.* 2003, 26 : e169-177. Influence of oxygen on the radiosensitivity of human glioma cell lines.

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

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 2926-2930. An induced proximity model for caspase-8 activation.

Nakano K, Vousden KH. *Mol Cell.* 2001, 7 : 683-694. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53.

Nakano H, Kohara M, Shinohara K. *Cell Tissue Res.* 2001, 306 : 101-106. Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels.

Nakano H, Shinohara K. *Radiat Res.* 1994, 140 :1-9. X-ray-induced cell death: apoptosis and necrosis.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. *J Cell Biol.* 2001, 153 : 1265-1276. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis.

Newton K, Strasser A. *J Exp Med.* 2000, 191 : 195-200. Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. *J Immunol Methods.* 1991, 139 : 271-279. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.

NIRS (National Institute of Radiological Sciences), Overview of the National Institute of Radiological Sciences, An Independent Administrative Institution, Chiba, Japon, brochure explicative.

Nishikawa A, Hayashi H. *Differentiation.* 1995, 59 :207-214. Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*.

Noel G, Feuvret L, Ferrand R, Mazon JJ. *Cancer Radiother.* 2003, 7 :340-352. Treatment with neutrons: hadrontherapy part II: physical basis and clinical experience.

Norbury CJ, Zhitovskiy B. *Oncogene.* 2004, 23 : 2797-2808. DNA damage-induced apoptosis.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. *Science*. 2000, 288 :1053-1058. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.

Oda K (b), Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. *Cell*. 2000, 102 : 849-862. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53.

Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, Milyavsky M, Goldfinger N, Rotter V. *Carcinogenesis*. 2002, 23 : 1025-1032. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA.

Offer H, Wolkowicz R, Matas D, Blumenstein S, Livneh Z, Rotter V. *FEBS Lett*. 1999, 450 : 197-204. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery.

Ogawa Y, Nishioka A, Kobayashi T, Kariya S, Hamasato S, Saibara T, Nakayama K, Seguchi H, Yoshida S. *Int J Mol Med*. 2002, 10 : 263-268. Mitochondrial cytochrome c release in radiation-induced apoptosis of human peripheral T cells.

Ogawa Y, Nishioka A, Inomata T, Kataoka S, Nakayama K, Kariya S, Terashima M, Kubonishi I, Yoshida S. *Int J Mol Med*. 2000, 5 : 139-143. Ionizing radiation-induced apoptosis in human lymphoma cell lines differing in p53 status.

Ogawa Y, Nishioka A, Inomata T, Yoshida S, Nakayama KI, Kataoka S. *Int J Mol Med*. 1998, 2 : 403-408. Radiation kills human peripheral T cells by a Fas-independent mechanism.

Orecchia R, Krengli M, Jerezek-Fossa BA, Franzetti S, Gerard JP. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004, 51 : 81-90. Clinical and research validity of hadrontherapy with ion beams.

Orecchia R, Zurlo A, Loasses A, Krengli M, Tosi G, Zurrada S, Zucali P, Veronesi U. *Eur J Cancer*. 1998, 34 : 459-468. Particle beam therapy (Hadrontherapy) : Basis for interest and clinical experience.

Oren M. *Cell Death Diff*. 2003, 10 : 431-442. Decision making by p53 : life, death and cancer.

Orlowsky A, Weiss LM, Kawachi N, Prystowsky MB. *J Immunol*. 2002, 168 : 1840-1846. Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response.

Orrenius S. *Toxicol Lett.* 2004, 149 : 19-23. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death.

O'Sullivan B, Levin W. *Semin Radiat Oncol.* 2003, 13 : 274-289. Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management.

Owen-Schaub, L.B., Zhang , W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M ., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang , W .W., Kruzel, E. and Radinsky, R. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15 : 3032-3040. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.

Ozoren N, El-Deiry WS. *Neoplasia.* 2002, 4 : 551-557. Defining characteristics of types I and II apoptotic cells in response to TRAIL.

Palayoor ST, Humm JL, Atcher RW, Hines JJ, Macklis RM. *Nucl Med Biol.* 1993, 20 : 795-805. G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to 212Bi alpha particle irradiation.

Park WY, Hwang CI, Im CN, Kang MJ, Woo JH, Kim JH, Kim YS, Kim JH, Kim H, Kim KA, Yu HJ, Lee SJ, Lee YS, Seo JS. *Oncogene.* 2002, 21 : 8521-8528. Identification of radiation-specific responses from gene expression profile.

Passalaris TM, Benanti JA, Gewin L, Kiyono T, Galloway DA. *Mol Cell Biol.* 1999, 19 : 5872-5881. The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways.

Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. *Int J Radiat Biol.* 2001, 77 : 1007-1021. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome.

Pawlik TM, Keyomarsi K. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, 59: 928-942. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy.

Pelled D, Raveh T, Riebeling C, Fridkin M, Berissi H, Futerman AH, Kimchi A. *J Biol Chem.* 2002, 277 : 1957-1961. Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons.

Pena LA, Fuks A, Kolesnick R. *Biochem Pharmacol.* 1997, 53 : 615-621. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway.

Persson LM, Edgren MR, Stenerlow B, Lind BK, Hedlof I, Jernberg AR, Meijer AE, Brahme A. *Int J Radiat Biol.* 2002, 78 :743-748. Relative biological effectiveness of boron ions on human melanoma cells.

Peter ME, Krammer PH. *Curr Opin Immunol*. 1998, 10 : 545-551. Mechanismes of CD95 (APO/Fas)-mediated apoptosis.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1644 : 83-94. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.

Pham NA, Hedley DW. *Exp Cell Res*. 2001, 264 : 345-352. Respiratory chain-generated oxidative stress following treatment of leukemic blasts with DNA-damaging agents.

Pinto M, Prise KM, Michael BD. *Radiat Prot Dosimetry*. 2002, 99 : 133-136. Double strand break rejoining after irradiation of human fibroblasts with X rays or alpha particles: PFGE studies and numerical models.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. *Nature*. 1997, 389 : 300-305. A model for p53-induced apoptosis.

Pommier P, Balosso J, Bolla M, Gérard JP. *Cancer Radiother*. 2002, 6 : 369-378. Le projet français ÉTOILE : données médicales actuelles de l'hadronthérapie par ions légers.

Pouget JP, Frelon S, Ravanat JL, Testard I, Odin F, Cadet J. *Radiat Res*. 2002, 157 : 589-595. Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles.

Pouget JP, Mather SJ. *Eur. J. Nucl. Med*. 2001, 28 : 541-561. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation.

Prise KM, Folkard M, Davies S, Michael BD. *Int J Radiat Biol*. 1990, 58 : 261-277. The irradiation of V79 mammalian cells by protons with energies below 2 MeV. Part II. Measurement of oxygen enhancement ratios and DNA damage.

Prishchep SG, Gerasimovich NV, Milyutin AA. *Radiat Prot Dosimetry*. 2002, 99 : 173-174. The effect of low doses of gamma irradiation on the homeostasis of intracellular calcium in lymphocyte cells of rats.

Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fischer DE, Glanzmann C, Bodis S. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001, 49 : 561-567. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis : the role of p53 and caspases.

Purring-Koch C, McLendon G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97 : 11928-11931. Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. *Mol Cell*. 1999, 3 : 287-296.



The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.

Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997, 272 : 21388-21395.

Radford IR. *Int J Radiat Biol* 2002, 78 : 457-466. DNA lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation.

Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. *Int J Radiat Biol.* 1994, 65 : 217-227. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined.

Radulescu I, Elmroth K, Stenerlow B. *Radiat Res.* 2004, 16 : 1-8. Chromatin organization contributes to non-randomly distributed double-strand breaks after exposure to high-LET radiation.

Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. *Nat Immunol.* 2002, 3 : 932-939. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis.

Reed JC. *J Clin Oncol.* 1999, 17 : 2941-2953. Dysregulation of apoptosis in cancer.

Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98 : 14250-14255. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9.

Riedl SJ, Renatus M, Snipas SJ, Salvesen GS. *Biochemistry.* 2001, 40 : 13274-13280. Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35.

Ristic D, Modesti M, Kanaar R, Wyman C. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31 : 5229-5237. Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair.

Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. *Cancer Res.* 2001, 61 : 6660-6664. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis.

Rodicker F, Putzer BM. *Cancer Res.* 2003, 63 : 2737-2741. p73 is effective in p53-null pancreatic cancer cells resistant to wild-type TP53 gene replacement.

Rodriguez J, Lazebnik Y. *Genes Dev.* 1999, 13 : 3179-3184. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V. *Apoptosis.* 2001, 6 :103-116. Apoptosis in AIDS.

Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, MacGregor GR. *Nat Genet.* 1998, 18 : 251-256. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice.

Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM. *J Biol Chem.* 2004, 279 :13575-13583. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels.

Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC. *Biochem J.* 2002, 368 : 915-921. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein.

Roy D, Calaf G, Hei TK. *Mol Carcinog.* 2001, 31 : 192-203. Profiling of differentially expressed genes induced by high linear energy transfer radiation in breast epithelial cells.

Rubin DB, Drab EA, Bauer KD. *J Appl Physiol.* 1989, 67 : 1585-1590. Endothelial cell subpopulations in vitro: cell volume, cell cycle, and radiosensitivity.

Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC. *EMBO J.* 2002, 21 : 1967-1977. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation.

Ruvolo PP. *Pharmacol Res.* 2003, 47 : 383-392. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites.

Rydberg B, Heilbronn L, Holley WR, Loblrich M, Zeitlin C, Chatterjee A, Cooper PK. *Radiat Res.* 2002, 158 : 32-42. Spatial distribution and yield of DNA double-strand breaks induced by 3-7 MeV helium ions in human fibroblasts.

Sabatier L, Al Achkar W, Hoffschir F, Luccioni C, Dutrillaux B. *Mutat Res.* 1987, 178 : 91-97. Qualitative study of chromosomal lesions induced by neutrons and neon ions in human lymphocytes at G0 phase.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. *Am J Med.* 1999, 107 : 489-506. Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease.

Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. *Nat Cell Biol.* 2000, 2 : 553-555. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes.

Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 9278-9283. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E. *Genes Dev.* 1998, 12 : 2831-2841. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. *Nature.* 1998, 391 : 96-99. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.

Sakamuro D, Prendergast GC. *Oncogene.* 1999, 18 : 2942-2954. New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges.

Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. *J Biol Chem.* 1999, 274 : 17941-17945. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation.

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X. *Mol Cell.* 2001, 8 : 781-794. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53.

Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. *Cell.* 1996, 86 : 189-199. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis.

Sasaki H, Yatagai F, Kanai T, Furusawa Y, Hanaoka F, Zhu WG, Mehnati P. *Radiat Res.* 1997, 148 : 449-454. Dependence of induction of interphase death of Chinese hamster ovary cells exposed to accelerated heavy ions on linear energy transfer.

Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001, 27 : 257-274. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis : a review of the evidence.

Sawada M, Kiyono T, Nakashima S, Shinoda J, Naganawa T, Hara S, Iwama T, Sakai N. *Cell Death Differ.* 2004, 11 : 997-1008. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced ceramide formation in human glioma cells: P53-mediated oxidant stress-dependent and -independent pathways.

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. *Nature Cell Biol.* 2002, 4 : 842-849. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity.

Scalliet PG, Remouchamps V, Lhoas F, Van Glabbeke M, Curran D, Ledent T, Wambersie A, Richard F, Van Cangh P. *Cancer Radiother.* 2001, 5 : 262-272. A retrospective analysis of the results of p(65) + Be neutrontherapy for the treatment of prostate adenocarcinoma at the cyclotron of Louvain-la-Neuve. Part I: Survival and progression-free survival.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME. *EMBO J.* 1998, 17 : 1675-1687. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.

Schaefer A, Huttermann J, Kraft G. *Adv Space Res.* 1992, 12 : 45-49. Direct radiation action of heavy ions on DNA as studied by ESR-spectroscopy.

Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord JM. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 , 297 : 876-879. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis.

Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL, Reed JC. *J Biol Chem.* 1999, 274 : 21932-21936. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID.

Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 7337-7342. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release.

Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, Haberer T, Jakel O, Karger C, Kraft G, Wannemacher M, Debus J. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004, 58 : 631-640. Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients.

Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, Nap M, Bjorklund V, Bjorklund P, Bjorklund B, Lane EB, Omary MB, Jornvall H, Ramaekers FC. *Exp Cell Res.* 2004, 297 : 11-26. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis.

Schwarz R, Krull A, Baumann M, Zornig C, Wiegel T, Weh HJ. *Strahlenther Onkol.* 1996, 172 :64-73. Results of radiotherapy in recurrences of soft tissue sarcomas.

Sehgal A, Boynton AL, Young RF, Vermeulen SS, Yonemura KS, Kohler EP, Aldape HC, Simrell CR, Murphy GP. *J Surg Oncol.* 1998, 67 : 234-241. Application of the differential hybridization of Atlas Human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue.

Seo YW, Shin JN, Ko KH, Cha JH, Park JY, Lee BR, Yun CW, Kim YM, Seol DW, Kim DW, Yin XM, Kim TH. *J Biol Chem.* 2003, 278 : 48292-48299. The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death.

Semont A, Nowak EB, Silva Lages C, Mathieu C, Mouthon MA, May E, Allemand I, Millet P, Boussin FD. *Oncogene.* 2004. Involvement of p53 and Fas/CD95 in murine neural progenitor cell response to ionizing irradiation.

Sheard MA, Uldrijan S, Vojtesek B. *Cancer Res.* 2003, 63 : 7176-7184. Role of p53 in regulating constitutive and X-radiation-inducible CD95 expression and function in carcinoma cells.

Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J. *Int J Cancer.* 1997, 73 : 757-762. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53wild-type cancer cells treated with ionizing radiation.

Sherr CJ, Roberts JM. *Genes Dev.* 1999, 13 : 1501-1512. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.

Shi J, Zheng D, Man K, Fan ST, Xu R. *Curr Mol Med.* 2003, 3 : 727-736. TRAIL: a potential agent for cancer therapy.

Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N. *Genes Dev.* 2003, 17 : 2233-2238. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. *Cell.* 1997, 91 : 325-334. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.

Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB. *Mol Cell.* 1999, 4 : 365-376. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response.

Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. *J Biol Chem.* 2000, 275 : 12321-12325. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c.

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. *Oncogene.* 2004, 23 : 2809-2818. To die or not to die: how does p53 decide?

Smith LE, Nagar S, Kim GJ, Morgan WF. *Health Phys.* 2003, 85 : 23-29. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response.

Soldani C, Scovassi AI. *Apoptosis.* 2002, 7 : 321-328. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update.

Somasundaram K, El-Deiry WS. *Front Biosci.* 2000, 5 : D424-D437. Tumor suppressor p53: regulation and function.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. *Mol Cell.* 1998, 1 : 949-957. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization.

Steller H. *Science*. 1995, 267 :1445-1449. Mechanisms and genes of cellular suicide.

Stenerlow B, Hoglund E, Carlsson J. *Adv Space Res*. 2002, 30 : 859-863. DNA fragmentation by charged particle tracks.

Stenerlow B, Hoglund E, Carlsson J, Blomquist E. *Int J Radiat Biol*. 2000, 76 : 549-557. Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer.

Stenger JE, Tegtmeyer P, Mayr GA, Reed M, Wang Y, Wang P, Hough PV, Mastrangelo IA. *EMBO J*. 1994, 13 : 6011-6020. p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation.

Streffer JR, Schuster M, Pohl U, Belka C, Dichgans J, Bamberg M, Weller M. *Anticancer Res*. 1999, 19 : 5265-5269. Irradiation induced clonogenic cell death of human malignant glioma cells does not require CD95/CD95L interactions.

Sudhamshu K C, Kouzu T, Matsutani S, Hishikawa E, Nikaido T, Taro A, Hiromitsu S. *J Clin Gastroenterol*. 2003, 37 : 151-154. Primary malignant melanoma of the esophagus treated with heavy-ion radiotherapy.

Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf B, Green DR, Cohen GM. *J Biol Chem*. 1999, 274 : 5053-5060. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis.

Susin SA (a), Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. *J Exp Med*. 1999, 189 : 381-393. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process.

Susin SA (b), Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. *Nature*. 1999, 397 : 441-446. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.

Sutherland BM, Bennett PV, Schenk H, Sidorkina O, Laval J, Trunk J, Monteleone D, Sutherland J. *Phys Med*. 2001, 17 Suppl 1 :202-204. Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions.

Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98 : 8662-8667. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.

Suzuki M, Kase Y, Yamaguchi H, Kanai T, Ando K. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000, 48 : 241-250. Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams.

Takahashi, H., Ishida-Yamamoto A. and Iizuka, H. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2001, 6 : 64-68. Ultraviolet B irradiation induces apoptosis of keratinocytes by direct activation of Fas antigen.

Takahashi T, Mitsuhashi N, Furuta M, Hasegawa M, Ohno T, Saito Y, Sakurai H, Nakano T, Niibe H. *Anticancer Res.* 1998, 18 : 253-256. Apoptosis induced by heavy ion (carbon) irradiation of two human tumours with different radiosensitivities in vivo :relative biological effectiveness (RBE) of carbon beam.

Takaori-Kondo A, Hori T, Fukunaga K, Morita R, Kawamata S, Uchiyama T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 272 : 856-863. Both amino- and carboxyl-terminal domains of TRAF3 negatively regulate NF-kappaB activation induced by OX40 signaling.

Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. *EMBO J.* 2002, 21 : 5195-5205. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. *EMBO J.* 1998, 17 : 5497-5508. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.

Takenaka I, Morin F, Seizinger BR, Kley N. *J Biol Chem.* 1995, 270 : 5405-5411. Regulation of the Sequence-specific DNA Binding Function of p53 by Protein Kinase C and Protein Phosphatases.

Takimoto R, El-Deiry WS. *Oncogene.* 2000, 19 : 1735-1743. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site.

Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. *Oncogene.* 2001, 20 : 167-177. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system.

Tang D, Kidd VJ. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 28549-28552. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis.

Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. *Ann Neurol.* 2003, 53 Suppl 3 : 561-570. discussion 570-572. Apoptosis in Parkinson's disease : signals for neuronal degradation.

Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. *J Clin Invest.* 1999, 103 : 971-978. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis.

Teyssier F, Bay JO, Dionet C, Verrelle P. *Bull Cancer.* 1999, 86 : 345-357. Régulation du cycle cellulaire des cellules exposées aux radiations ionisantes.

Thacker J, Zdzienicka MZ. *DNA Repair (Amst).* 2003, 2 : 655-672. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability.

Thiagarajah JR, Gourmelon P, Griffiths NM, Lebrun F, Naftalin RJ, Pedley KC. *Gut.* 2000, 47 : 675-684. Radiation induced cytochrome c release causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts.

Thompson CB. *Science.* 1995, 267: 1456-1462. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.

Thornberry NA, Lazebnik Y. *Science.* 1998, 281 : 1312-1316. Caspases: enemies within.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. *J Biol Chem.* 1997, 272 : 17907-17911. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.

Thornberry NA, Peterson EP, Zhao JJ, Howard AD, Griffin PR, Chapman KT. *Biochemistry.* 1994, 33 : 3934-3940. Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones.

Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SH, Taya Y, Prives C, Abraham RT. *Genes Dev.* 1999, 13 : 152-157. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53.

Tinel A, Tschopp J. *Science.* 2004, 304 : 843-846. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress.

Todd DG, Mikkelsen RB. *Cancer Res.* 1994, 54 : 5224-5230. Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] in human epithelial tumor cells.



Tschopp J, Irmeler M, Thome M. *Curr Opin Immunol*. 1998, 10 : 552-558. Inhibition of fas death signals by FLIPs.

Tsuboi K, Tsuchida Y, Nose T, Ando K. *Int J Radiat Biol*. 1998, 74 : 71-79. Cytotoxic effect of accelerated carbon beams on glioblastoma cell lines with p53 mutation: clonogenic survival and cell-cycle analysis.

Tsuchida Y, Tsuboi K, Ohyama H, Ohno T, Nose T, Ando K. *Brain Tumor Pathol*. 1998, 15 :71-76. Cell death induced by high-linear-energy transfer carbon beams in human glioblastoma cell lines.

Uberti D, Schwartz D, Almog N, Goldfinger N, Harmelin A, Memo M, Rotter V. *Exp Cell Res*. 1999, 252 : 123-133. Epithelial cells of different organs exhibit distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis following DNA insult.

Valerie K, Povirk LF. *Oncogene* 2003, 22 : 5792-5812. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair.

Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenabeele P. *Cell Death Differ*. 1999, 6 : 1117-1124. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97 : 4666-4671. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. *Nature*. 1988, 335 : 440-442. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-Myc to immortalize pre-B cells.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. *Cell*. 1993, 75 :229-240. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis , polycystic kidneys, and hypopigmented hair.

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L. *EMBO J*. 1998, 17 : 4668-4679. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression.

Verheij M, Bartelink H. *Cell Tissue Res*. 2000, 301 : 133-142. Radiation-induced apoptosis.

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S. et al. *Nature*. 1996, 380 : 75-79. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis.

Viard-Leveugle I, Veyrenc S, French LE, Brambilla C, Brambilla E. *J Pathol.* 2003, 201 : 268-277. Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. *Science.* 2003, 302 : 1036-1038. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa.

Vit JP, Rosselli F. *Oncogene.* 2003, 22 : 8645-8652. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis.

Vit JP, Guillouf C, Rosselli F. *Exp Cell Res.* 2001, 269 : 2-12. Futile caspase-8 activation during the apoptotic cell death induced by DNA damaging agents in human B-lymphoblasts.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. *Nature.* 2000, 408 : 307-310. Surfing the p53 network.

Vral A, Cornelissen M, Thierens H, Louagie H, Philippe J, Strijckmans K, De Ridder L. *Int J Radiat Biol.* 1998, 73 :289-295. Apoptosis induced by fast neutrons versus 60Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes.

Vynckier S, Bonnett DE, Jones DT. *Radiother Oncol.* 1994, 32 : 174-179. Supplement to the code of practice for clinical proton dosimetry. ECHED (European Clinical Heavy Particle Dosimetry Group).

Wakeford R. *Oncogene.* 2004, 23 : 6404-6428. The cancer epidemiology of radiation.

Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. *Cancer Res.* 2000, 60 : 3051-3057. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells.

Wang YF, Chen CY, Chung SF, Chiou YH, Lo HR. *Mutat Res.* 2003, 544 : 403-413. Involvement of oxidative stress and caspase activation in paclitaxel-induced apoptosis of primary effusion lymphoma cells.

Wang LP, Liang K, Shen Y, Yin WB, Hans G, Zeng YJ. *World J Gastroenterol.* 2001, 7 : 435-439. Neutron-induced apoptosis of HR8348 cells in vitro.

Wang J, Zhen L, Klug MG, Wood D, Wu X, Mizrahi J. *J Card Fail.* 2000, 6 : 243-249. Involvement of caspase-3 and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes.

Wang X, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS, Fearn C, Wang Y, Huang S, Han J. *Mol Cell Biol.* 2000, 20 : 4543-4552. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest.

Wang X, Matsumoto H, Okaichi K, Ohnishi T. *Anticancer Res.* 1996, 16 : 1671-1674. p53 accumulation in various organs of rats after whole-body exposure to low-dose X-ray irradiation.

Warenius HM, Down JD. *Int J Radiat Biol.* 1995, 68 : 625-629. RBE of fast neutrons for apoptosis in mouse thymocytes.

Weber R, *J Cell Biol.* 1964, 22 : 481-487. Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis.

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. *Nat Cell Biol.* 1999, 1 : 20-26. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53.

Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Golec JM, Swenson L, Wilson KP, Charifson PS. *Chem Biol.* 2000, 7 : 423-432. The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity.

Weil M, Raff MC, Braga VM. *Curr Biol.* 1999, 9 : 361-364. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes.

Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT, Nelson SF. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26 : 3059-3065. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization.

Werner AB, Tait SW, de Vries E, Eldering E, Borst J. *J Biol Chem.* 2004, 279 : 28771-28780. Requirement for aspartate-cleaved bid in apoptosis signaling by DNA-damaging anti-cancer regimens.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 7141-7147. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals.

Wiese C, Gauny SS, Liu WC, Cherbonnel-Lasserre CL, Kronenberg A. *Cancer Res.* 2001, 61 : 1129-1137. Different mechanisms of radiation-induced loss of heterozygosity in two human lymphoid cell lines from a single donor.

Wilkins RC, Wilkinson D, Maharaj HP, Bellier PV, Cybulski MB, McLean JRN. *Mutation Res.* 2002, 513 : 27-36. Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells.

Wilson DM, Sofinowski TM, McNeill DR. *Front Biosci.* 2003, 8 : 963-981. Repair mechanisms for oxidative DNA damage.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P. *Development.* 2000, 127 : 5245-5252. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos.

Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR. *Genes Dev.* 2000, 14 : 536-548. NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis.

Wyllie AH. *Nature.* 1980, 284 :555-556. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.

Xia L, Paik A, Li JJ. *Cancer Res.* 2004, 64 : 221-228. p53 activation in chronic radiation-treated breast cancer cells: regulation of MDM2/p14ARF.

Xiao G, Chicas A, Olivier M, Taya Y, Tyagi S, Kramer FR, Bargonetti J. *Cancer Res.* 2000, 60 : 1711-1719. A DNA damage signal is required for p53 to activate gadd45.

Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. *J Biol Chem.* 2004, 279 : 28367-28374. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis.

Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, Seito T. *Int J Radiat Biol.* 1995; 67 : 677-685. Radiation induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells : correlation between mitotic death and apoptosis.

Yang J, Xu Z-P, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Ying-Nian Yu Y-N. *World J Gastroenterol.* 2004, 10 : 155-160. ATM and ATR: Sensing DNA damage.

Yang Y, Li CC, Weissman AM. *Oncogene.* 2004, 23 : 2096-2106. Regulating the p53 system through ubiquitination.

Yang YL, Li XM. *Cell Res.* 2000, 10 : 169-177. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities.

Ye X, Franco AA, Santos H, Nelson DM, Kaufman PD, Adams PD. *Mol Cell.* 2003, 11 : 341-351. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest.

Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. *J Biol Chem.* 1999, 274 : 34974-34980. Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium(VI)-induced Apoptosis.

Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. *Nature.* 1999, 400 : 886-891. Bid deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis.

You KR, Shin MN, Park RK, Lee SO, Kim DG. *Hepatology.* 2001, 34 : 1119-1127. Activation of caspase-8 during N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in Fas-defective hepatoma cells.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. *Mol Cell.* 2001, 7 : 673-682. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96 : 14517-14522. Identification and classification of p53-regulated genes.

Yu Y, Little JB. *Cancer Res.* 1998, 58 : 4277-4281. p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines.

Yu Y, Li CY, Little JB. *Oncogene.* 1997, 14 : 1661-1667. Abrogation of p53 function by HPV16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells.

Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. *Nature.* 1999, 399 : 814-817. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. *Cell.* 1993, 75 : 641-652. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.

Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C, Del Sal G. *Nature.* 2002, 419 : 853-857. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults.

Zaffaroni N, Benini E, Gornati D, Bearzatto A, Silvestrini R. *Stem Cells.* 1995, 13 : 77-85. Lack of a correlation between p53 protein expression and radiation response in human tumor primary cultures.

Zamzami N, Kroemer G. *Nature Rev.* 2001, 2 : 67-71. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. *Science.* 1997, 276 : 1268-1272. Gene expression profiles in normal and cancer cells.

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ. *Genes Dev.* 2000, 14 : 981-993. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays.

Zhen W, Denault CM, Loviscek K, Walter S, Geng L, Vaughan AT. *Mutat Res.* 1995, 346 : 85-92. The relative radiosensitivity of TK6 and WI-L2-NS lymphoblastoid cells derived from a common source is primarily determined by their p53 mutational status.

Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. *Cell Death Differ.* 1999, 6 : 644-651. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis.

Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Doskeland SO. *Nature.* 1998, 391 : 449-450. Injected cytochrome c induces apoptosis.

Zhou X, Dimachkie MM, Xiong M, Tan FK, Arnett FC. *Med Sci Monit.* 2004, 10 : BR191-197. cDNA microarrays reveal distinct gene expression clusters in idiopathic inflammatory myopathies.

Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. *EMBO J.* 2001, 20 : 914-923. A role for p53 in base excision repair.

Zhou P, Chou J, Olea RS, Yuan J, Wagner G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96 : 11265-11270. Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction.

Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. *J Biol Chem.* 1997, 272 : 7797-7800. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases.

Ziegler U, Groscurth P. *News Physiol Sci.* 2004, 19 : 124-128. Morphological features of cell death.

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. *Genes Dev.* 1998, 12 : 2424-2433. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization.

Zoetelief J, Barendsen GW. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1983, 43 : 349-362. Dose-effect relationships for induction of cell inactivation and asymmetrical chromosome exchanges in three cell lines by photons and neutrons of different energy.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. *J Cell Biol.* 2003, 162 : 59-69. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. *J Biol Chem.* 1999, 274 : 11549-11556. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. *Cell.* 1997, 90 : 405-413. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.

---

*Publications et  
Communications personnelles*

---



## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

### 1. Articles parus dans des revues internationales à comité de lecture

- *Publications concernant directement le travail de thèse :*

**Fischer B.**, Coelho D., Valenti L., Florentin I., Denis J-M., Gueulette J., Dufour P. et Bischoff P., Carbon ions-induced apoptosis in hematopoietic tumor cell lines, *Anticancer Research*, 23, 4601-4606 (2003).

**Fischer B.**, Coelho D., Dufour P., Bergerat J-P., Denis J-M., Gueulette J. et Bischoff P., Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 516-522 (2003).

Coelho D., **Fischer B.**, Holl V., Denis J.M., Gueulette J., Bergerat J.P. et Bischoff P., Induction of apoptosis by high-linear energy transfer radiations: role of p53, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80, 644-649 (2002).

Coelho D., **Fischer B.**, Holl V., Denis J.M., Dufour P., Bergerat J.P., Gueulette J. et Bischoff P., Involvement of TP53 in apoptosis induced in human lymphoblastoid cells by fast neutrons, *Radiation Research*, 157, 446-452 (2002).

- *Autres publications :*

Schneider Y., **Fischer B.**, Coelho D., Roussi S., Gosse F., Bischoff P. et Raul F., (Z)-3,5,40-Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cells independently of their p53 status. *Cancer Letters*, 211, 155-161 (2004).

**Fischer B.**, Benzina S., Ganansia-Leymarie V., Denis J-M., Bergerat J-P., Dufour P., Gueulette J. et Bischoff P., Cisplatin enhances the cytotoxicity of fast neutrons in a murine lymphoma cell line. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82, 140-145 (2004).

Carnesecchi S., Bradaia A., **Fischer B.**, Coelho D., Schöller-Guinard M., Gosse F. et Raul F. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal

transduction pathways in human colon cancer cells, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 711-715 (2002).

## 2. Article soumis

**Fischer B.**, Benzina S., Jeannequin P., Dufour P., Bergerat J-P., Denis J-M., Gueulette J. et Bischoff P., Ionizing radiation-induced apoptosis is Fas-independent in human lymphoblastoid cells. Manuscrit soumis (2004).

## 3. Communications

- *Communications concernant directement le travail de thèse :*

**Fischer B.**, Coelho D., Benzina S., Denis J-M. , Gueulette J., Dufour P., Bergerat J-P. et Bischoff P., Study of the induction of apoptosis by different types of radiation in tumoral cells. *Présentation orale lors du first Japan/France meeting on ions tracks and ion induced scintillation in polymers (projet SAKURA)*, Chiba, Japon, Juillet 2004.

**Fischer B.**, Coelho D., Benzina S., Denis J-M. , Gueulette J., Dufour P., Bergerat J-P. et Bischoff P., Rôle de la protéine BID dans l'apoptose induite par les neutrons rapides dans des lignées lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53. *Présentation orale lors du 6ème Colloque de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée*, Bats-sur-Mer, France, Juillet 2003.

**Fischer B.**, Coelho D., Ganansia V., Dufour P., Bergerat J-P., Denis J-M., Gueulette J. et Bischoff P., Fast neutrons-induced apoptosis is mediated by p53-dependent cytochrome c release and BID cleavage. *Présentation par affiche lors du 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR)*, Washington, Etats-Unis, Juillet 2003.

Coelho D., **Fischer B.**, Dufour P., Bergerat J-P., Denis J-M., Gueulette J. et Bischoff P., Analyse du rôle de p53, des caspases et de BID dans l'induction de l'apoptose par les neutrons rapides dans des lignées tumorales humaines. *Présentation par affiche lors du XXIIIème Forum de Cancérologie*, Paris, 3-5 Juin 2002.

**Fischer B.**, Coelho D., Holl V., Dufour P., Denis J-M., Gueulette J., Bergerat J-P. et Bischoff P., Rôle de p53 et des caspases dans l'apoptose induite par des ions carbone et des neutrons rapides. *Présentation orale et par affiche lors du 5ème Colloque de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée*, Autrans, France, Juin 2001.

Coelho D., Holl V., **Fischer B.**, Denis J-M., Gueulette J., Bergerat J-P., Dufour P. et Bischoff P., Involvement of p53 in apoptosis induced by fast neutrons in a human

lymphoblastoid cell line. *Présentation par affiche lors du 92th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), New Orleans, Etats-Unis, Mars 2001.*

- *Autres communications :*

Benzina S., **Fischer B.**, Jeannequin P., Ganansia-Leymarie V., Meternique A., Denis J-M., Bergerat J-P., Dufour P., Gueulette J. et Bischoff P. Conséquences de l'association des neutrons rapides et du cisplatine sur la prolifération et la survie d'un glioblastome humain en culture. *Présentation réalisée aux 12èmes Journées d'Etude de la Chimie sur Rayonnement, Strasbourg, Mai-Juin 2004.*

Benzina S., **Fischer B.**, Jeannequin P., Ganansia-Leymarie V., Meternique A., Denis J-M., Bergerat J-P., Dufour P., Gueulette J. et Bischoff P. Apoptosis and premature senescence are induced by treatment associating cisplatin with an irradiation by fast neutrons in U-87 glioblastoma cells. *Présentation par affiche au 11ème Congrès de l'European Cancer Center, Guebviller, France, Mai 2004.*

Benzina S., **Fischer B.**, Ganansia-Leymarie V., Stoessel A., Dufour P., Denis J-M., Gueulette J. et Bischoff P., Renforcement de la cytotoxicité des neutrons rapides par le cisplatine sur des lignées tumorales : étude des mécanismes concernés. *Présentation par affiche lors du 6ème Colloque de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Batz-sur-Mer, France, Juillet 2003.*

Carnésecchi S., Bradaia A., **Fischer B.**, Coelho D., Schneider Y., Gossé F., Bergmann C. et Raul F., Le géraniol, constituant des huiles essentielles végétales, inhibe la prolifération des cellules cancéreuses coliques humaines en perturbant la membrane cellulaire et en inactivant les voies de signalisation intracellulaires. *Présentation par affiche lors du XXIIIème Forum de Cancérologie, Paris, 3-5 Juin 2002.*

Schneider Y., Launay J-F., Coelho D., Chabert P., Gossé F., **Fischer B.**, Bischoff P. et Raul F., Le 3,5,4'-triméthoxystilbène, dérivé du resvératrol, est un agent anti-mitotique provoquant une déstructuration du réseau microtubulaire. *Présentation par affiche lors du XXIIIème Forum de Cancérologie, Paris, 3-5 Juin 2002.*

Schneider Y., Chabert P., Launay J-F., Coelho D., Fougerousse A., Gossé F., **Fischer B.**, Bischoff P., Brouillard R. et Raul F., Methylated resveratrol: a new antimetabolic drug interacting with microtubules. *Présentation par affiche lors du 93th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), San Francisco, Etats-Unis, Avril 2002.*

Bischoff P., Coelho D., **Fischer B.**, Holl V., Ganansia-Leymarie V., Mathieu J., Florentin I., Denis J-M. et Gueulette J., Détermination ex vivo de la radiosensibilité des lymphocytes spléniques de souris. *Présentation par affiche lors du 5ème Colloque de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Autrans, France, Juin 2001.*

---

# *Annexes*

---

---

*Annexe 1*

*INVOLVEMENT OF TP53 IN APOPTOSIS INDUCED IN HUMAN  
LYMPHOBLASTOID CELLS BY FAST NEUTRONS*

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

D. Coelho, **B. Fischer**, V. Holl, G.M. Jung, P. Dufour, J.P. Bergerat, J.M. Denis, J. Gueulette and P. Bischoff

**Involvement of TP53 in apoptosis induced in human lymphoblastoid cells by fast neutrons.**

Radiation Research 157, 446-452 (2002)

Pages 446-452 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

---

*Annexe 2*

*CASPASE 8-MEDIATED CLEAVAGE OF THE PRO-APOPTOTIC  
BCL-2 FAMILY MEMBER BID IN P53-DEPENDENT APOPTOSIS*

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Barbara Fischer**, David Coelho, Patrick Dufour, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Marc Denis, John Gueulette and Pierre Bischoff

**Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis**

Biochemical and biophysical research communications 306, 516-522 (2003)

Pages 516-522 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01004-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01004-0)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).



---

*Annexe 3*

*INDUCTION OF APOPTOSIS BY HIGH LINEAR ENERGY  
TRANSFER RADIATION : ROLE OF P53*

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

D. Coelho, **B. Fischer**, V. Holl, P. Dufour, J.M. Denis, J. Gueulette, J.P. Bergerat and P. Bischoff

**Induction of apoptosis by high linear energy transfer radiation : role of p53.**

Can. J. Physiol. Pharmacolog. 80, 644-649 (2002)

Pages 644-649 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

---

*Annexe 4*

*CARBON IONS INDUCED APOPTOSIS IN HEMATOPOIETIC  
TUMOR CELL LINES*

---

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Barbara Fischer**, David Coelho, Lionel Valenti, Irène Florentin, Jean-Marc Denis, John Gueulette, Patrick Dufour and Pierre Bischoff

**Carbons ions-induced apoptosis in hematopoietic tumor cell lines.**

Anticancer Research 23 : 4601-4606 (2003)

Pages 4601-4606 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## RESUME

L'objectif général de ce travail de thèse était de parvenir à identifier les mécanismes cellulaires qui régissent l'induction d'apoptose par les radiations ionisantes à transfert d'énergie linéique (TEL) élevé, en particulier les neutrons rapides et les ions carbone. Nous avons également tenté de déterminer le rôle, dans ces mécanismes, de la protéine suppresseur de tumeur p53. Pour cela, nous avons utilisé des lignées lymphoblastoïdes différant par leur statut p53 : TK6 (p53 +/+), WTK1 (p53 muté) et NH32 (p53 -/-).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'induction d'apoptose par les neutrons rapides. Nous avons d'abord comparé les effets de ces radiations à ceux des rayons X sur nos lignées cellulaires. Nos résultats montrent que pour une même dose d'irradiation, les neutrons rapides sont plus efficaces que les rayons X en terme d'induction de l'apoptose. Cette induction d'apoptose varie aussi suivant le statut p53 des cellules. Ces données suggèrent que les neutrons rapides activent l'apoptose suivant deux voies distinctes : une voie dépendante de p53 qui intervient dès les premières heures après l'irradiation, et une voie indépendante de p53, plus lente, mais faisant elle-aussi intervenir les caspases.

Nous avons ensuite essayé de caractériser les deux voies de signalisation apoptotiques activées dans les lignées lymphoblastoïdes par les neutrons rapides, afin d'identifier les différents mécanismes impliqués dans le déclenchement du processus apoptotique en fonction de p53. Nos résultats font apparaître que le statut p53 affecte non seulement la cinétique d'induction de l'apoptose mais aussi la nature des caspases activées. L'apoptose p53-dépendante est associée à l'activation des caspases-3, 7, 8 et 9, au clivage de BID par la caspase-8, à la chute du  $\Delta\Psi_m$  et à la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Par contre, la caspase-7 paraît être activée par une voie de signalisation indépendante de p53.

Dans les expériences suivantes, les mécanismes conduisant à l'initiation des voies apoptotiques induites par les neutrons rapides ont été explorés, et plus particulièrement l'activation de la caspase-8 dans l'apoptose p53-dépendante. Nous avons évalué l'implication du récepteur de mort Fas dans l'activation de cette caspase suite à l'exposition aux neutrons rapides. Nos résultats montrent que ni l'expression de Fas, ni son activation par agrégation directe des récepteurs ne sont induites par les neutrons rapides, suggérant que Fas n'est pas impliqué dans l'apoptose induite par les neutrons rapides.

Afin d'identifier des gènes qui seraient impliqués dans la réponse des cellules TK6 et NH32 aux neutrons rapides, nous avons ensuite étudié l'expression des gènes après irradiation. Ces résultats nous apportent des données préliminaires sur les mécanismes apoptotiques mis en jeu après irradiation par les neutrons rapides et permettent d'orienter nos futures investigations vers la voie des récepteurs TNF, celle des MAPKinases ou encore celle des céramides.

Nous avons également étudié l'induction d'apoptose par les ions carbone, pour mettre en évidence les caractéristiques communes des radiations à TEL élevé concernant l'induction d'apoptose. Comme pour les neutrons rapides, p53 est impliqué dans la sensibilité des cellules TK6 aux ions carbone. L'apoptose induite par ces rayonnements est également dépendante des caspases de type-3.

En conclusion, ces travaux apportent des données nouvelles concernant l'induction de l'apoptose par les radiations ionisantes à TEL élevé. Nos expériences démontrent clairement pour la première fois l'implication de p53 dans l'apoptose induite par les rayonnements à TEL élevé. Nous avons également mis en évidence des différences quantitatives et qualitatives dans le déroulement de l'apoptose induite par les neutrons rapides en fonction de p53. Ceci nous a permis d'établir un premier modèle de signalisation de l'apoptose induite par ces radiations à TEL élevé.