

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES PHYSIQUES À FINALITÉ SPÉCIALISÉE EN PHYSIQUE DU VIVANT

Etudes in vitro des effets de l'irradiation par rayons X de cellules endothéliales immortalisées (HMEC-1)

DABO, Sory

Award date:
2024

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



Université de Namur

Faculté des Sciences

**ETUDES IN VITRO DES EFFETS DE L'IRRADIATION PAR RAYONS X DE
CELLULES ENDOTHÉLIALES IMMORTALISÉES (HMEC-1)**

Projet de Recherche de Master en Sciences Physiques

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de Master en sciences physique à finalité
spécialisée en physique du vivant

Sory DABO

Juin 2024

Promotrice: Prof. Anne Catherine HEUSKIN

Co-promotrice: Dr. Carine MICHIELS

Encadrant: Dr. Victor DELPRAT

Etudes in vitro des effets de l'irradiation par rayons X de cellules endothéliales
immortalisées (HMEC-1)

Sory DABO

Résumé :

La radiothérapie est une technique utilisée pour traiter plus de la moitié des patients atteints de cancer. Cependant, malgré son amélioration par la radiothérapie avec modulation d'intensité (RCMI), cette méthode engendre des effets secondaires précoces et tardifs liés à l'irradiation des cellules et tissus sains. Ces effets secondaires comprennent des troubles cardiaques, des troubles pulmonaires, la cystite non infectieuse, et dépendent de l'organe ciblé par les radiations. Les cellules endothéliales, tapissant la paroi interne des vaisseaux sanguins, montrent une sensibilité élevée aux radiations. Le dysfonctionnement de ces cellules suite aux radiations entraîne une perte de fonction des tissus et organes où elles se trouvent. Ainsi, la protection de ces cellules contre les radiations pourrait améliorer la radiothérapie en réduisant les effets secondaires.

Ce travail a eu pour objectif d'analyser l'inflammation, la sénescence et la mort cellulaire induite dans les cellules endothéliales HMEC-1 suite à leur irradiation par rayons X. L'inflammation a été évaluée par la quantification d'ARNm spécifiques de l'inflammation par RT-qPCR. La sénescence a été étudiée par l'étude de l'expression d'ARNm marqueurs de sénescence par RT-qPCR, l'observation de la morphologie cellulaire post-irradiation ainsi que par la mesure de l'activité SA- β GAL. La mort cellulaire a été évaluée par un marquage avec le cytotox vert et l'annexine V rouge, et l'analyse a été réalisée par imagerie.

Les résultats ont indiqué que les rayons X induisent une inflammation transitoire et persistante pour les faibles et hautes doses d'irradiation, respectivement. L'irradiation des HMEC-1 a entraîné leur sénescence prématurée à partir de 4 jours post-irradiation de façon dose-dépendante. Nous avons également observé que l'irradiation semblait induire une mort cellulaire de façon dose-dépendante au cours des trois premiers jours. Cependant, nos résultats ont suggéré également une toxicité des composants utilisés pour l'analyse de la mort cellulaire. Ainsi une optimisation du protocole ou une utilisation d'une autre méthode pour étudier la mort cellulaire dans les HMEC-1 semble nécessaire. Collectivement, ces résultats peuvent servir de base dans la compréhension des mécanismes sous-jacents des dommages induits par les rayons X sur les cellules endothéliales HMEC-1 et pourraient être approfondis grâce aux perspectives suggérées dans ce document.

Mots clés : Radiothérapie avec modulation d'intensité (RCMI), effets secondaires de la radiothérapie, cellules endothéliales, inflammation, sénescence, mort cellulaire.

Projet de Recherche de Master en Sciences Physiques
Mémoire de Master en Sciences Physiques à finalité spécialisée physique du vivant

Membres du jury :
Prof. Anne Catherine HEUSKIN (Promotrice)
Dr. Carine MICHIELS (Co-promotrice)
Dr. Victor DELPRAT (Encadrant)
M. Michael LOBET (Président du jury)
Prof. Francesca CECCHET

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été une aventure intellectuelle et humaine riche, et il n'aurait pas été possible sans le soutien et les encouragements de nombreuses personnes auxquelles je souhaite exprimer toute ma gratitude.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice Anne-Catherine Heuskin, ma Co-promotrice Carine Michiels et mon encadrant Victor Delprat, pour la qualité de leur encadrement, leurs conseils avisés et leur disponibilité tout au long de ce mémoire. Leurs connaissances et leur expertise ont été inestimables pour l'enrichissement de ce travail. Plus particulièrement, je remercie Victor Delprat pour sa patience et son assistance continue au cours de cette année.

Je remercie également Antoine Fattacioli pour m'avoir formé en culture cellulaire et en RT-qPCR, et Tijani Tabarrant pour m'avoir formé en l'irradiateur aux rayons X du LARN.

Je remercie l'ensemble des membres du LARN et de l'URBC qui ont su éveiller ma curiosité et m'ont fourni des outils nécessaires à la réalisation de ce travail. En particulier, lors des réunions TumHyp organisées par Carine Michiels.

Je suis particulièrement reconnaissant à ma famille et à mes amis pour leur soutien moral et leurs encouragements constants. Leur présence a été un grand réconfort pendant les moments difficiles.

Je ne saurais entamer ce sujet sans exprimer ma reconnaissance à ma tante NNasire Dabo pour son soutien inestimable tout au long de mon cursus.

Table des matières

Remerciements	3
I. Introduction	6
II. Concepts théoriques.....	9
1. Interaction entre rayonnement ionisant et la matière	9
1.1 Interaction entre les photons et la matière	9
2. Notions de dosimétrie.....	10
3. Radiation et cible biologique.....	11
4. Système cardiovasculaire et les cellules endothéliales.....	15
5. Cellules endothéliales.....	17
6. Radiothérapie et effets secondaires	17
7. Caractéristiques des cellules endothéliales sénescents	19
8. Mécanisme d'activation des cellules endothéliales ou d'induction de l'inflammation	21
8.1 Inflammation, rôle et fonction	21
8.2 Inflammation et activation des cellules endothéliales.....	21
9. Apoptose et mécanisme d'induction chez les cellules endothéliales	23
III. Objectifs.....	27
IV. Matériels et méthodes	28
1. Culture cellulaire	28
2. Irradiation des cellules.....	28
3. Extraction d'ARN messager (ARNm) et PCR quantitative après transcription inverse (RT-qPCR).....	29
3.1 Ensemencement de cellules pour irradiation aux rayons X	29
3.2 Extraction d'ARNm	30
3.3 Transcription inverse.....	30
3.4 PCR quantitative en temps réel.....	30
4. Activité de la SA- β galactosidase.....	31
5. Imagerie en temps réel pour la détermination de la mort cellulaire (Incucyte).....	33
6. Test statistique	33
V. Résultats.....	34
V.1. Résultats d'identification du gène de référence pour les HMEC-1.....	34
V.2 Caractérisation de l'inflammation radio-induite des HMEC-1	35
V.3. Caractérisation de la sénescence radio-induite des HMEC-1 par les rayons X	36
V.3.1. Caractérisation de la sénescence par la quantification relative de gènes.....	37
V.3.1. Caractérisation de la sénescence par la SA- β GAL	39
V.4 Caractérisation de la mort cellulaire des HMEC-1 irradiées par rayons X.....	42
VI. Discussion.....	46
VII. Conclusion et perspectives	49

VIII. Bibliographie.....	51
Annexe	56

I. Introduction

Le cancer, une pathologie touchant toutes les strates de la société avec des défis multiples, demeure l'un des principaux enjeux de santé publique à l'échelle mondiale. Le cancer est caractérisé par une prolifération incontrôlée et anormale de cellules, la résistance des cellules tumorales aux signaux de mort cellulaire, la destruction des tissus environnants et l'invasion des organes éloignés de la tumeur primaire par un processus appelé métastase (1). Cette maladie est complexe par sa diversité de type et des caractéristiques hétérogènes spécifiques à chaque type de cancer. Parmi ces types, on distingue les cancers solides qui se développent dans les tissus solides du corps, comme par exemple les poumons, le foie, la peau, le côlon, la prostate, les cancers gastro-intestinaux, ou le sein, et les cancers hématologiques qui affectent les cellules sanguines (2).

D'après le centre international de recherche sur le cancer (IARC), une personne sur cinq dans le monde développe un cancer au cours de sa vie (3). L'organisation mondiale de la santé a rapporté qu'en 2022, 20 millions de nouveaux cas de cancer et 9,7 millions de décès ont été enregistrés, et ce chiffre pourrait atteindre 13 millions d'ici 2030 (4,5). Ceci positionne le cancer comme la deuxième cause de décès au monde, soulignant ainsi l'urgence de la recherche dans ce domaine pour améliorer les pronostics. En réponse, d'intenses recherches sont effectuées afin d'améliorer les traitements contre cette maladie. La figure 1 présente la tendance annuelle du nombre de publications sur les cancers sur PubMed.

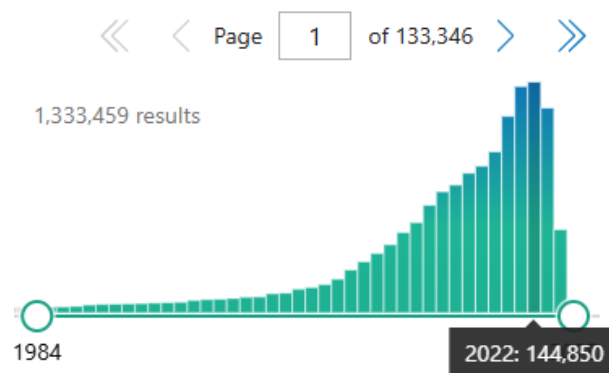


Figure 1 Tendance du nombre de publication par an sur le site PubMed, abordant la thématique des cancers. Le graphique montre un total de 1.333.459 publication entre 1939 à nos jours dont 144.850 en 2022.

Parmi les différents traitements disponibles pour les cancers, la radiothérapie est largement utilisée, contribuant au traitement de 50 à 60% des patients atteints de cancer (6). Elle est efficace pour induire la mort des cellules qui composent la tumeur, mais son utilisation est limitée en raison de plusieurs facteurs, tels que le type de cancer, le stade de la maladie et la localisation de la tumeur. En conséquence, d'autres traitements peuvent être prescrits en complément ou à la place de la radiothérapie. La radiothérapie peut être administrée seule ou en combinaison avec d'autres traitements tels que la chirurgie et la chimiothérapie.

La radiothérapie repose sur l'utilisation des rayonnements ionisants tels que les rayons X pour tuer les cellules cancéreuses de manière à réduire la taille de la tumeur jusqu'à son élimination. Il existe deux types de radiothérapie : la radiothérapie interne aussi appelé la curiethérapie et la radiothérapie externe. La radiothérapie interne repose sur l'utilisation d'une source radioactive scellée, qui est mise en contact direct avec la tumeur afin de délivrer une dose de radiation à la

région cible, par exemple via l'utilisation des implants pour le traitement de la prostate. Contrairement à la radiothérapie interne, en radiothérapie externe la source de rayonnements ionisants se situe à l'extérieur du patient, les rayons traversent les tissus sains du patient avant d'atteindre leur cible (tumeur) en y déposant progressivement de l'énergie. Bien que ce traitement soit efficace contre les cellules cancéreuses, l'exposition des tissus normaux et des cellules saines les composant ne peut être évitée, ce qui entraîne des effets secondaires qui diminuent la qualité de vie des patients. Ces effets peuvent être précoces, tels que des réactions cutanées ou la formation de tissu cicatriciel, qui se manifestent pendant la période de traitement à quelques semaines post-traitement. Les effets peuvent également être tardifs, tels que les troubles de la fertilité, des troubles cardiaques et des troubles pulmonaires se manifestant après des mois ou des années post-traitement (7–10).

Une élimination efficace des tumeurs par irradiation requiert l'administration d'importantes doses de radiations ciblées vers la tumeur. Toutefois, l'utilisation de doses élevées de radiation peut également induire la mort des cellules normales constituant les tissus sains environnants. Par conséquent, les mesures de radioprotection des tissus sains limitent l'utilisation des doses de radiation à une plage spécifique, connue sous le nom de fenêtre thérapeutique (figure2). Cette approche vise à administrer une dose de radiation qui maximalise la probabilité de contrôler la tumeur tout en induisant le moins d'effets secondaires possible aux tissus normaux adjacents.

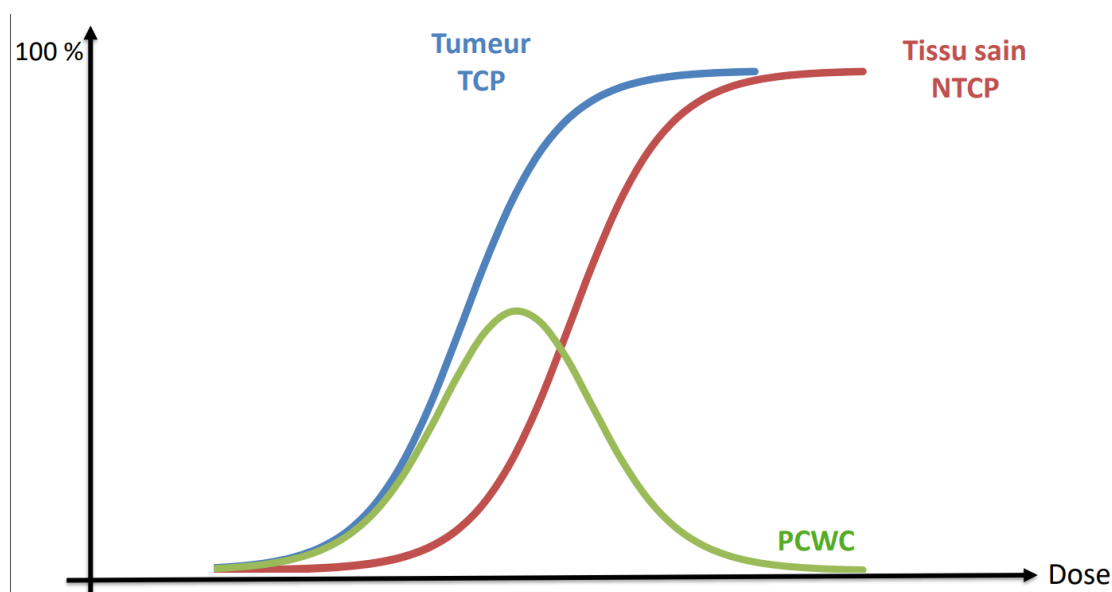


Figure2 Représentation graphique de la fenêtre thérapeutique en radiothérapie. Le graphique illustre la probabilité de survenue d'un événement (ordonnée) en fonction de la dose de radiation (abscisse). Les courbes bleue et rouge représentent respectivement la probabilité de contrôler la tumeur (TCP) et la probabilité d'induction des dommages aux tissus sains (NTCP) à une dose de radiation donnée. Le pic de la courbe verte, correspondant à la fenêtre thérapeutique (PCWC) indique la dose optimale permettant de contrôler la tumeur tout en minimisant les effets indésirables sur les tissus sains.

Au cours des deux dernières décennies, le traitement radiothérapeutique a bénéficié d'une avancée technologique significative, permettant d'obtenir un quotient thérapeutique favorable dont l'efficacité a été démontrée depuis 1999 (11). Cette technique connue sous le nom de Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité (RCMI) ou Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) en anglais, vise à maximiser le dépôt de dose dans la tumeur tout en

minimisant celui reçu par les tissus sains environnants (12). Elle permet de moduler la distribution de la dose de radiation en ajustant l'intensité des faisceaux de rayonnement à l'intérieur de chaque champ de traitement. Cela permet une concentration plus précise de la dose sur la tumeur tout en réduisant les dommages aux tissus sains adjacents.

La RCMI est particulièrement appropriée pour les tumeurs situées à proximité d'organes critiques, tels que le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les reins, les intestins et d'autres organes sensibles aux radiations (12,13).

Malgré l'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie avec la RCMI, les tissus sains sont malgré tout exposés aux rayonnements ionisants et les risques d'effets secondaires varient en fonction de la radiosensibilité des organes exposés. Chaque tissu ou organe possède une sensibilité intrinsèque aux rayonnements, décrivant sa vulnérabilité spécifique aux dommages radiologiques. En radiobiologie, cette sensibilité est prise en compte dans le calcul de la dose équivalente, reflétant ainsi les effets biologiques potentiels du rayonnement sur un organe. Par exemple le colon, la moelle osseuse, les poumons, les seins et l'estomac qui ont une forte radiosensibilité, subiront à dose équivalente des effets beaucoup plus délétères des radiations par rapport à la peau et aux os, qui ont une radiosensibilité plus faible (14).

Certaines études rapportent que certaines maladies développées par les patients après un traitement radiothérapeutique, telles que les maladies cardiovasculaires, pourraient être dues aux dommages causés aux cellules endothéliales (6,7,10). Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins et sont présentes dans la grande majorité des tissus et organes du corps humain. Outre le fait que ces cellules sont présentes dans presque tous les tissus, elles sont particulièrement radiosensibles, ce qui peut entraîner l'altération de leur fonctionnement normal et contribuer au développement de complications dont les toxicités cardiovasculaires et tissulaires observés chez les patients traités par radiothérapie. Il est donc important de comprendre les mécanismes sous-jacents des effets secondaires de l'irradiation sur ces cellules et de développer des stratégies pour atténuer ces risques chez les patients traités (15).

Ce manuscrit présente mes travaux de recherche menés *in vitro* sur les effets de l'irradiation par rayons X sur des cellules endothéliales. Il se compose principalement de six parties distinctes.

La première partie consiste en une introduction au sujet, abordant brièvement la problématique du cancer, les modalités de traitement de cette maladie, les éventuels effets secondaires et la nécessité de mener des recherches dans ce domaine.

La deuxième partie présente les notions théoriques nécessaires à la compréhension de ce travail. Elle résume l'interaction entre les rayonnements ionisants et la matière vivante, les fonctions des cellules endothéliales dans l'organisme, ainsi que les mécanismes d'induction des dommages aux cellules endothéliales par les radiations.

La troisième partie offre un bref résumé de l'objectif de cette étude et expose la question scientifique à laquelle nous essayons de répondre, ainsi que les démarches entreprises. Cette section établit un lien entre les concepts théoriques, les objectifs de cette recherche et les méthodes utilisées pour les atteindre.

Les matériels et méthodes utilisées sont largement discutées dans le quatrième chapitre.

Enfin, les deux derniers chapitres présentent respectivement les résultats obtenus à l'issue de cette recherche et la discussion qui en découle.

II. Concepts théoriques

1. Interaction entre rayonnement ionisant et la matière

Un rayonnement est un processus d'émission d'énergie sous forme d'ondes électromagnétiques ou de particules. On peut distinguer les rayonnements électromagnétiques des rayonnements ionisants.

Les rayonnements électromagnétiques sont composés à la fois de champs électriques et magnétiques, qui oscillent l'un perpendiculaire à l'autre dans une direction de l'espace sous forme de photons. Ces photons sont des particules de masse nulle transportant de l'énergie. Ces rayonnements électromagnétiques sont entre autres les ondes radio, les micro-ondes, les infrarouges, la lumière visible, les ultraviolets, les rayons X et les rayons gamma. Parmi ces rayonnements, les rayons X et gamma qui ont une haute énergie sont considérés ionisants car ils peuvent ioniser la matière en transférant leur énergie à celle-ci (16).

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il transporte suffisamment d'énergie pour éjecter des électrons des atomes ou des molécules de la matière qu'il traverse, créant ainsi des ions chargés. Parmi les rayonnements ionisants, on distingue les rayonnements particuliers, notamment les particules alpha (noyau d'hélium), bêta (électron et positron), les neutrons, les protons et les ions carbone, et les rayonnements électromagnétiques, qui sont les rayons X et gamma.

1.1 Interaction entre les photons et la matière

Contrairement aux particules chargées, les photons sont des particules qui ont la capacité de traverser un matériau sans interagir avec celui-ci. Lorsqu'un photon traverse un milieu, soit il est directement transmis sans interagir avec celui-ci, soit il interagit par absorption ou diffusion. Au cours de l'interaction, le photon transmet la quasi-totalité de son énergie à un électron du milieu. Si l'énergie du photon incident est suffisante pour induire une ionisation, il éjecte l'électron de son atome, ce qui provoque d'avantage d'ionisation dans la matière (16,17). Les photons interagissent de cinq manières différentes avec la matière mais seulement trois d'entre elles ont des applications biomédicales : les effets photoélectrique, Compton et de création de paires électron-positron (figure3).

L'effet photoélectrique est un phénomène où un photon incident d'énergie $h\nu$ interagit avec un matériau, et éjecte ainsi des électrons de celui-ci. Pour que cet effet se produise, l'énergie du photon doit être égale ou supérieure à l'énergie d'ionisation de la matière. Celle-ci est de 32 eV environ pour la matière biologique.

L'effet Compton se produit lorsqu'un photon incident interagit avec un électron de la matière, transférant ainsi une partie de son énergie à l'électron pour l'éjecter du cortège atomique. En conséquence, l'électron éjecté et un photon secondaire sont émis à des angles différents.

La création de paires se caractérise par la production simultanée d'un électron et d'un positron lorsqu'un photon possédant au moins deux fois l'énergie de masse au repos d'un électron ou d'un positron (1,022MeV) passe près d'un noyau atomique. Sous l'influence du champ électromagnétique, le photon se matérialise en une paire électron-positron. Le positron après avoir parcouru une certaine distance, interagit avec un autre électron de la matière et s'annihile, produisant une paire de photons de même énergie ($\sim 511\text{keV}$) émis dans des sens opposés à un angle de 180° l'un par rapport à l'autre.

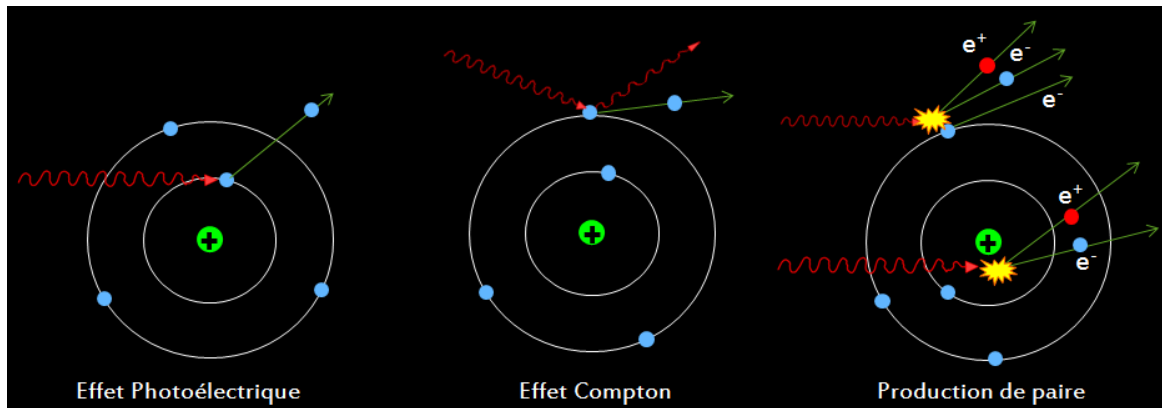


Figure3 Schémas des mécanismes d'interactions des photons avec la matière¹. Le noyau atomique, chargé positivement est représenté par un signe (+) en vert. Les électrons sont représentés par des petits cercles bleus, et gravitent autour du noyau. Les positrons, antiparticules des électrons, sont représentés par des petits cercles rouges. Le photon est illustré en rouge par un symbole sinusoïdal. Pour l'effet photoélectrique, le photon incident éjecte un électron de la couche interne de l'atome. En effet Compton, un photon incident éjecte un électron de la couche externe d'un atome, simultanément, un photon et un électron sont émis. Le schéma de la production de paire montre que sous l'influence du champ électromagnétique d'un noyau ou d'un électron, un photon d'énergie supérieure ou égale à 1,022MeV se matérialise en une paire d'électron (e⁻) et positron (e⁺).

La probabilité qu'un photon interagisse avec la matière dépend principalement de son énergie et du numéro atomique des atomes qui constituent la matière traversée. Dans le milieu biologique, l'effet photoélectrique domine lorsque l'énergie du photon incident est inférieure à 100 keV, tandis que l'effet Compton prédomine pour une énergie comprise entre 100 keV et 10 MeV. Pour des énergies de photons supérieures à 10 MeV, la probabilité de création de paires est plus importante (17).

Les photons sont largement utilisés pour des applications biomédicales, telles que l'imagerie médicale et la radiothérapie, ainsi que dans le domaine agro-alimentaire pour la stérilisation des aliments. Leur utilisation en radiothérapie pour les traitements de cancers, est celle que nous développerons dans ce travail.

2. Notions de dosimétrie

En radiobiologie, on parle plutôt en termes de dose de radiation que d'énergie. Il y a notamment la dose absorbée, qui fait référence à la quantité d'énergie déposée par le rayonnement ionisant dans une matière de masse m, généralement un tissu biologique.

$$Dose_{abs} = D = \frac{E}{m} \text{ Gy}$$

Où E et m sont respectivement l'énergie déposée par le rayonnement et la masse de la matière, Gy (Gray) est l'unité de mesure de la dose absorbée.

Le débit de dose, quant à lui, fait référence à la dose absorbée par unité de temps, exprimé en Gy/min. En radiothérapie conventionnelle, cette valeur est de 2Gy/min.

$$\dot{D} = \frac{D(Gy)}{t (min)}$$

¹[Cloudylabs » Interactions des rayonnements électromagnétique](#)

3. Radiation et cible biologique

Dans toutes les cellules eucaryotes, on retrouve au sein du noyau, l'acide désoxyribonucléique (ADN), une molécule organisée en une double hélice et composée de nucléotides, qui représente le support fondamental de l'information génétique (figure4). Il est responsable de la transcription des ARN messager, qui sont à la base de la synthèse des protéines par un processus nommé traduction. L'ADN participe à de nombreux processus biologiques, tels que la régulation des instructions nécessaires à la croissance, au développement, au fonctionnement et à la reproduction des organismes.

Lorsque l'ADN d'une cellule subit des dommages, cela impacte fortement la survie cellulaire, induisant des altérations dans la réplication, la transcription des gènes cellulaires ainsi que leur traduction en protéines. Ainsi en radiobiologie, l'ADN est considéré comme étant la cible principale des radiations en raison de son rôle crucial dans la cellule.

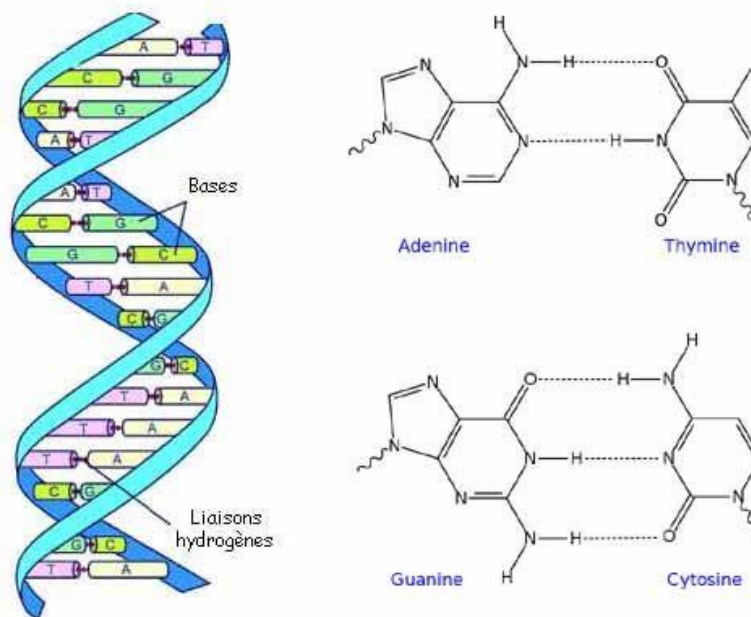


Figure4 Schéma structurel de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ². L'ADN est représenté sous la forme d'une double hélice dont chaque brin est constitué d'une colonne de groupes phosphate et de sucres désoxyribose (à cinq carbones). Des bases azotées (Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine) sont attachées à chaque sucre. Les bases azotées se lient entre elles par des liaisons hydrogène, formant ainsi des paires de bases selon les appariements suivants : Adénine-Thymine et Cytosine-Guanine.

Les radiations provoquent des dommages à l'ADN de manière directe ou indirecte (figure5) (18). Les dommages directs résultent de l'interaction entre le rayonnement ionisant et les brins

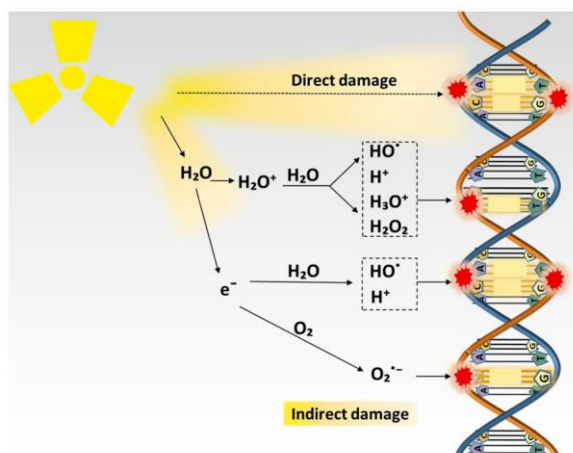
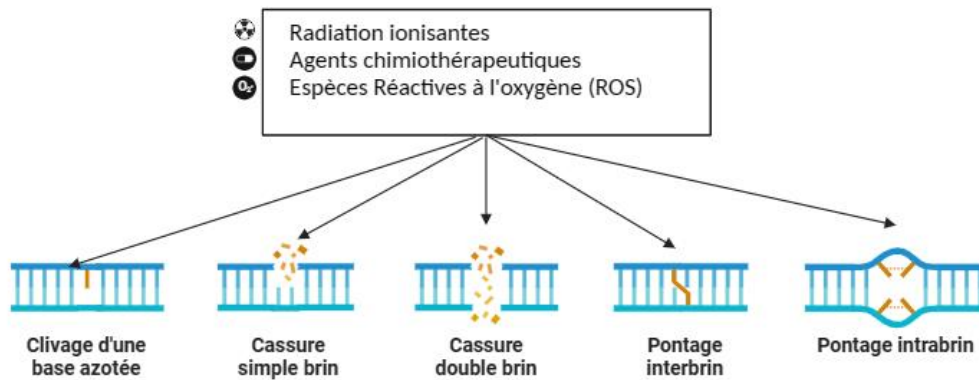


Figure5 Représentation schématique des effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN (18). Les dommages directs résultent de l'interaction entre le rayonnement ionisant et les brins de l'ADN. En revanche, les dommages indirects découlent initialement des interactions entre les rayonnements ionisants et les molécules cellulaires, telles que la molécule d'eau. Cette interaction produit un ion H_2O^+ et un électron (e^-), qui interagissent ensuite avec d'autres molécules de la cellule, menant à la formation des ROS, telles que H^+ , OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ et d'autres. Ces interactions, basées sur des pertes et gains d'électrons, génèrent des radicaux libres qui induisent des dommages biologiques, notamment des dommages à l'ADN.

de l'ADN, elles se traduisent par des cassures simples et doubles des brins de l'ADN. Les dommages indirects résultent initialement de l'interaction entre le rayonnement ionisant et certains composants de la matière biologique, tels que les lipides, les protéines, les molécules d'eau et d'autres éléments. Cette interaction entraîne la dénaturation de ces molécules en créant des radicaux libres, aussi appelés des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

A titre d'exemple, certains ROS sont générés par radiolyse de l'eau, tels que les atomes d'hydrogène (H), l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^\bullet), qui sont des molécules secondaires capables d'induire des réactions radicalaires en chaîne à l'intérieur de la cellule, entraînant des dommages à l'ADN. Les ROS ont la capacité d'induire des dommages significatifs aux bases azotées de l'ADN, ceux-ci se manifestant par le clivage d'une base azotée, la formation de liaisons entre les bases azotées d'un même brin (pontage intra-brin) ou entre des bases azotées des deux brins de l'ADN (pontage inter-brin), tout en perturbant la complémentarité des bases azotées de l'ADN (figure6).

² [Structure et principe de base de l'ADN - Police Scientifique \(police-](#)



Created in BioRender.com 

Figure6 Schéma des dommages aux bases et aux brins de l'ADN causés par des rayonnements ionisants, des agents chimio thérapeutiques et des ROS. Les dommages sont représentés par des cassures simples et doubles brins de l'ADN, ainsi que les dommages aux bases, traduits par le clivage de bases azotées et la formation de pontages inter- et intra-brins de l'ADN.

Lorsque l'ADN subit des dommages, des protéines senseurs spécifiques de chaque type de dommage sont activées. Elles initient ensuite des voies de signalisations spécifiques conduisant à la réparation des dommages. Les cassures des brins d'ADN sont détectées par les protéines Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), tandis que les dommages aux bases azotées sont détectés par les protéines Ataxia Telangiectasia and Rads-related (ATR) (19). La voie de signalisation du stress cellulaire se traduit par une série de phosphorylation des protéines, notamment les protéines kinases de point de contrôle du cycle cellulaire, telles que les checkpoint kinases (Chk). La phosphorylation des Chk retarde la progression du cycle cellulaire et permet la phosphorylation du facteur de transcription p53, augmentant sa capacité d'activer la transcription de nombreux gènes, incluant le gène p21.

La protéine p21 agit comme un inhibiteur des protéines kinases cyclines dépendantes (cdk), aboutissant à l'arrêt de la cellule dans la phase G1 de son cycle cellulaire par la voie p53-p21 (figure7). De même, la protéine p16 est un inhibiteur du cycle cellulaire indépendant de p53. Elle empêche la phosphorylation de la protéine rétinoblastome (Rb), qui régule la transition cellulaire dans la phase G1/S en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Lorsque p16 est activée, elle stabilise Rb dans sa forme active, empêchant ainsi la progression du cycle cellulaire. Cette voie d'arrêt du cycle cellulaire est appelée p16-Rb.

En l'absence de dommages à l'ADN, la protéine Mouse Double Minute (MDM2) se lie à p53 et favorise sa dégradation, limitant ainsi son activité. Cependant, en présence de dommages à l'ADN, la protéine p53 est phosphorylée tandis que les protéines Alternative Reading Frame (ARF) sont activées et inhibent l'activité de MDM2 en se liant à elle. Ces deux processus stabilisent p53, lui permettant ainsi d'exercer son activité de facteur de transcription.

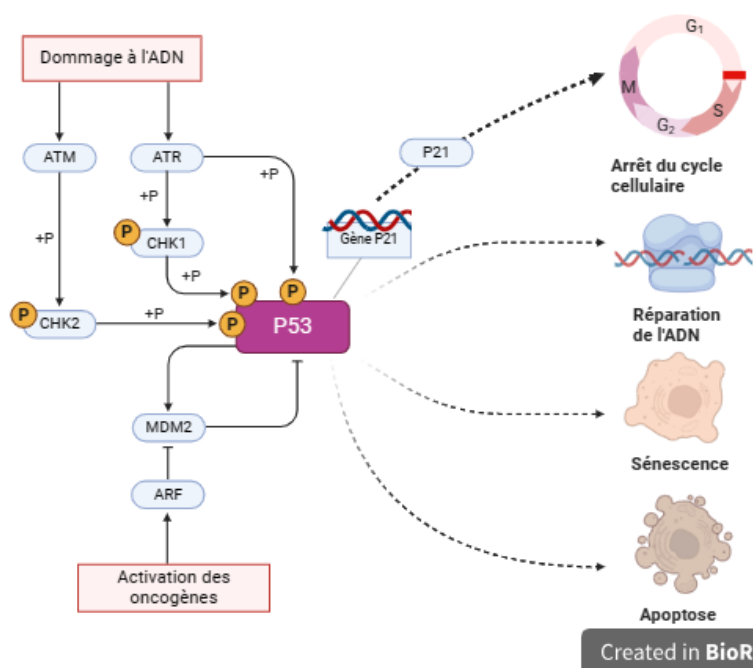


Figure7 Vue d'ensemble de quelques voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, à la sénescence et à l'apoptose après des dommages à l'ADN. Lorsque l'ADN est endommagé, les protéines senseurs ATM et ATR sont activées et phosphorylent les protéines du point de contrôle, CHK2 et CHK1 respectivement, qui à leur tour phosphorylent le facteur de transcription p53. Simultanément la protéine ARF, appartenant à la famille des oncogènes, inhibe MDM2, permettant à p53 de se stabiliser et de fonctionner comme facteur de transcription de p21. La surexpression de p21 entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, marqué par la barre rouge. Cet arrêt du cycle permet la réparation de l'ADN avant la reprise du cycle. En cas de dommages non réparés, la cellule entre en sénescence ou meurt par apoptose, pou encore par d'autres mécanismes non décrits sur le schéma.

L'arrêt du cycle cellulaire donne un temps aux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN de réparer les dommages. Si les dommages sont réparés, p21 est dégradée, ce qui permet aux cdk d'être activées, déclenchant ainsi une voie de signalisation permettant à la cellule de reprendre son cycle cellulaire (passage de G1 en S) et de survivre. Cependant, si les dommages persistent ou sont mal réparés, cela peut entraîner des mutations létales, conduisant éventuellement à la mort cellulaire par apoptose ou par catastrophe mitotique après plusieurs divisions erronées. Alternativement, la cellule peut résister aux signaux de mort, et continuer à proliférer avec des dommages, ce qui peut conduire à la formation de cellules cancéreuses (cancer radio-induit).

De même, la cellule peut être maintenue de manière permanente dans l'état quiescent en phase G1 (c'est-à-dire en arrêt du cycle cellulaire), par une surexpression de p21, conduisant à ce qu'on appelle la sénescence prématurée. Ainsi, une abondance élevée de la protéine p21 et ou de p16 sont l'un des marqueurs des cellules sénescents.

4. Système cardiovasculaire et les cellules endothéliales

Le but de ce chapitre est de détailler les localisations des cellules endothéliales, qui se retrouvent presque partout dans l'organisme, ainsi que leurs fonctions et importance dans le réseau vasculaire.

Le système cardiovasculaire, ou appareil circulatoire, joue un rôle vital dans le transport des nutriments, de l'oxygène, des hormones et d'autres substances nécessaires au bon fonctionnement des différents organes du corps humain. Il est principalement composé de deux organes, le cœur et les vaisseaux sanguins (figure8).

Le cœur agit comme une pompe, il distribue le sang oxygéné et riche en dioxygène et en nutriments via les vaisseaux sanguins. Ceux-ci acheminent le sang vers tous les tissus de

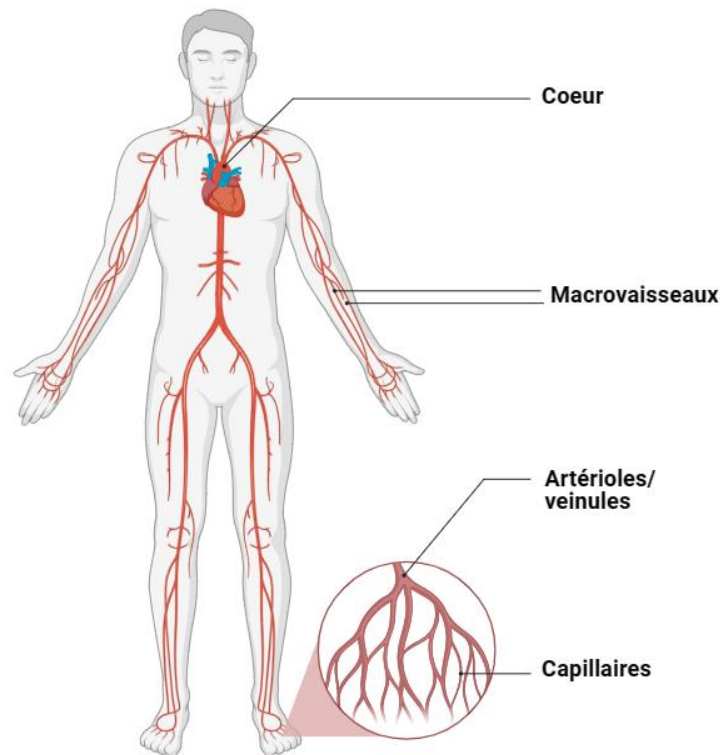


Figure8 Schéma du système cardiovasculaire illustrant les vaisseaux sanguins dans le corps humain. Les macrovaisseaux comprenant les artères et les veines, assurent le transport du sang. Le sang oxygéné est transporté du cœur vers les organes via les artères, et le sang désoxygéné est ramené des organes vers le cœur via les veines. Les microvaisseaux, principalement les capillaires, assurent les échanges entre le sang et les cellules des tissus. Les échanges d'oxygène, de gaz, de nutriments et de déchets se produisent entre la lumière vasculaire et les organes via les capillaires.

l'organisme, puis éliminent les déchets, tels que le dioxyde de carbone ou l'urée, en les transportant vers les sites d'évacuation (20,21). Il existe trois types de vaisseaux sanguins classés en deux groupes selon leur calibre. Il y a les macrovaisseaux, à savoir les artères et les veines, ayant un diamètre d'environ 2,5 cm, diamètre qui diminue de plus en plus pour atteindre 40 à 100 μm au niveau des artérioles et des veinules. Le sang passe ensuite dans microvaisseaux (les capillaires), qui sont les plus petits vaisseaux du système cardiovasculaire, leur diamètre variant de 3 à 10 μm (21–23).

La circulation sanguine part du cœur vers les organes via les artères, tandis que les déchets des organes retournent vers le cœur à travers les veines. Les capillaires servent de liaison entre les artères et les veines, formant ainsi un réseau vasculaire.

Les échanges de nutriments, d'oxygène, d'hormones et d'autres substances entre le sang et les tissus se font à travers les parois des capillaires. De même, les déchets des tissus sont transférés vers le sang à travers ces mêmes parois de capillaires (22).

Histologiquement, les macrovaisseaux sont constitués de trois tuniques distinctes, séparées les unes des autres par une membrane élastique permettant leur dilatation et leur constriction. La tunique la plus interne aussi appelé intima est formée d'une monocouche de cellules endothéliales, appelé endothélium (figure9). Ces cellules endothéliales reposent sur une membrane basale. Les deux autres tuniques (la media et l'adventice) sont les couches les plus externes des vaisseaux sanguins. La media se compose principalement de cellules musculaires lisses, de collagène et d'élastine, tandis que l'adventice est composée de fibroblastes et de collagène (20–22,24).

Contrairement aux macrovaisseaux, les microvaisseaux (capillaires) ont un diamètre plus petit et se composent uniquement de l'endothélium et d'une fine couche externe (membrane basale) qui confère aux cellules endothéliales un soutien structurel et contribue à leur stabilité (figure8) (22). De façon générale, chaque cellule du corps humain, nécessitant des nutriments et de l'oxygène pour assurer son métabolisme et sa survie, est située dans le champ de diffusion de l'oxygène à partir des capillaires, soit à environ 200µm maximum (25).

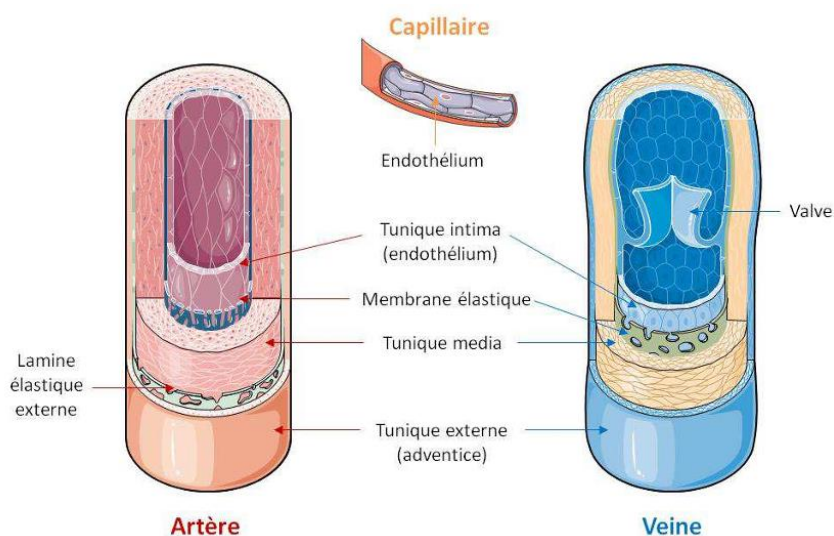


Figure9 Structure et composition des micro-vaisseaux (capillaires) et des macrovaisseaux (artères et veines). Les macrovaisseaux sont constitués d'une couche interne qui est l'endothélium sur laquelle repose une couche intermédiaire (media), principalement constitué des fibres musculaires lisses et de membranes élastiques, le tout couvert par une couche externe (adventice), composée de tissus conjonctif qui renforce et protège les vaisseaux sanguins. De plus, à l'intérieur des veines, on retrouve des valves qui empêchent le reflux du sang. Tandis que les capillaires sont constitués uniquement d'une couche d'endothélium recouvert d'une fine couche de tissu conjonctif qui les soutient et les sépare des tissus environnants. Lors d'une exposition aux radiations in vivo, les cellules endothéliales des capillaires seront plus accessibles aux radiations par rapport à celles localisées dans les macrovaisseaux en raison de l'absence de couches protectrices épaisses.

Ceci met en évidence, d'une part, l'importance de la densité des capillaires pour chaque organe

et, d'autre part, la présence généralisée des cellules endothéliales dans la quasi-totalité des organes du corps humain.

5. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CE) constituent une fine couche de cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins, jouant un rôle central dans plusieurs processus physiologiques de l'organisme. Elles forment une monocouche de cellules liées entre elles à l'interface entre la circulation sanguine et les tissus environnants (figure10). Elles permettent de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Les CE jouent le rôle d'une barrière sélective régulant les

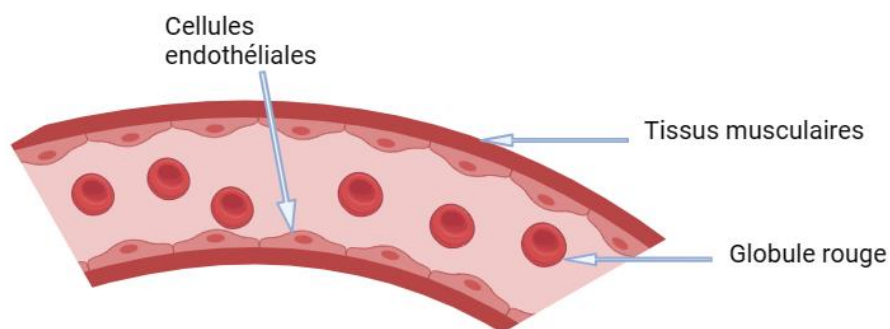


Figure10 Schéma de la localisation des cellules endothéliales à l'intérieur d'un vaisseau sanguin. Elles sont disposées en une monocouche continue à l'intérieur des vaisseaux sanguins, et sont interconnectées par des jonctions cellulaires spécialisées.

échanges entre l'intérieur et l'extérieur des vaisseaux sanguins (26). Leur présence est essentielle pour le contrôle du tonus vasculaire, la régulation de la réponse immunitaire, la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse) et dans le maintien de l'équilibre interne de l'organisme (homéostasie). En résumé, elles assurent la sélection des molécules échangeables entre le sang et les tissus, contribuant ainsi de manière cruciale à divers processus physiologiques (20,21,24,27,28).

6. Radiothérapie et effets secondaires

La radiothérapie est une technique de traitement du cancer qui utilise les rayonnements ionisants de haute énergie, notamment les photons afin de tuer les cellules cancéreuses composant la tumeur par irradiation. L'objectif de la radiothérapie est de contrôler/réduire la croissance et la taille de la tumeur. Etant donné que l'irradiation des tissus sains ne peut être complètement évité, l'une des principales limites de la radiothérapie est l'apparition d'effets secondaires à la suite de l'irradiation de ces tissus sains, tels que l'érythème de la peau, la fibrose, la nécrose et des lésions vasculaires (6). Les études menées par S. Johansson et al, sur l'évolution des lésions radiologiques après le traitement d'un cancer de sein par radiothérapie de 71 patientes, ont montré que les effets tardifs se présentent entre 5 et 34 ans post-traitement. Environ 90% des survivants ont été victime d'une paralysie du bras(29).

Avec la récente amélioration de la radiothérapie (RCMI), l'exposition des cellules normales aux radiations est minimisée par rapport aux cellules cancéreuses.

Sachant que les organes sont différemment radiosensibles, cette technique permet d'adapter la distribution de dose de radiation de manière optimale en fonction de la radiosensibilité de l'organe exposé. La RCMI consiste à utiliser une machine (source de radiation) qui tourne autour du patient et émet des faisceaux de radiation à différents angles par rapport à celui-ci,

tout en ajustant la dose pour une trajectoire donnée de telle sorte que l'intersection de ces faisceaux se situe dans la tumeur (figure11) (30).

Cela permet de minimiser le dépôt de dose dans les tissus sains et de le maximiser dans la tumeur, augmentant ainsi le contrôle tumoral.

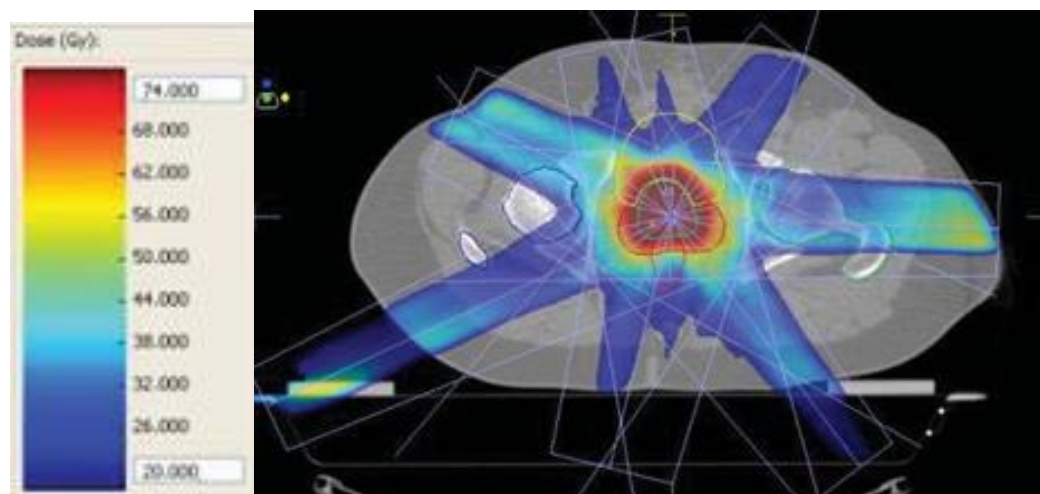


Figure11 Imagerie de traitement d'une tumeur de prostate par RCM. L'échelle de couleur représente la dose d'irradiation déposée par zone. On remarque des sources de rayonnement à différentes intensités suivant des angles distincts, et une accumulation de doses au centre de la tumeur plus de 2x supérieure à celles reçues aux extrémités (tissus sains). Figure issue de (30).

De 2005 à nos jours, l'utilisation de cette technique a significativement augmentée dans les centres de traitements oncologiques, pour traiter les tumeurs de la tête, du cou, de la prostate, du sein, des poumons et du système nerveux central (12,13,31). Les résultats rapportés dans une étude portant sur l'utilisation de la RCM dans le traitement du carcinome nasopharyngé montrent un contrôle de la tumeur et une réduction de quelques effets secondaires, tels que les toxicités neurologique, salivaire, musculaire et cutanée (32).

Cependant, les effets à plus long terme de la RCM sont encore moins connus, tout comme le seuil de dose à partir duquel les effets secondaires tardifs sont susceptibles de se développer après un traitement radiothérapeutique. Toutefois, des études rapportent que, en général, une proportion plus faible de patients a présenté certaines toxicités radio-induites suite au traitement par RCM, comparé au traitement par radiothérapie conventionnelle. Ces toxicités dépendaient des organes exposés, mais il y avait notamment l'ulcère des muqueuses, la sécheresse persistante du pharynx (xérostomie), l'hémorragie artérielle (33,34), la perte des cheveux et des troubles de la déglutition qui se manifestent après une RCM de la tête et du cou. La diarrhée, la cystite non infectieuse, la rectite, la proctite et des problèmes urinaires sont d'autres effets secondaires fréquents lors du traitement par radiothérapie du cancer de la prostate (35). La RCM y a montré une diminution de la proportion de patients présentant ces effets secondaires comparé à la radiothérapie conventionnelle (36).

La détermination d'une relation de causalité entre l'irradiation et les effets manifestés sur les tissus et les organes, nécessite un examen à l'échelle cellulaire. Les cellules endothéliales étant localisées dans la quasi-totalité des organes du corps humain, elles sont plus susceptibles d'être touchées par des radiations par rapport aux autres types cellulaires. De plus, ces cellules étant sensibles aux radiations, elles peuvent facilement être impactées par des radiations, et induire à leur tour des dommages aux organes dans lesquels elles se localisent. Les effets de l'irradiation des cellules endothéliales se manifestent par la mort cellulaire par des mécanismes d'apoptose,

l'inflammation et/ou un arrêt irréversible du cycle cellulaire (sénescence prématurée). Ces effets peuvent être significatifs selon la dose d'irradiation et le temps post-irradiation. En conséquence, les cellules perdent le rôle qu'elles ont dans l'organe, mettant en péril son bon fonctionnement. Cela entraîne la diminution ou la perte de certaines fonctions de l'organe. Par exemple, au sein des vaisseaux sanguins, on observe la perte de la capacité des cellules endothéliales à former une barrière sélective entre le sang et les tissus environnants (augmentation de la perméabilité vasculaire), le déséquilibre homéostatique, l'activation des cellules endothéliales (c'est-à-dire l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire), l'altération de la circulation sanguine et l'augmentation du risque d'athérosclérose (21,37,38), de cystite radique (39), de fibrose vasculaire, d'inflammations chroniques et d'autres maladies cardiovasculaires (15). Ces dysfonctionnements endothéliaux contribuent significativement aux effets secondaires de la radiothérapie et se manifestent chez la plupart des patients.

Dans la section suivante, nous décrivons les différents mécanismes d'induction de la sénescence prématurée, l'inflammation ainsi que l'apoptose des cellules endothéliales, qui sont les trois phénomènes étudiés au cours de ce mémoire.

7. Caractéristiques des cellules endothéliales sénescences

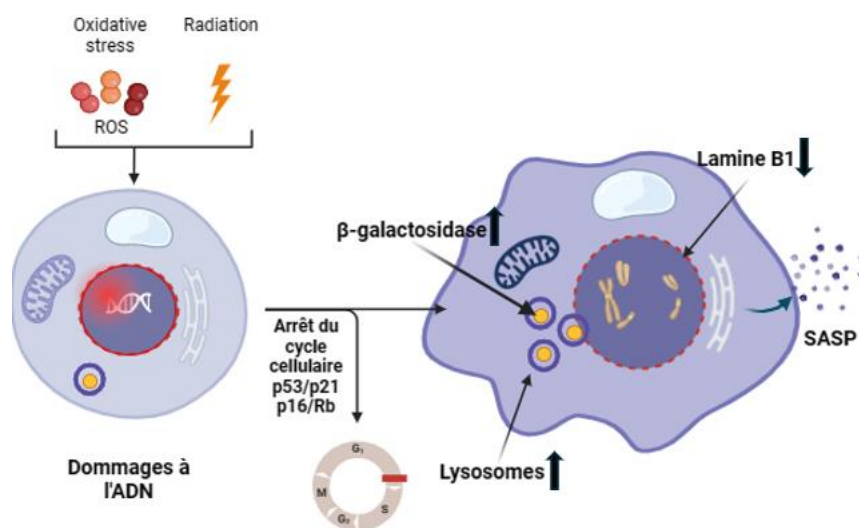
Les cellules sénescences sont des cellules qui présentent un arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase G1, tout en conservant leur activité métabolique (21). Ce phénomène peut résulter soit d'un processus naturel dû à l'épuisement mitotique de la cellule (sénescence répllicative), soit il peut être déclenché par un stress (sénescence prématurée induite par le stress).

La sénescence répllicative est un phénomène intimement lié au vieillissement cellulaire, et survient principalement à la suite d'un nombre donné de divisions cellulaires, point auquel la cellule atteint la fin de son potentiel de prolifération. Cette capacité est variable selon le type cellulaire. Des recherches suggèrent que le raccourcissement progressif des télomères, mécanisme se déclenchant après plusieurs cycles de division cellulaire, est responsable de la sénescence répllicative (40).

La sénescence prématurée quant à elle, est généralement déclenchée par un stress subcytotoxique perturbant le fonctionnement de la cellule, sans pour autant induire de mort cellulaire. Ce stress peut notamment être génotoxique (c'est-à-dire qui impacte la structure de l'ADN), tel que des dommages à l'ADN causés par des radiations, des ROS, des médicaments chimiothérapeutiques et d'autres (41). Comme expliqué précédemment, l'induction de dommages à l'ADN conduit à un arrêt du cycle cellulaire, notamment par l'activation de la voie de signalisation p53-p21. De plus, en cas de stress subcytotoxique ou de raccourcissements de télomères, la voie p16-Rb peut également être activée, induisant un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, dans certains cas, les dommages ne sont pas suffisamment réparés, conduisant ainsi les cellules dans un état d'arrêt permanent du cycle cellulaire (sénescence cellulaire prématurée) et résistant aux signaux de mort cellulaire.

Les cellules sénescences présentent divers marqueurs (Figure12) (21,41–44). Morphologiquement, les cellules sénescences sont de plus grande taille que les cellules normales, et ont également une forme irrégulière, aplatie et allongée. Les cellules sénescences peuvent avoir plusieurs noyaux qui présentent une dégradation de l'enveloppe nucléaire, potentiellement causée par la diminution de l'expression et de l'abondance protéique de la lamine B1, une protéine contribuant à la rigidité nucléaire en tapissant la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (45). En conséquence, cette diminution de l'abondance de lamine B1 altère la structure nucléaire et entraîne une augmentation du volume du noyau cellulaire.

Les cellules sénescentes sont dans un état permanent et irréversible du cycle cellulaire. La surexpression de p21 et ou de p16, qui sont des inhibiteurs spécifiques des protéines cyclines dépendantes kinases (cdk), sont les deux principaux acteurs conduisant à l'arrêt permanent du cycle cellulaire (41). L'activation de p16 et/ou de p21 dépend du type cellulaire ainsi que du stress induisant la sénescence. De façon générale, l'expression de p16 et de p21 est simultanément testée pour marquer la sénescence ainsi que la voie d'induction de l'arrêt du cycle cellulaire.



Created in BioRender.com b

Figure 12 Représentation schématique des caractéristiques d'une cellule sénescente. Le schéma de gauche montre une cellule jeune ayant subi des dommages à l'ADN causés par des radiations ou des ROS. Le schéma de droite illustre les caractéristiques d'une cellule sénescente.

À la suite des dommages à l'ADN, le cycle de la cellule est arrêté en phase G1 par l'activation des protéines p21 et/ou p16. En l'absence de réparation des dommages, la cellule peut entrer dans un état sénescence, caractérisé par un arrêt permanent du cycle cellulaire, l'augmentation du nombre de lysosomes, qui contiennent l'enzyme β -galactosidase (ronds en jaunes), par la sécrétion des molécules du SASP, la dégradation et la diminution de la quantité de lamine B1, l'augmentation de la taille de la cellule ainsi que son changement morphologique.

Les cellules sénescentes produisent un sécrétome spécifique communément appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Ce SASP est constitué d'un ensemble de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1), IL-8, IL-6 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), des chimiokines telles que CCL2 et CXCL1, des protéases telles que les métalloprotéinases matricielle 1 et 3 (MMP1 et MMP3), des facteurs de croissance, des composants de la matrice extracellulaire, et des lipides comme les céramides (45). La composition du SASP est dynamique et donc varie au cours du temps. Elle varie également en fonction du type cellulaire et du type de stress inducteur de la sénescence. De plus, le SASP est considéré comme une source toxique pour l'endothélium et le tissu, car cela peut induire le passage des cellules endothéliales d'un état quiescent à un état pro-inflammatoire, amplifiant ainsi le processus d'inflammation (21,41,42,44).

Une autre caractéristique connue des cellules sénescentes est l'augmentation du nombre et de la taille des lysosomes ainsi que de l'activité de l'enzyme β -galactosidase (46). La β -galactosidase est une enzyme exprimée par la totalité des cellules de l'organisme. Elle est localisée au niveau des lysosomes et permet de catalyser la réaction de dégradation de certains

glucides contenant des galactoses, par exemple l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides. Cependant, comme précédemment indiqué, les cellules sénescents présentent une surexpression de ces enzymes et donc une augmentation de leur activité. L'activité de cette enzyme est optimale au pH observé au sein des lysosomes (c'est-à-dire pH 4.0). Néanmoins, étant donné la forte surexpression de β -galactosidase dans les cellules sénescents, à pH suboptimale (communément pH 6.0), l'activité de la β -galactosidase est détectée dans les cellules sénescents, mais pas dans les cellules non-sénescents.

L'activité β -galactosidase à pH suboptimale sert donc également de marqueur des cellules sénescents par une technique connue sous le nom de la SA- β GAL. En présence du substrat X-gal, cette enzyme catalyse la dégradation du substrat, produisant une molécule de couleur bleue détectable au microscope. Cette technique est utilisée en complément des techniques de quantification des composants du SASP, des régulateurs du cycle cellulaire, et de la lamine B1, par RT-qPCR, pour caractériser les cellules sénescents.

8. Mécanisme d'activation des cellules endothéliales ou d'induction de l'inflammation

8.1 Inflammation, rôle et fonction

Physiologiquement, l'inflammation est un processus de défense, qui se met en place en réponse à une agression de l'organisme par des stimuli ou des éléments nocifs, tels que les agents pathogènes, une lésion tissulaire (blessure) et d'autres stimuli. Ce phénomène est généralement de courte durée et se manifeste par de la rougeur, un gonflement, des douleurs et une perte de fonction du site affecté. Cette inflammation aiguë a pour objectif, de défendre l'organisme contre les infections.

Cependant, une inflammation chronique est néfaste pour l'organisme et est impliquée dans l'apparition et l'aggravation de nombreuses pathologies, telles que le diabète de type 2, les cancers et des maladies auto-immunes et cardiaques. En effet, cette inflammation chronique peut engendrer des lésions tissulaires contribuant à la perte de fonction des cellules endothéliales et causer le développement de maladies cardiovasculaires (43). L'inflammation chronique est généralement associée au stress et au dysfonctionnement tissulaire, induits par exemple par des infections persistantes mais aussi à l'exposition à une source d'irradiation (47). L'inflammation chronique peut durer des semaines, des mois voire des années. Dans leur recherche, Urszula M. et al, soulignent l'émergence d'une inflammation chronique sévère chez les patients traités par la radiothérapie, survenant entre 4 et 12 semaines après le traitement. Cette réaction inflammatoire peut évoluer vers une fibrose tissulaire. Les auteurs notent également que cette inflammation prolongée induit la dyspnée et l'insuffisance respiratoire chez 5-25% des patients, affectant les poumons, ainsi qu'une entérite muqueuse chez 20-60% des patients, touchant les intestins. Ces manifestations se caractérisent par des symptômes tels que des saignements et une diarrhée chronique (48).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous focalisons sur l'inflammation chronique radio-induite, développée par la plupart des patients après un traitement radiothérapeutique et dont l'intensité est potentiellement variable en fonction de la dose de radiation et du temps post-irradiation.

8.2 Inflammation et activation des cellules endothéliales

En l'absence d'inflammation, les cellules endothéliales sont dites inactivées, ce qui correspond à un état dans lequel elles ne permettent pas le passage des leucocytes du sang vers les tissus. En présence d'une inflammation, des cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-1, IL-6,

IL-8 et TNF- α induisent l'activation des cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales ainsi que les cellules immunitaires résidentes, une fois activées, sécrètent des chimiokines en réponse à des agents inducteurs d'inflammation (comme la radiothérapie). Ces chimiokines promeuvent le recrutement des leucocytes par chimiotaxie vers les tissus affectés en attirant les leucocytes vers les sites d'inflammations. De plus les cellules endothéliales activées expriment à leur surface des molécules facilitant l'extravasation des leucocytes (42,49).

Le recrutement des leucocytes dans la lumière des vaisseaux sanguins et leur transmission vers les sites de lésions sont rendus possible par l'intermédiaire des molécules de roulement permettant le roulement des leucocytes le long de l'endothélium (E-selectine), des molécules d'adhésion permettant l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales (par exemple ICAM-1 et VCAM-1) et des molécules de transmigration (par exemple PECAM1) (figure 13).

A la suite de l'inflammation, les cellules immunitaires résidentes (telles que les macrophages et les cellules dendritiques) sécrètent des chimiokines qui ont la particularité d'attirer les leucocytes vers le site de lésion. Les leucocytes ont à leur surface des récepteurs de chimiokines et des ligands de liaison aux sélectines, tels que le Sialyl Lewis X (SLeX). Les récepteurs leur permettent d'être attirés par les chimiokines, et une fois à l'approche de la surface de l'endothélium, les leucocytes se lient aux sélectines par l'intermédiaire des ligands. Ensuite les sélectines endothéliales telles que E et P-selectine ralentissent et permettent le roulement des leucocytes sur la surface de l'endothélium en les transférant vers le site d'extravasation. Par la suite, les intégrines lymphocytaires fonctionnelles 1 (LFA-1), également connues sous le nom de CD11a/CD18, exprimés à la surface des leucocytes, permettent la liaison des leucocytes aux immunoglobulines d'adhésion cellulaire (ICAM-1 et VCAM-1), entraînant ainsi l'adhérence des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. Une fois que les leucocytes ont adhéré aux cellules endothéliales, les protéines de transmigration endothéliales (telles que PECAM1) permettent la transmigration des leucocytes, conduisant ainsi à l'extravasation des leucocytes. Une fois qu'ils parviennent au site tissulaire affecté, les leucocytes s'activent, soit par contact direct avec des agents pathogènes, soit par l'action des cytokines sécrétées par les cellules résidentes des tissus (48).

Certaines études avancent que l'inflammation peut résulter de la catastrophe mitotique et de la sénescence cellulaire retardée induites par la radiothérapie (47). Généralement, la caractérisation du phénomène d'inflammation est basée sur la quantification de l'expression de gènes pro-inflammatoires, tels que les IL-6, IL-8 et TNF- α , ainsi que des gènes impliqués dans le recrutement des leucocytes : tels que les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM-1 ainsi que PECAM1.

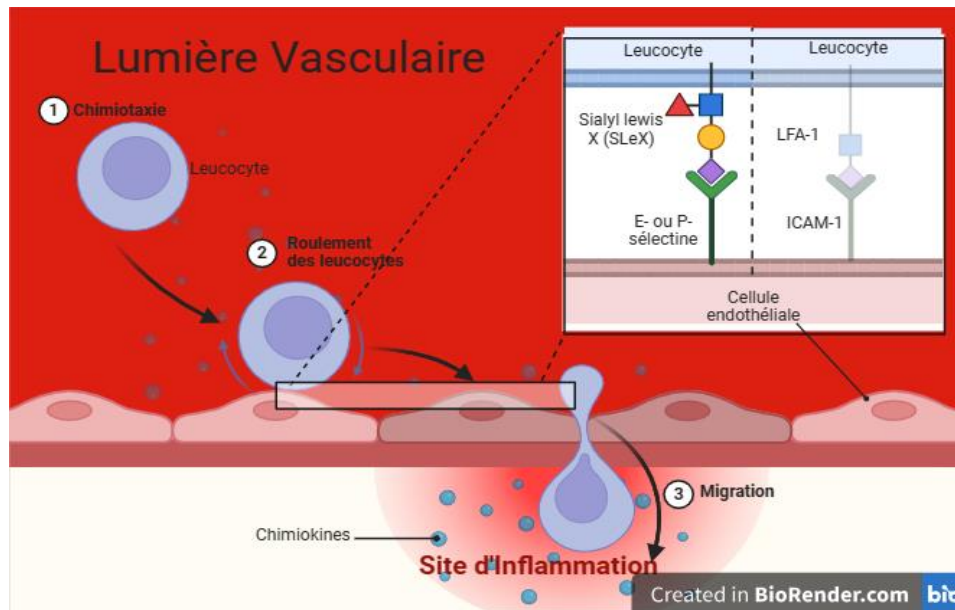


Figure13 Schéma du mécanisme de migration des leucocytes de la lumière vasculaire vers le site d'inflammation. (1) Chimiotaxie : les leucocytes sont attirés vers le site d'inflammation par des chimiokines (2) Roulage et adhésion des leucocytes à la surface endothéliale : les leucocytes se lient aux protéines P- ou E-selectine via le ligand SLeX, ensuite les leucocytes roulent sur la surface endothéliale grâce aux interactions avec les sélectines, ils se lient ensuite aux protéines d'adhésion ICAM-1 via le ligand LFA-1 facilitant leur adhésion ferme à la surface endothéliale. (3) Migration : les leucocytes traversent la paroi vasculaire et migrent vers le site d'inflammation par l'intermédiaire de PECAM1 (non représenté sur le schéma).

9. Apoptose et mécanisme d'induction chez les cellules endothéliales

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, qui peut se produire de façon physiologique ou pathologique. Physiologiquement, elle contribue au maintien de l'homéostasie tissulaire grâce à l'élimination des cellules vieillissantes, endommagées, non fonctionnelles et/ou qui ne sont plus nécessaires. L'apoptose est un mécanisme de mort propre car le contenu cellulaire est maintenu lors de son élimination par des phagocytes. Cette élimination contrôlée de cellules garantit la régulation du développement tissulaire, à travers l'élimination des cellules infectées par des agents pathogènes et les cellules tumorales potentielles (19). Ainsi, l'apoptose est essentielle pour maintenir la fonctionnalité et l'intégrité des organismes vivants.

Cependant, l'apoptose peut également se déclencher à la suite des dommages cellulaires importants. Cela peut être par exemple à la suite d'exposition des cellules aux toxines, des produits chimio-thérapeutiques ou des rayonnements ionisants. Lorsqu'elle est causée par des rayonnements ionisants, on parle d'apoptose radio-induite. Par conséquent, l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques peut entraîner un déséquilibre homéostatique, transformant ainsi l'apoptose en une problématique plutôt qu'un phénomène bénéfique.

L'apoptose peut être engendrée via l'activation de différentes voies de signalisation. En effet, elle peut être induite par la voie intrinsèque, la voie extrinsèque de l'apoptose et/ou par une autre voie spécifique à une lignée cellulaire, le tout aboutissant à l'activation des cascades exécutrices de l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par le facteur de nécrose tumorale (TNF), sécrété par des cellules du système immunitaire en réponse à des stimuli toxiques provenant du milieu extracellulaire, tels que l'exposition aux radiations, une température élevée, des infections

virales et autres. Les récepteurs du TNF (TNFR1) sont exprimés à la surface des cellules soumises à des conditions défavorables, permettant la liaison du TNF. Cette liaison induit le recrutement de diverses protéines, dont les procaspases-8. Les procaspases, dans leur état inactif, ne peuvent pas initier l'apoptose. Cependant, une fois recrutées, leur pro-domaine est clivé par maturation, générant ainsi les caspases-8 (initiatrices de l'apoptose). Ces dernières activent ensuite une cascade de caspases en aval, qui exécutent le processus de mort apoptotique (19).

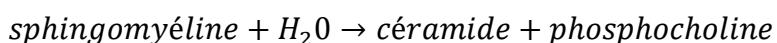
Contrairement à la voie extrinsèque, l'apoptose induite par la voie intrinsèque est déclenchée par des signaux provenant de l'intérieur de la cellule, tels que des dommages irréparables à l'ADN, des conditions hypoxiques, le stress du réticulum endoplasmique (RE), ou des stress oxydants graves, résultant par exemple de la surproduction de radicaux libres. Ce processus commence d'une part par l'inhibition de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, et d'autre part via l'activation des protéines pro-apoptotiques telles que Bad et Bak. Une fois activées dans le cytosol, les protéines Bad migrent vers la mitochondrie, où elles créent de pores dans la membrane externe de la mitochondrie. Ce processus augmente la perméabilité des mitochondries et favorise la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Dans le cytosol, le cytochrome c associé à d'autres protéines forme un complexe protéique appelé apoptosome, comprenant les procaspases-9. L'association des procaspases-9 au complexe protéique les active, produisant ainsi les caspases-9 qui sont initiatrices de l'apoptose. Les caspases-9 activent ainsi une série de protéines caspases en aval, conduisant à l'exécution du processus apoptotique (19).

Les recherches indiquent que les deux voies d'induction d'apoptose convergent en activant les mêmes caspases effectrices, lesquelles scindent les mêmes cibles cellulaires.

Cependant, en dehors de ces deux voies d'induction de l'apoptose, de nombreuses études montrent que les cellules endothéliales subissent une apoptose via une voie supplémentaire, connue sous le nom de la voie de la sphingomyélinase-céramide. Cette voie est considérée comme le principal mécanisme d'induction de l'apoptose chez les cellules endothéliales après une irradiation. Ces mêmes études suggèrent que cette voie est précocement initiée par rapport aux voies intrinsèque et extrinsèque pour induire de l'apoptose. De plus, d'autres processus peuvent amplifier le nombre de cellules apoptotiques par une ou les deux voies expliquées ci-dessus (50).

Le processus exact allant de l'activation des sphingomyélinases jusqu'à l'induction de l'apoptose par l'intermédiaire des céramides est peu décrit dans la littérature. La description ci-dessous donne un aperçu de la connaissance actuelle sur le processus.

L'irradiation des cellules endothéliales entraîne l'activation des enzymes sphingomyélinases acides (ASMase), majoritairement localisées dans le compartiment endolysosomal des cellules. L'activation des ASMases entraîne le processus d'exocytose, au cours duquel les lysosomes migrent vers la membrane cellulaire et fusionnent à celle-ci. ASMase est une enzyme qui catalyse la dégradation de la sphingomyéline en céramide et en phosphocholine. La sphingomyéline est un lipide de la famille des sphingolipides, qui est localisé dans la membrane cellulaire. Elle est constituée d'une sphingosine (lipide), un acide gras, une molécule phosphate et une molécule de choline (19,51). La présence des ASMases au niveau de la membrane plasmique catalyse l'hydrolyse des sphingomyélines, et produit des céramides et des phosphocholines par la réaction suivante (figure 14) (51).



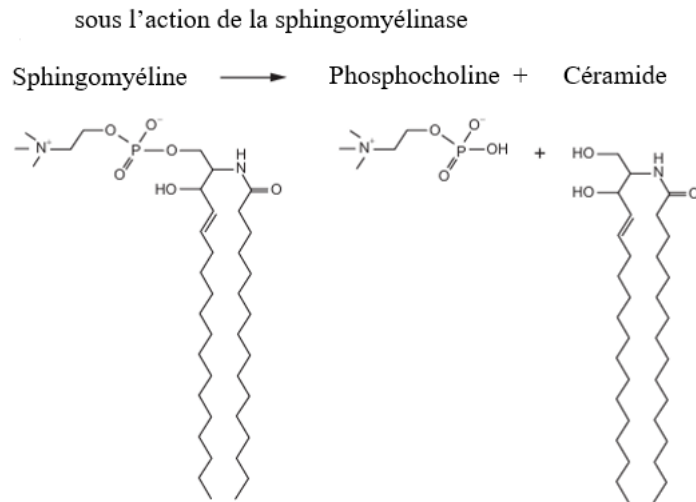
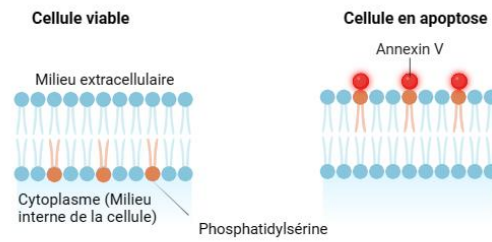


Figure14 Schéma de la réaction de l'enzyme sphingomyélinase sur la sphingomyéline pour produire la céramide et la phosphocholine.

La céramide générée, appartenant également à la famille des sphingolipides, peut rester dans la membrane cellulaire ou être libérée dans le cytosol. Elle joue ensuite le rôle de messenger secondaire de la voie sphingomyélinique conduisant ainsi à l'activation de p38 MAPK (Mitogen – Activated Protein Kinase) qui à son tour phosphoryle les protéines exécutrices de l'apoptose (51,52).

L'une des caractéristiques des cellules apoptotiques permettant leur détection est la migration des molécules de phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la bicouche lipidique, ce flip-flop étant catalysé par des scramblases. Dans les cellules non apoptotiques, la phosphatidylsérine est localisée dans le feuillet interne de la bicouche lipidique (du côté de la face cytosolique, c'est-à-dire orienté vers l'intérieur de la cellule). Cependant, lorsqu'une cellule entre en apoptose, diverses enzymes et protéines sont activées, et en conséquence la phosphatidylsérine est externalisée vers le feuillet externe de la membrane plasmique. L'exposition de la phosphatidylsérine à la surface des cellules est considérée comme un signal destiné aux cellules phagocytaires, indiquant que la cellule est en apoptose et qu'elle doit ainsi être éliminée (figure15).

Expérimentalement, la migration de la phosphatidylsérine vers le feuillet externe peut être détecté grâce au marquage à l'annexine V. L'annexine V est une protéine ayant une forte affinité et sélectivité pour la phosphatidylsérine, à laquelle est conjugué un fluorochrome. Elle a donc la capacité de se lier spécifiquement à la phosphatidylsérine et émettre un signal fluorescent détectable par microscopie en fluorescence, par cytométrie en flux ou d'autres techniques, notamment l'incucyte.



Created in BioRender.com

Figure15 Représentation schématique de la phosphatidylsérine dans la bicouche lipidique d'une cellule viable et une cellule en apoptose. Les deux images illustrent la bicouche de la membrane plasmique. Sur l'image de gauche (cellule vivante), la phosphatidylsérine est orientée vers le cytoplasme (à l'intérieur de la cellule). Tandis que sur l'image de droite (cellule en apoptose), la phosphatidylsérine est orientée vers le milieu extracellulaire (à la surface de la cellule), où elle est spécifiquement liée à l'annexine V.

III. Objectifs

Plusieurs études montrent que les maladies cardiovasculaires et les inflammations chroniques sont les principaux effets secondaires développés par des patients ayant subi une radiothérapie. Ceux-ci étant notamment associés à l'altération des fonctions des cellules endothéliales, la compréhension des mécanismes induisant le dysfonctionnement et la mort de ces cellules pourrait permettre de trouver des moyens permettant leur protection contre les radiations, ce qui permettrait de protéger les tissus sains, avec pour conséquence l'amélioration des traitements de cancer par radiothérapie via la diminution des effets secondaires.

La compréhension des mécanismes sous-jacents associés au dysfonctionnement de l'endothélium est cruciale pour l'identification des cibles thérapeutiques permettant la protection des cellules endothéliales contre les radiations.

L'objectif de cette recherche était de mettre en lumière par des études *in vitro*, les effets de l'irradiation de cellules endothéliales microvasculaires humaines immortalisées (HMEC-1), en caractérisant les processus d'inflammation, de sénescence et d'apoptose des HMEC-1 irradiées par rayons X.

La sénescence a été mise en évidence par deux méthodes distinctes, d'une part par la quantification d'ARNm de quelques gènes via la RT-qPCR, notamment des gènes du SASP (IL-6, IL-8, MMP3 et MMP1), du cycle cellulaire (p21 et p16) et de la lamine B1, 6h, 24h, 72h et 7 jours post-irradiation. D'autre part, la détection des cellules sénescents via la mesure de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) a été réalisée 4 et 7 jours post-irradiation.

L'inflammation a été mise en évidence par RT-qPCR, grâce à la quantification d'ARNm des gènes d'ICAM-1, IL-6 et IL8, 6h, 24h, 72h et 7 jours post-irradiation.

L'apoptose des cellules endothéliales a été quantifiée durant 3 jours post-irradiation, toutes les 2 heures, grâce au marquage par l'annexine V et du cytotox green pour quantifier la proportion de cellules apoptotiques, en utilisant l'incucyte.

IV. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Toutes les expériences de cette recherche ont été réalisées sur la lignée cellulaire HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell-1) (53).

HMEC-1 est une lignée de cellules endothéliale microvasculaire immortalisée. Ce type cellulaire a été isolé à partir de l'endothélium microvasculaire du prépuce d'un patient masculin en 1990, puis immortalisée par transfection d'un plasmide codant pour une protéine du virus simien SV40 A, le large T antigène. Cette lignée cellulaire est actuellement utilisée dans divers domaines de recherche, notamment dans l'étude des maladies cardiovasculaires, de l'inflammation, de la recherche sur le cancer, des fonctions de l'endothélium et d'autres encore (54).

Dans le cadre de ce mémoire, les cellules HMEC-1 ont été cultivées selon les recommandations de l'ATCC. Plus précisément, elles ont été cultivées dans le milieu MCDB131 (Gibco 10372-019) complété avec les constituants suivants : 10mM de Glutamax (Gibco 35050-061), 1µg/mL d'hydrocortisone (Sigma H0888), 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco 15140-122) et 10% de serum de veau fœtal (FBS).

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de cultures de 75cm² (T75), incubées à 37°C et à 5% de CO₂.

Le milieu de culture était remplacé tous les 3 jours, et lorsque les cellules atteignaient 80% de confluence, les cellules étaient repiquées. Pour ce faire, les cellules étaient détachées des boîtes de culture à l'aide de 1 ml de Trypsine EDTA (Gibco 25300-054), suspendues dans du MCDB131 complet, et comptées avant d'être ensemencées à une densité cellulaire précise (voir plus bas) dans des plaques 6 puits (Costar 3516) afin d'être irradiées.

Pour toutes les expériences de RT-qPCR, les cellules ont été ensemencées 20h avant d'être irradiées. Pour les expériences de SA-βgal, les cellules ont été ensemencées 6h avant l'irradiation. Pour les expériences impliquant l'Incucyte, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits, 24h avant d'être irradiées, et après irradiation, elles ont été collectées et réensemencées dans une plaque 96 puits (Costar 3596). Juste avant l'irradiation, les cellules ont été examinées au microscope afin de vérifier l'absence de contamination ainsi que leur morphologie et de confirmer leur adhérence aux plaques.

2. Irradiation des cellules

Les cellules ont été exposées à différentes doses de rayons X (2, 6 et 10 Gy) au Laboratoire d'Analyse par Réactions Nucléaires (LARN) en utilisant l'irradiateur X-RAD 225 XL (PXI, USA). Les doses de 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy ont été administrées aux cellules à un débit de dose de 2 Gy/min, correspondant au débit de dose typiquement utilisé en radiothérapie conventionnelle (55). Pour obtenir ce débit de doses, différents paramètres ont été utilisés tels que, une tension de 225 kV, une intensité de 10 mA, une distance source d'irradiation- échantillon (SSD) de 43/0.0 cm ainsi que l'utilisation d'un filtre d'aluminium F1 de 2 mm d'épaisseur placé à la sortie du tube RX afin d'éliminer les rayonnements d'énergie faible, qui ont pour effet d'échauffer l'échantillon.

Les cellules non irradiées (0 Gy) sont considérées comme les cellules contrôles. Afin d'irradier des cellules à différentes doses au sein d'une même plaque, un bloc de plomb d'une épaisseur de 40 mm a été utilisé. Lorsqu'il est mis entre les cellules et la source d'irradiation, il permet

une atténuation significative des faisceaux de rayons X transmis, réduisant leur intensité à environ $10^{-18}\%$ du faisceau transmis (valeur négligeable).

Le pourcentage du faisceau transmis à travers le bloc de plomb peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Le pourcentage du rayonnement transmis} = \frac{I}{I_0} \cdot 100 = e^{-\mu x} \cdot 100$$

x correspond à l'épaisseur du plomb, soit $40 \text{ mm} = 4 \text{ cm}$, ρ est la masse volumique du plomb égale à $11,34 \text{ g/cm}^3$, l'énergie maximale des rayons X (correspondant à la tension de 225kV) est 0,225 MeV. Cette énergie correspond à un coefficient d'atténuation massique $\mu^* = 9,985 \cdot 10^{-1} \text{ cm}^2 / \text{g}$ (valeur tabulée)(56). Le coefficient d'atténuation linéique μ peut être calculé en multipliant le coefficient d'atténuation massique par la masse volumique, donc $\mu = \mu^* \rho$.

A travers les valeurs données, nous pouvons procéder au calcul du pourcentage de faisceau transmis. Ce qui donne

$$\frac{I}{I_0} \cdot 100 = 2,14 \cdot 10^{-18} \%$$

La très faible valeur obtenue pour le pourcentage de rayonnement transmis suggère que le bloc de plomb de 4 cm constitue un bon blindage permettant d'empêcher l'irradiation des puits situés dessous. En d'autres termes, une proportion très faible du faisceau de rayonnement traversera effectivement le bloc de plomb et atteindra les cellules situées en dessous. Cela confirme l'efficacité du plomb en tant que matériau de blindage pour protéger contre l'irradiation.

L'efficacité de l'irradiation de la plaque entière se confirme par la détermination du diamètre du cône d'irradiation par rapport aux dimensions de la plaque. Pour que la plaque entière soit irradiée, il faudrait que le diamètre du cône d'irradiation soit supérieur ou égale à la longueur de la plaque. Le diamètre peut être obtenu par :

$$\text{Diamètre} = 2 \cdot \text{SSD} \cdot \tan\left(\frac{\alpha}{2}\right)$$

Où α représente l'angle d'ouverture du cône, égale à $25^\circ \pm 1^\circ$ (valeur tabulée au LARN) et SSD la distance source d'irradiation-échantillon qui est de 43 cm.

Sur base de ces données, on trouve un diamètre de 19 cm, comparativement à la longueur de la plaque 6 puits qui est de 8,5 cm, nous confirmons que toute la plaque est couverte par le champ d'irradiation lorsqu'elle est placée sous la source de rayonnement.

3. Extraction d'ARN messenger (ARNm) et PCR quantitative après transcription inverse (RT-qPCR)

Afin d'analyser le niveau d'expression d'un ou plusieurs ARN messagers (ARNm) spécifiques, présents dans des cellules, les ARNm sont extraits des cellules, puis une Réaction en Chaîne par Polymérase après transcription Inverse (RT-qPCR) est réalisée pour quantifier l'expression d'ARNm. Comme son nom l'indique, cette technique se compose de deux processus distincts : la transcription inverse ou reverse transcription (RT) et la PCR quantitative (qPCR).

3.1 Ensemencement de cellules pour irradiation aux rayons X

Dans cette étude, le tableau 3 présente le nombre de cellulesensemencées (24h avant irradiation) pour la RT-qPCR en fonction de la dose d'irradiation et du temps post-irradiation. Les hautes doses sont susceptibles d'induire des dommages importants aux cellules, en

conséquence le nombre de cellules mortes augmente au fil du temps. La densité cellulaire est ainsi ajustée en fonction des conditions d'irradiation et du temps post-irradiation afin d'avoir plus ou moins la même densité cellulaire au moment de la lyse cellulaire, dans le but d'extraire suffisamment d'ARNm pour observer des effets significatifs.

Tableau 1 Nombre de cellulesensemencées en fonction des doses utilisées et des temps post-irradiation.

Temps post-irradiation	Dose de radiation	Nombre de cellulesensemencées
6h	0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy	150 000 cellules
24h	0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy	150 000 cellules
72h	0 Gy et 2 Gy	75 000 cellules
	6 Gy et 10 Gy	150 000 cellules
7 jours	0 Gy et 2 Gy	10 000 cellules
	6 Gy et 10 Gy	200 000 cellules

3.2 Extraction d'ARNm

Après la période d'incubation post-irradiation, les ARNm ont été extraits des cellules à l'aide du kit ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega Z611), en utilisant les recommandations du fabricant. Dans chaque puits, les cellules ont été lysées avec 100µl de la solution de tampon de lyse du kit, et un grattoir (cell scraper) (SPL 90020) a été utilisé afin de collecter le lysat cellulaire. L'extraction des ARNm a été réalisée selon les recommandations du fabricant et les échantillons ont été stockés au congélateur -80 °C après extraction jusqu'au jour de la RT.

3.3 Transcription inverse

Le but de cette étape est de convertir les ARNm extraits des cellules en ADN complémentaire (ADNc) quantifiable par la PCR. La transcription inverse (RT) a été réalisée selon un protocole spécifié (voir en annexe), en utilisant les kit Promega GoScript Reverse Transcription Mix, Oligo dT (Promega A2791) et Random Primers (Promega A278A), ainsi qu'un thermocycleur. La concentration d'ARNm dans chaque échantillon a été déterminée avec l'Implen, suivi du prélèvement d'une quantité de 2 µg d'ARNm par échantillon, et leur dénaturation au thermocycleur. Un volume de 2 µl par produit du kit RT (H₂O RNase free, buffer random primers, buffer oligo dT et d'enzyme mix ; 8µl au total) a été ajouté à chaque solution d'ARN dénaturée, puis à l'aide du programme 1rt/GoScript du thermocycleur (réalisant l'hybridation des primers en 5 min à 25°C, l'extension en 60 min à 42°C et l'inactivation en 15 min à 70°C), les ARNm ont été convertis en ADNc.

3.4 PCR quantitative en temps réel

Le but de cette dernière partie de la RT-qPCR est de quantifier la quantité d'ADNc des gènes spécifiques contenus dans les différents échantillons. L'analyse par PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été menée en utilisant une solution de 300 nM de primer forward (IDT), de 300 nM de primer reverse (IDT), 10 µl de l'enzyme Power SYBR Green du kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega A6002), le tout complété afin d'obtenir un volume de 16µl total par de l'eau nuclease free du kit.

Ce mélange réactionnel a été réalisé en duplicat dans une plaque 96 puits, pour chaque gène spécifique, et pour toutes les doses d'irradiation. Pour chaque condition d'irradiation, 4 µl d'échantillon d'ADNc dilué 100x a été ajouté au mélange réactionnel (ce qui équivaut à 4 ng

d'ADNc par réaction). La qPCR a été réalisée avec la machine ViAA7, et 40 cycles d'amplification de l'ADNc ont été réalisés.

Les variations dans l'expression génique induites par chaque dose d'irradiation ont été comparées par rapport à un gène de référence (PPIE). Plusieurs gènes de référence ont été testés (PPIE, 23kDa et RPS9). PPIE était celui montrant le moins de variation d'expression entre les conditions, et a donc été choisi comme gène de référence. Pour chaque dose de radiation, le niveau d'expression du gène d'intérêt a été calculé selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ (57). Brièvement, la variation de CT (ΔCT) a été déterminée en soustrayant le CT de la condition spécifique, du CT du gène de référence correspondant. Par exemple $CT(0 \text{ Gy d'IL6}) - CT(0 \text{ Gy de PPIE})$, et ainsi de suite. Ensuite, pour chaque gène d'intérêt, le ΔCT a été comparé à celui de son échantillon contrôle (0 Gy), en soustrayant le ΔCT au ΔCT du 0 Gy. Par exemple $(\Delta CT_{2Gy \text{ d'IL-6}}) - (\Delta CT_{0Gy \text{ d'IL-6}})$, ce qui produit le $\Delta\Delta CT$.

L'expression relative en ARNm de chaque gène a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta CT}.$$

4. Activité de la SA- β galactosidase

La technique est basée sur le principe suivant, le substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyle β -D-galactopyranoside) est clivé par la β -galactosidase (enzyme exprimée par les cellules sénescents) pour produire du galactose et un monomère de 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole. Ensuite, au cours des 16 prochaines heures, ces monomères sont oxydés deux à deux pour former du 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro oxydés, qui est une substance de couleur bleue observable au microscope (figure15) (58,59). Lors du test, les cellules sont mises à pH suboptimal (pH 6.0), ainsi seules les cellules sénescents présentent une coloration bleue. Si le test était fait à pH optimal (pH 4.0), toutes les cellules seraient bleues. Cette différence est due au fait que le niveau d'expression de la β -galactosidase est généralement beaucoup plus élevé dans les cellules sénescents.

Après le test, la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β Gal (cellules de couleur bleue) a été déterminée par comptage manuel au microscope, sur au moins 300 cellules par puits.

Dans cette étude, l'activité SA- β GAL des HMEC-1 a été étudiée 4 et 7 jours après irradiation par rayons X aux doses de 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy. Les cellules ont étéensemencées, et

irradiées après 6h. Le nombre de cellulesensemencées pour chaque condition est présenté dans le tableau2

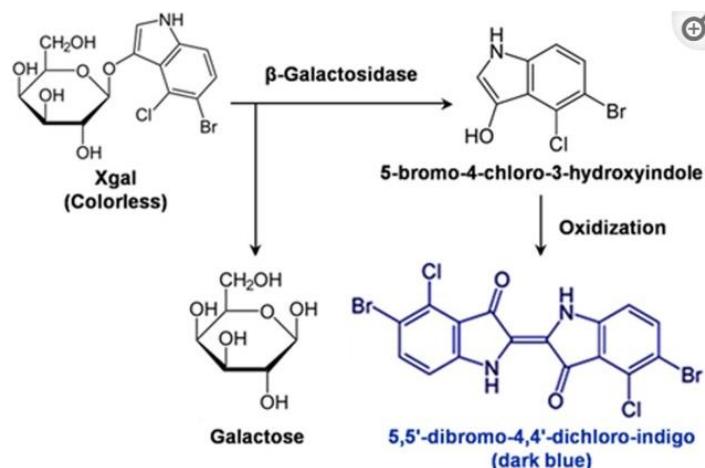


Figure15. Schéma illustrant la dégradation du substrat X-GAL par l'enzyme β-Galactosidase. La β-galactosidase dégrade le substrat X gal, ce qui produit du galactose et la molécule 5-bromo-4-chloro-3-hydroxydole. Cette molécule s'oxyde par paire au fil du temps pour produire une nouvelle molécule de couleur bleue observable au microscope. Figure issue de (44)

Tableau 2 : Nombre de cellulesensemencées en plaque 6 puits pour l'activité SA- βgal

Dose d'irradiation	Nombre de cellulesensemencés	
	4 jours post-irradiation	7 jours post-irradiation
0 Gy	30 000 cellules	5 000 cellules
2 Gy	50 000 cellules	10 000 cellules
6 Gy	180 000 cellules	100 000 cellules
10 Gy	180 000 cellules	150 000 cellules

Pour chaque condition de dose, un triplicat technique a été réalisé. Toutes les plaques ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'au jour de la détermination de l'activité SA- βgal (4 et 7 jours post-irradiation).

Le protocole utilisé pour ce test est joint en annexe. Brièvement, les cellules ont été rincées au PBS puis fixées pendant 5min par une solution de fixation composée de 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après fixation, les cellules ont été incubées pendant 16h, à 37°C avec la solution de coloration chimique de pH 6.0, composée de tampon phosphate à pH 6.0, de ferrocyanure de potassium (K), de Ferricyanure de potassium (K), de NaCl (2,5M), de MgCl₂ (1M), d'eau miliQ et du substrat X-gal dissous dans du N, N diméthylformamide.

Après le temps d'incubation des cellules avec la solution de coloration, la solution a été retirée, puis 2 rinçages au PBS et 2 rinçages au méthanol des cellules ont été effectués.

Ensuite, la proportion de cellules positives pour la SA- βgal a été quantifiée manuellement par observation au microscope, sur un total de 300 cellules comptées par puits.

5. Imagerie en temps réel pour la détermination de la mort cellulaire (Incucyte)

La technique Incucyte est une méthode d'imagerie en temps réel, permettant de suivre et d'analyser l'évolution et la viabilité des cellules au cours du temps.

Dans cette étude, nous avons fait recours à cette technique pour caractériser la viabilité et la mort cellulaire par apoptose au cours du temps post-irradiation. Des photos ont été prises (dans le canal vert, le canal rouge, et en contraste de phase) par l'appareil Incucyte ainsi que des données sur l'évolution des cellules toutes les 2 heures pendant 3 jours, après irradiation des cellules. Différentes concentrations de puromycine, 0,5 µg/ml et 1 µg/ml ont été utilisées comme contrôle positif pour induire la mort cellulaire des HMEC-1, et comparées aux cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy. Pour chaque condition (irradiation et puromycine), un duplicat de 100 000 cellules a étéensemencé dans des plaques 6 puits, 24h avant l'irradiation, incubés à 37°C et 5% de CO₂. Après irradiation, les cellules ont été collectées des plaques 6 puits à l'aide de 300 µl de Trypsine EDTA (Gibco 25300-054) par puit. Ensuite, un duplicat de 2 000 cellules/puit, pour chaque condition (0 Gy, 2 Gy, 6 Gy, 10 Gy d'irradiation par rayons X, 0,5 µg/ml et 1 µg/ml de puromycine) a étéensemencé dans une plaque 96 puits. 100 µl du milieu MCDB131 complet supplémenté par des dilutions de 1/1200 du cytotox green (Sartorius 4633) et 1/2400 d'Annexin V red (Sartorius 4641) a été ajouté par puits. Le cytotox green est une molécule n'entrant que dans les cellules ayant une perte de l'intégrité membranaire (majoritairement les cellules mortes) et les colore en vert, suite à sa fixation à l'ADN cellulaire. L'annexine V red est une molécule qui lors de sa fixation avec la phosphatidylsérine, produit un signal fluorescent rouge. La viabilité et la mort cellulaire soit par apoptose, soit par un autre mécanisme sont caractérisées par les relations suivantes :

Cytotox (-) + Annexin V (-) = Cellules viables

Cytotox (-) + Annexin V (+) = Cellules mortes par apoptose précoce

Cytotox (+) + Annexin V (-) = Cellules mortes par d'autres mécanismes mais pas par apoptose ou débris d'acide nucléique

Cytotox (+) + Annexin V (+) = cellules mortes par apoptose tardive et nécrose

6. Test statistique

Toutes les expériences ont été répétées trois fois ou plus, de façon indépendante. Un test de student a été réalisé sur les résultats. La représentation graphique des données de RT-qPCR et de la SA-βgal, ainsi que les tests statistiques, ont été effectués à l'aide du logiciel Prism. Le seuil de significativité de ce test a été fixé à une p-value de 0,05. Toute valeur supérieure à ce seuil est considérée non significative (ns). Les étoiles sur les graphiques sont interprétées comme suit, une étoile (*) correspond à une p-value ≤ 0,05 (résultat considéré significatif au niveau de 0,05), deux étoiles (**) correspondent à une p-value ≤ 0,01 (résultat très significatif), trois et quatre étoiles (***) et ****) correspondent à une p-value ≤ 0,001 et 0,0001 respectivement (résultat extrêmement significatif).

V. Résultats

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de l'irradiation des cellules endothéliales par des rayons X. Nous nous sommes focalisés sur les phénomènes de sénescence, d'inflammation et d'apoptose. Les résultats sont analysés selon deux axes principaux : l'effet de la dose de radiation et l'effet du temps post-irradiation sur les HMEC-1. Les données sont statistiquement comparées aux cellules non irradiées (0 Gy) pour évaluer l'effet de la dose, et sont indiquées par des étoiles (*) dans les figures. Par ailleurs, les cellules irradiées à faible dose (2 Gy) servent de référence pour comparer les effets des irradiations à faible et haute doses (6 Gy et 10 Gy). Les différences significatives issues de cette seconde comparaison sont indiquées par des astérisques (#).

V.1. Résultats d'identification du gène de référence pour les HMEC-1

La quantification relative d'ARNm des gènes par RT-qPCR a débuté par la détermination d'un gène de référence, également appelé gène témoin ou gène de ménage, qui présente une expression stable indépendamment des conditions d'irradiation. L'expression de trois gènes, couramment utilisés comme gènes de ménages, ont été évalués pour toutes les conditions d'irradiation (0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy), à savoir la protéine ribosomale S9 (RPS9), 23kDa, qui est un gène codant pour une protéine ribosomale ayant une taille de 23 kilos daltons, et la Peptidylprolyl Isomérase E (PPIE). Nous remarquons une élévation du CT à 7 jours pour les 0 Gy, et ce pour les trois gènes (Figure V.1 A). Ce problème technique provient des échantillons

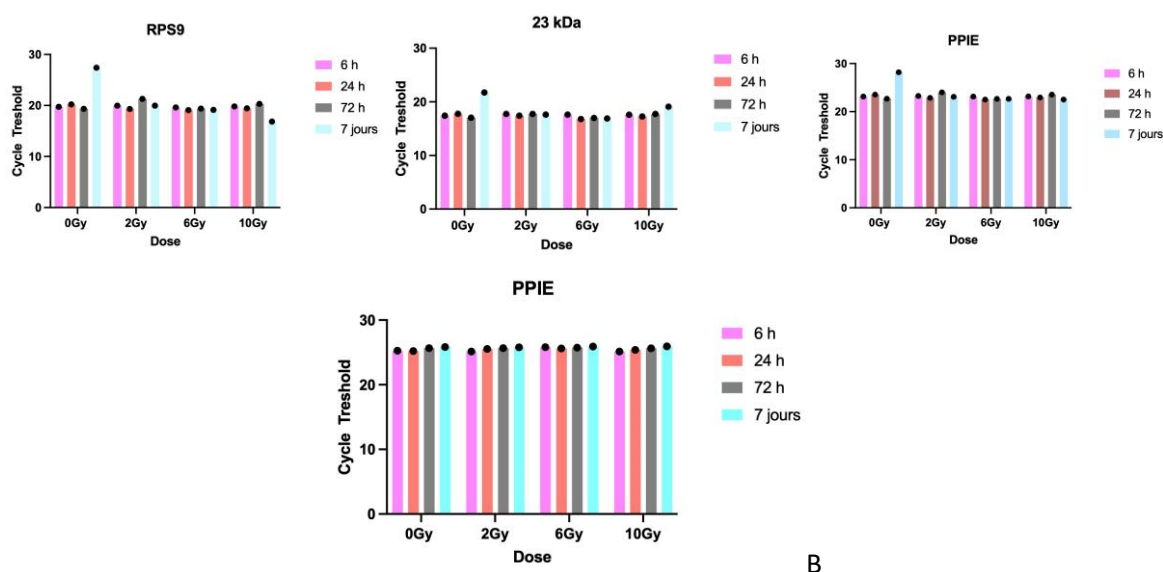


Figure V.1 Cycle Threshold (CT) des gènes RPS9, 23 kDa et PPIE déterminé 6 h, 24 h, 72 h et 7 jours post-irradiation pour la détermination d'un gène de ménage de HMEC-1 irradiée à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy. (A) Les résultats des graphiques RPS9, 23kDa et de PPIE, proviennent d'un même échantillon, où une variation de CT a été noté dans les cellules non irradiées après 7 jours. (B) Variation du cycle threshold de PPIE en fonction de la dose et du temps post-irradiation à partir d'autres échantillons de RT-qPCR provenant d'une autre expérience.

utilisés lors de l'optimisation. Cependant, le PPIE a montré une expression stable indépendamment des conditions d'irradiation, malgré des variations techniques initiales comme le montre la quantification B de l'ARNm du gène PPIE, déterminée dans les mêmes conditions (Figure V.1 B). Par conséquent, PPIE a été retenu comme gène de référence pour cette étude, garantissant la fiabilité des analyses ultérieures.

V.2 Caractérisation de l'inflammation radio-induite des HMEC-1

L'inflammation a été caractérisée par la quantification de l'expression de gènes impliqués dans l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales, dont l'expression est induite en cas d'inflammation (ICAM-1), ainsi que de quelques gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8). Les figures V.2 et V.3 illustrent l'expression relative de ces gènes en fonction de la dose de radiation pour des temps de 6h, 24h, 72h et 7 jours après irradiation. Nous notons qu'à 6h après irradiation, aucune modification significative de l'expression de l'ARNm d'ICAM-1 n'est observée. Cependant, une légère augmentation significative de

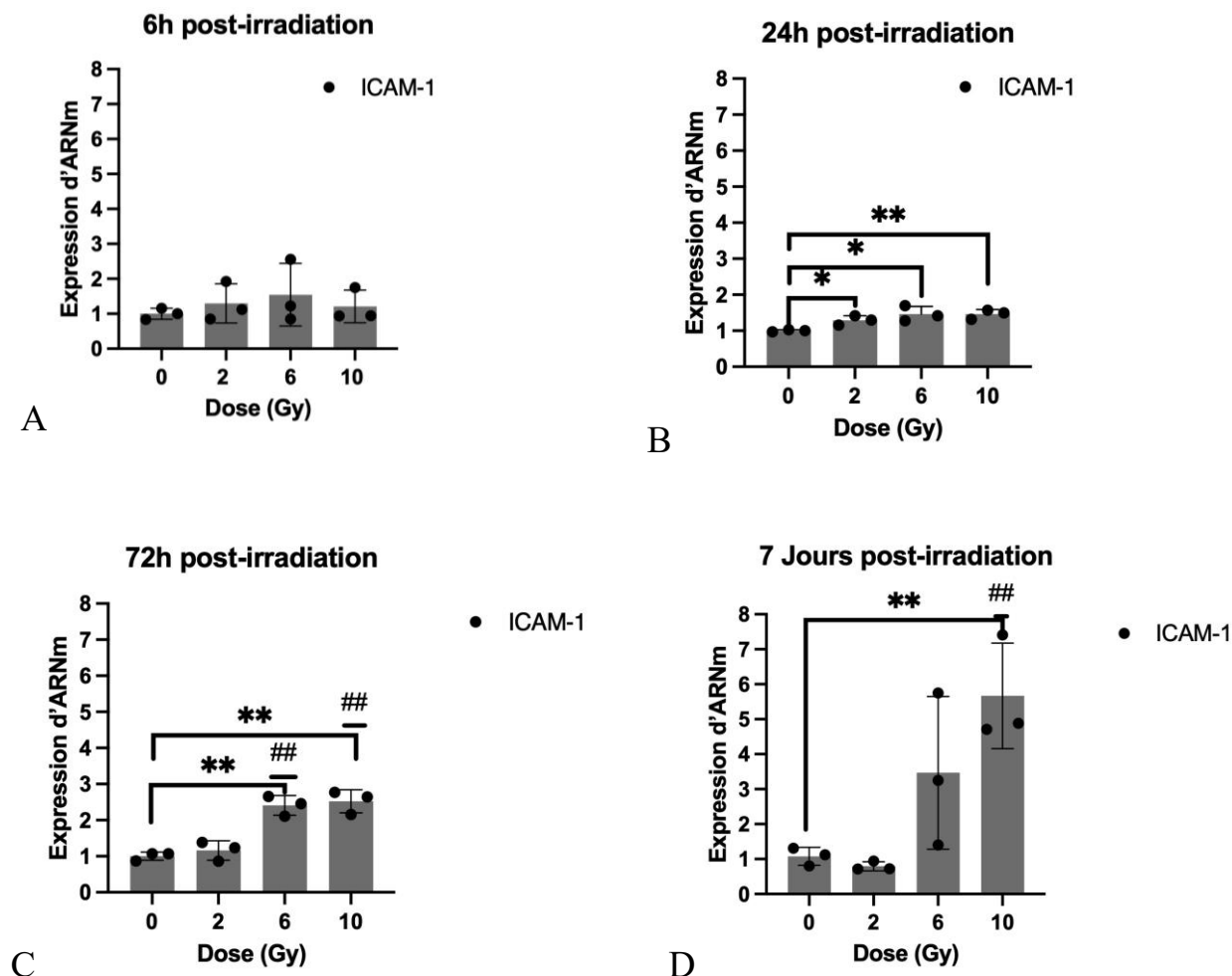


Figure V.2 Expression d'ARNm d'ICAM-1 dans les cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X. Les graphiques A, B, C et D montrent respectivement le niveau d'expression d'ARNm 6 heures, 24 heures, 72 heures et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement.

l'expression de l'ARNm d'ICAM-1 est observée 24 heures après l'irradiation des cellules. 72 heures et 7 jours post-irradiation, la surexpression d'ARNm de ce gène n'est observée que pour les doses de radiation élevées, notamment 6 Gy (72 heures) et 10 Gy (72 heures et 7 jours). Nous notons également une différence significative dans l'expression génique entre les cellules irradiées à des doses élevées et faibles (2 Gy), à l'exception des cellules irradiées à 6 Gy et analysées 7 jours après irradiation, où nous observons une grande variabilité dans les résultats obtenus à partir des trois expériences indépendantes.

Les résultats de la RT-qPCR pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8), représentés à la figure V.3 montrent que leur niveau d'expression reste inchangé jusqu'à 24h après irradiation, à l'exception de l'IL-8 où une diminution d'expression significative est observée 24h post-irradiation, pour les cellules irradiées à 10 Gy par rapport aux cellules non irradiées et aux cellules irradiées à faible dose. 72 heures après irradiation, le niveau d'expression des deux gènes croît significativement de façon dose-dépendante. Après 7 jours, seul l'ARNm de l'IL-6 est statistiquement surexprimé pour une dose de radiation de 10 Gy par rapport aux cellules non irradiées et celles irradiées à faible dose. Nous pouvons néanmoins observer une tendance à l'augmentation de l'expression d'IL-8 pour les hautes doses même si la différence n'est pas statistiquement significative.

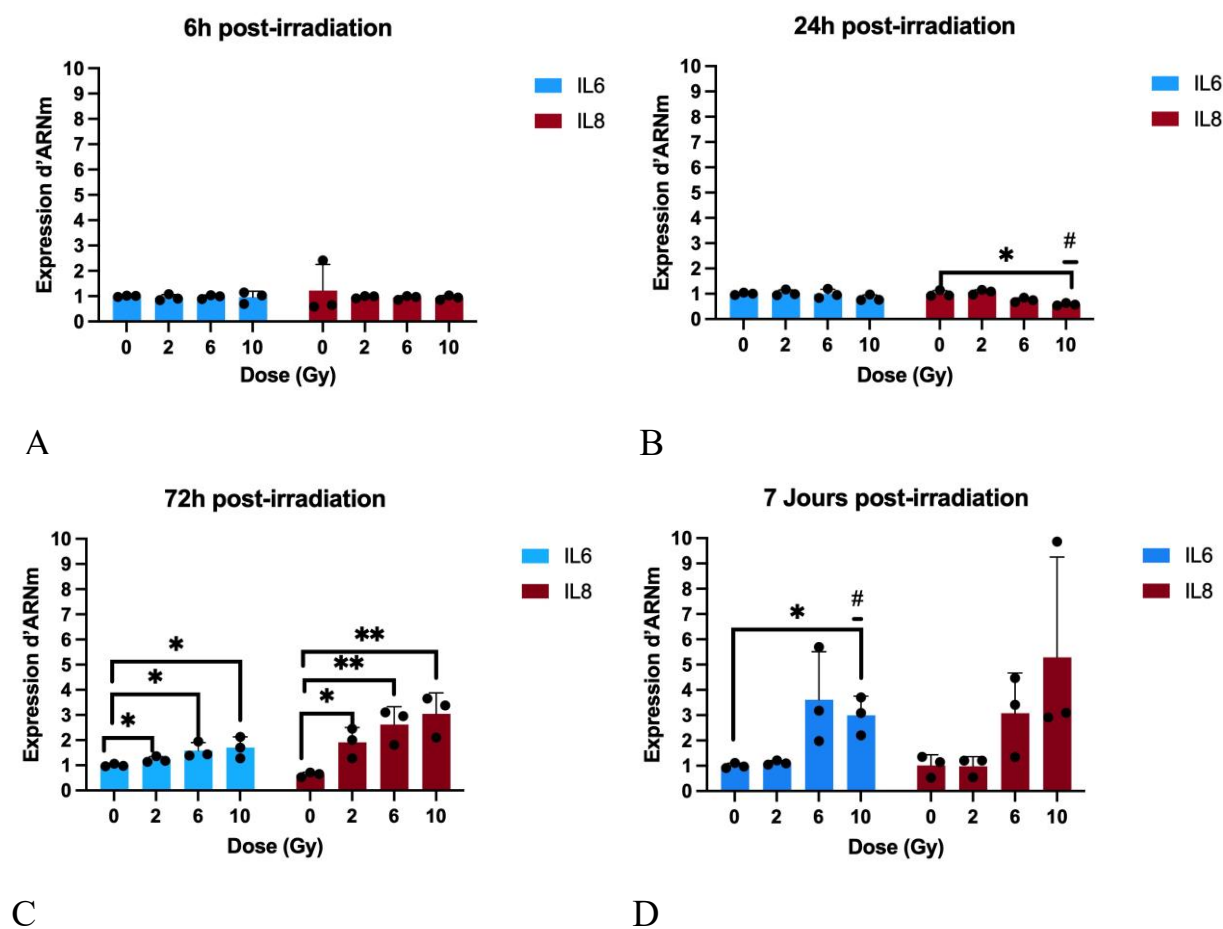


Figure V.3 Expression d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) dans les cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X. Les graphiques A, B, C et D montrent respectivement le niveau d'expression d'ARNm 6 heures, 24 heures, 72 heures et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement.

V.3. Caractérisation de la sénescence radio-induite des HMEC-1 par les rayons X

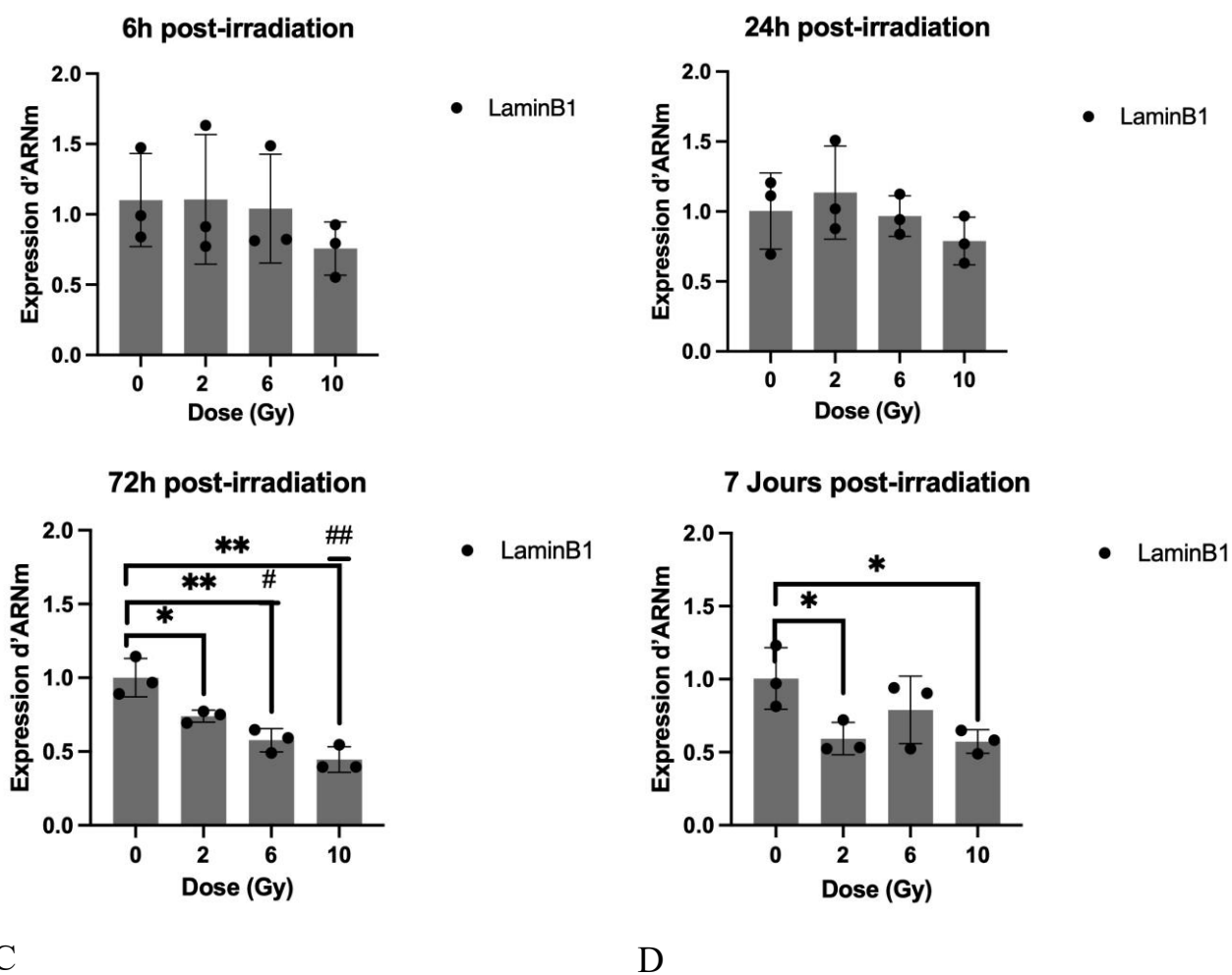
Seul une combinaison de marqueurs permet de déterminer si une cellule est sénescence ou non. Ainsi, une combinaison de plusieurs marqueurs, connus pour être modulés dans les cellules sénescences, a été caractérisée par deux méthodes distinctes. La première méthode implique la quantification relative de l'expression des ARNm de Lamine B1, du SASP (MMP3, MMP1,

IL-6 et IL-8), ainsi que du cycle cellulaire (p16 et p21). Ces résultats sont complétés par la seconde méthode qui est l'analyse de l'activité de la SA-βGal.

V.3.1. Caractérisation de la sénescence par la quantification relative de gènes

Les figures V.4, V.5 et V.6 présentent les résultats de quantification par RT-qPCR de l'expression relative des gènes associés à la sénescence en fonction de la dose de radiation (0, 2, 6 ou 10 Gy) pour des temps de 6h, 24h, 72h et 7 jours après irradiation.

Sur les graphiques de la figure V.4, nous observons que l'expression de la Lamine B1 reste inchangée pendant les 24 premières heures suivant l'irradiation, et ce, pour toutes les doses de



C

D

Figure V.4 Expression d'ARNm de Lamine B1 dans les cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X. Les graphiques A, B, C et D montrent respectivement le niveau d'expression d'ARNm 6 heures, 24 heures, 72 heures et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement.

radiation. Cependant, 72 heures après l'irradiation, une diminution significative de l'expression de la Lamine B1 est observée de façon dose-dépendante. 7 jours après irradiation, les analyses statistiques montrent une diminution significative d'expression uniquement pour les doses de 2 Gy et 10 Gy par rapport aux cellules non irradiées (0 Gy). Aucun écart significatif n'est observé entre les doses de 6 Gy et 0 Gy. Cependant, nous remarquons une variation dans les données des trois séries d'expériences de qPCR réalisées 7 jours après l'irradiation des cellules à 6 Gy.

Les résultats de RT-qPCR des ARNm du SASP, présentés à la figure V.5 montrent que l'expression des ARNm du SASP (MMP3, MMP1, IL-6 et IL-8) reste constante durant les 24 premières heures suivant l'irradiation, excepté pour l'IL-8. En effet, une diminution significative d'expression d'ARNm de l'IL-8 a été observée à 24 heures post-irradiation, pour les cellules irradiées à 10 Gy par rapport aux cellules non irradiées et aux cellules irradiées à faible dose.

72 heures après l'irradiation, nous remarquons une surexpression de l'ARNm de l'ensemble des gènes du SASP de façon dose-dépendante par rapport à 0 Gy. En outre, après 7 jours, l'ARNm de ces gènes (excepté l'IL-8) n'est surexprimé que pour les doses élevées de radiation. Les études statistiques indiquent que cette différence est significative uniquement pour les cellules irradiées à 10 Gy par rapport à 0 Gy et 2 Gy.

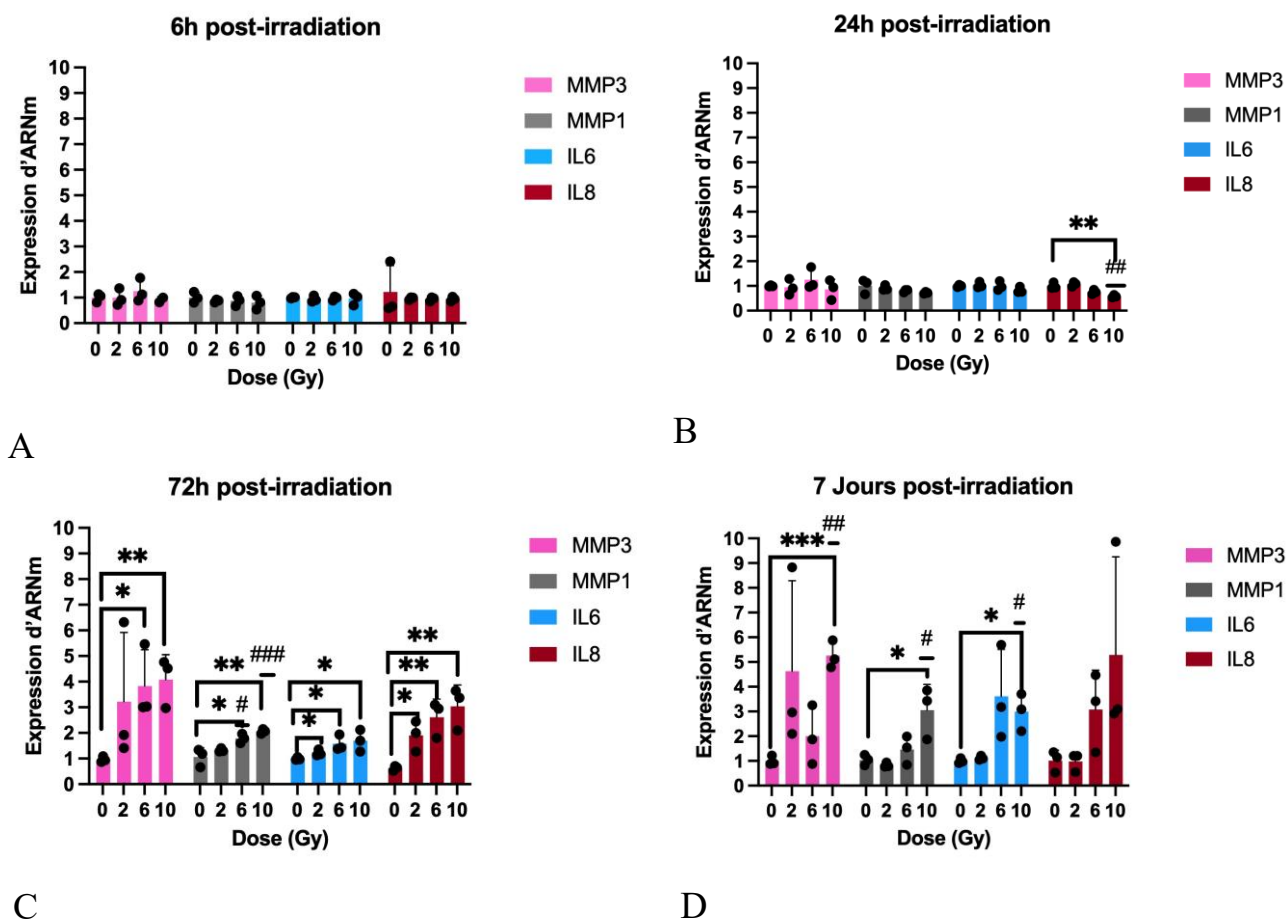


Figure V.5 Expression d'ARNm de gènes du SASP caractérisant la sénescence dans les cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X. Les graphiques A, B, C et D montrent respectivement le niveau d'expression d'ARNm 6 heures, 24 heures, 72 heures et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement.

Pour les cellules irradiées à faible dose, l'expression de l'ARNm des gènes du SASP reste quasi-constante à toutes les durées post-irradiation, à l'exception de 72 heures où nous notons une surexpression significative d'IL-6 et d'IL-8.

Les résultats de la quantification d'ARNm des gènes du cycle cellulaire (p16 et p21), représentés à la figure V.6 montrent que le niveau d'expression de p16 reste inchangé pour toutes les doses de radiation et tous les temps post-irradiation. Par ailleurs, 6 heures après irradiation, une différence significative est observée dans l'expression de p21 dans les cellules irradiées à 10 Gy par rapport aux cellules non irradiées. Ensuite, à 24 heures post-irradiation, le niveau d'expression de p21 augmente de façon dose-dépendante. 72 heures et 7 jours après irradiation, l'ARNm du gène p21 est surexprimé uniquement pour les hautes doses de radiation, avec une forte différence entre les hautes doses (6 Gy et 10 Gy) et les faibles doses (2Gy).

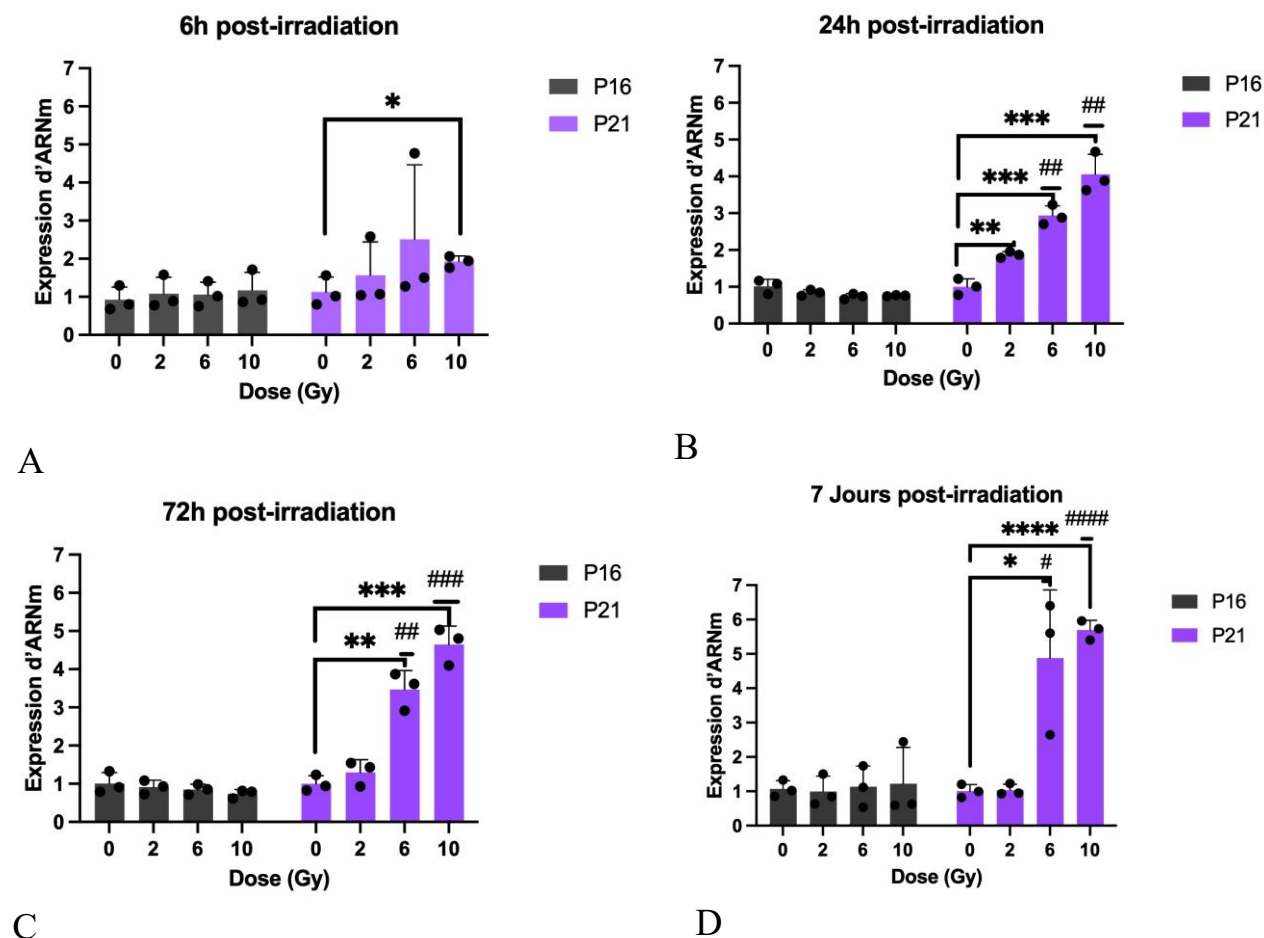
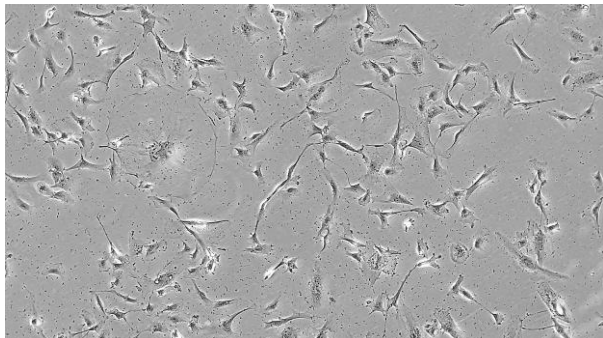


Figure V.6 Expression d'ARNm impliqués dans la régulation du cycle cellulaire dans les cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X. Les graphiques A, B, C et D montrent respectivement le niveau d'expression d'ARNm 6 heures, 24 heures, 72 heures et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement

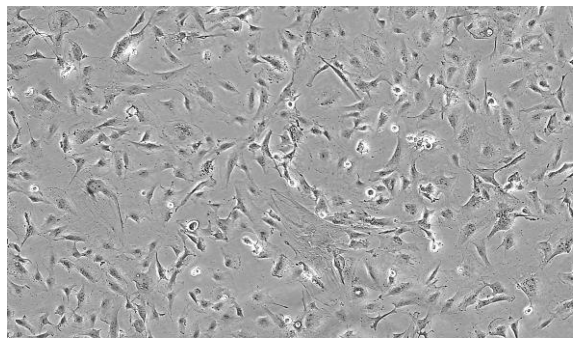
V.3.1. Caractérisation de la sénescence par la SA-βGAL

Les résultats de la SA-βGAL accompagnent ceux de la quantification relative de gènes par RT-qPCR dans le but de caractériser la sénescence des cellules irradiées à différentes doses, pour des durées post-irradiation de 4 et 7 jours.

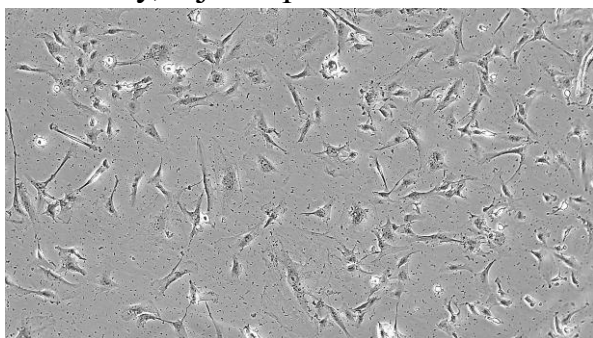
Les figures V.7 montrent les photos des HMEC-1 dans les plaques 6 puits, 4 jours et 7 jours après irradiation à différentes doses. Nous observons que pour les faibles doses de radiation, moins de cellules ont subi des modifications de taille et de forme (changements morphologiques). En revanche, pour les doses de 6 Gy, une proportion importante de cellules a augmenté de taille à 4 jours et 7 jours post-irradiation. De plus, nous notons que pour les cellules irradiées à 10 Gy, la proportion de cellules ayant subi des changements morphologiques à 4 jours semble comparable à celle à 7 jours.



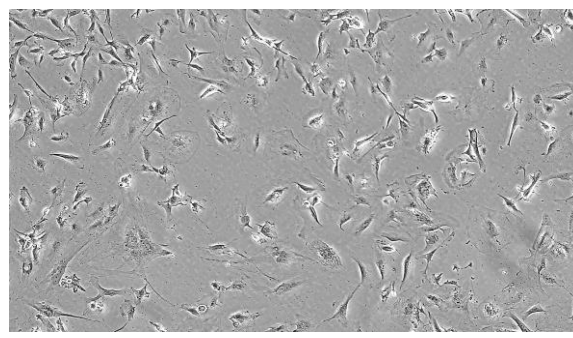
0 Gy, 4 jours post-irradiation



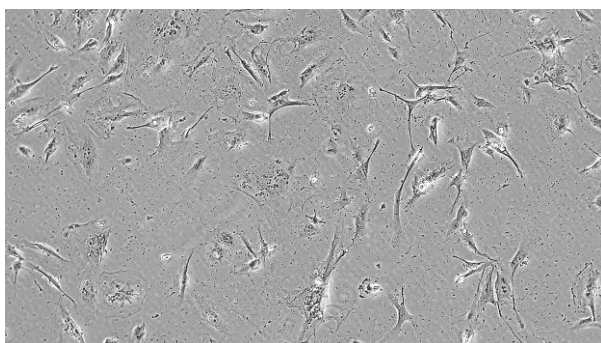
0 Gy, 7 jours post-irradiation



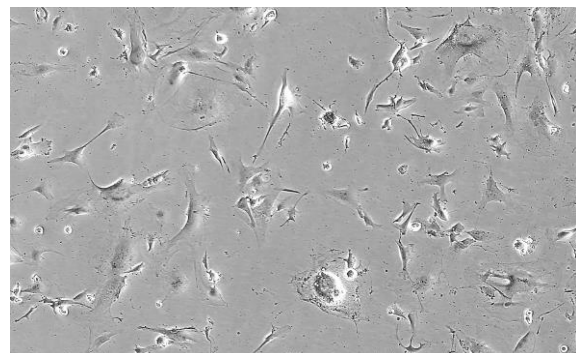
2 Gy, 4 jours post-irradiation



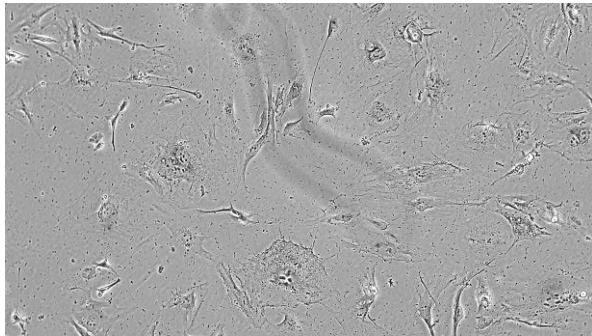
2 Gy, 7 jours post-irradiation



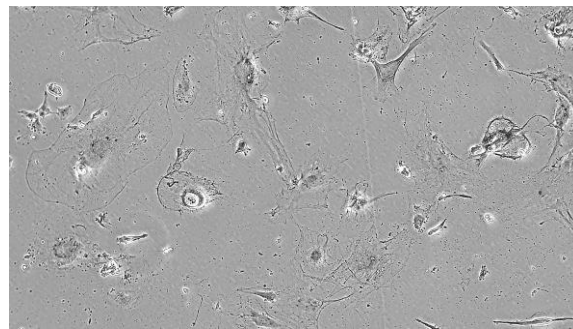
6 Gy, 4 jours post-irradiation



6 Gy, 7 jours post-irradiation



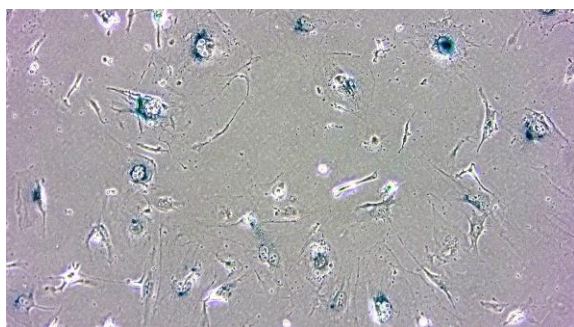
10 Gy, 4 jours post-irradiation



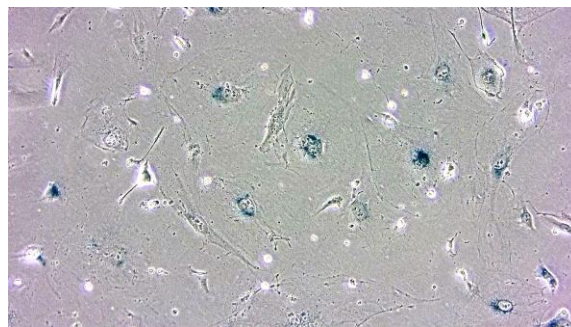
10 Gy, 7 jours post-irradiation

Figure V.7 Photographie des cellules HMEC-1 irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy par rayons X, montrant le changement morphologique des cellules en fonction de la dose de radiation et de la durée post-irradiation (4 jours sur les images de gauche et 7 jours pour les images à droite).

Les images de la figure V.8 montrent que la plupart des cellules ayant augmenté en taille, présentent une activité SA- β GAL, comme indiqué par la coloration bleuâtre observée dans les cellules. Ces observations corroborent les données du graphique (figure V.9) représentant la proportion de cellules positives à la SA- β GAL.



10 Gy, 4 jours post-irradiation



10 Gy, 7 jours post-irradiation

Figure V.8 Photographie des cellules HMEC-1 irradiées à 10 Gy par rayons X, montrant l'activité β -galactosidase à pH 6.0, grâce à la technique de coloration appelée SA- β GAL. Les points bleus montrent les cellules ayant cette activité..

La représentation graphique de la proportion de cellules positives à la SA- β GAL, 4 jours après irradiation (figure V.9 A) révèle que 1,7 %, 7 %, 40 % et 58% de cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy sont respectivement positives à la SA- β GAL. De plus, une différence significative est remarquée en fonction de la dose de radiation par rapport aux cellules non irradiées et celles irradiées à faible dose.

En outre, 7 jours après irradiation, respectivement 3%, 8%, 28% et 60% de cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy sont positives à la SA- β GAL. Cependant, une différence significative entre les cellules irradiées et celles non irradiées est observée uniquement pour les hautes doses. De plus, la proportion de cellules positives à la SA- β GAL est significativement plus importante pour les doses élevées par rapport aux cellules irradiées à 2 Gy.

Il est également remarqué que, pour les cellules irradiées à 6 Gy, la proportion de cellules positives à la SA- β GAL diminue avec le temps post-irradiation (entre 4 et 7 jours). En effet, pour les cellules irradiées à 6 Gy, il y a 40 % de cellules positives 4 jours post-irradiation, et

28% 7 jours après l'irradiation. En revanche, pour les cellules irradiées à 10 Gy, cette proportion n'est pas modifiée après 7 jours par rapport à 4 jours après irradiation.

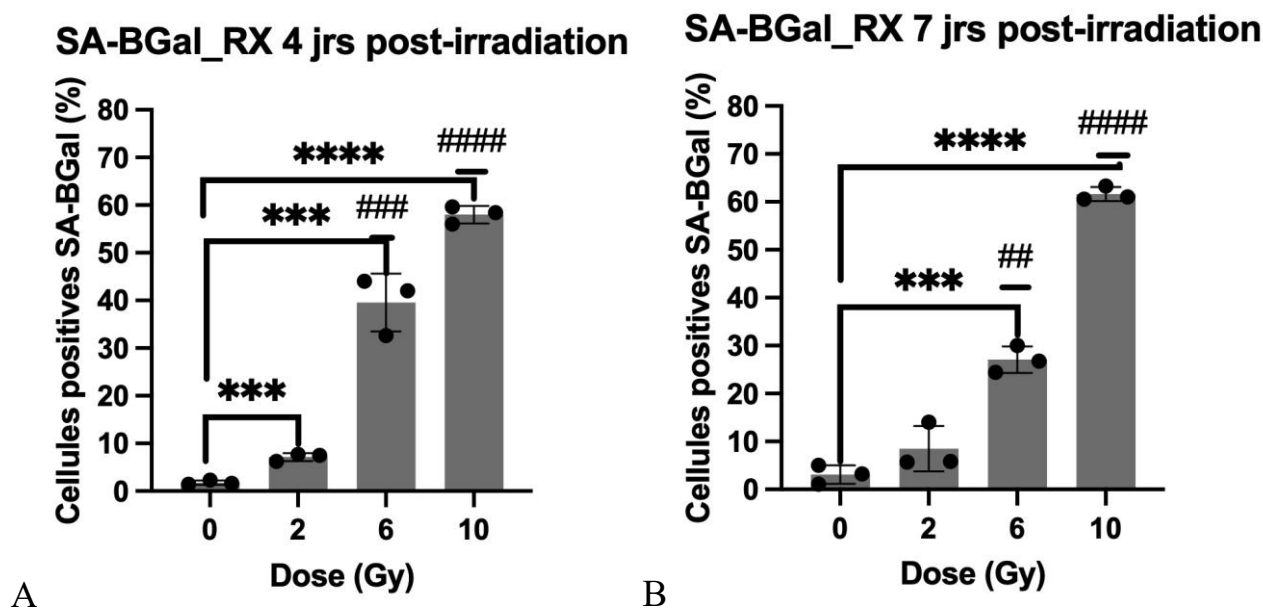


Figure V.9 Représentation graphique de la proportion de cellules positives à la SA-βGAL à pH 6.0 dans les HMEC-1, irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy. Les graphiques A et B montrent respectivement les résultats de la SA-BGAL 4 jours et 7 jours après irradiation. Les résultats de trois séries d'expériences (n=3) sont statistiquement comparés aux 0 Gy et 2 Gy, dont le niveau de significativité est montré par * et # respectivement

V.4 Caractérisation de la mort cellulaire des HMEC-1 irradiées par rayons X

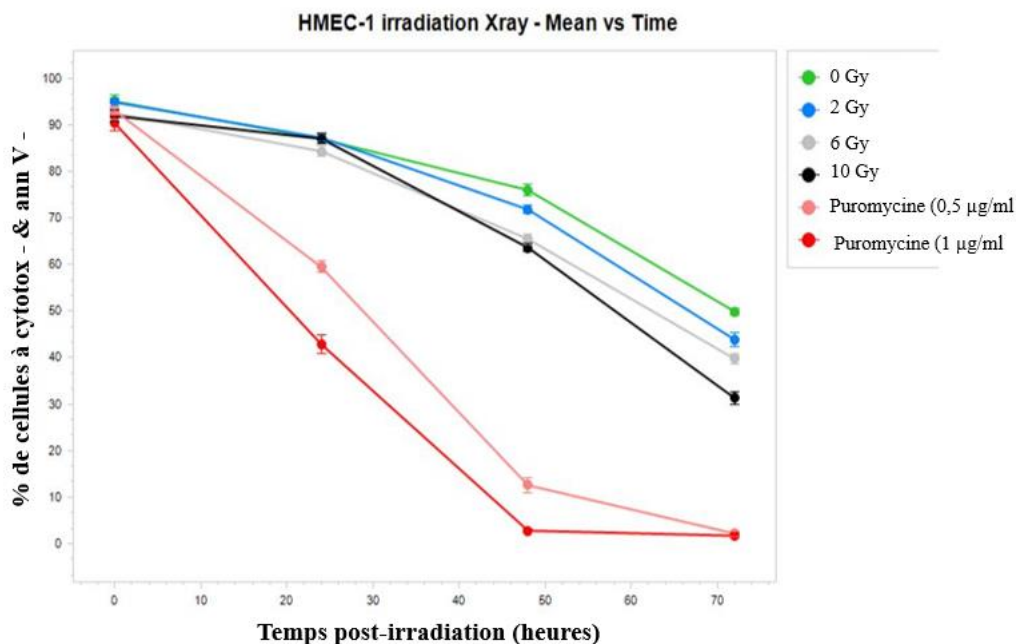
La cinétique de mort cellulaire des HMEC-1 a été réalisée par Incucyte via le marquage des cellules par des sondes spécifiques, notamment l'annexine V rouge et le cytotox vert.

L'annexine V rouge est une molécule ayant une forte affinité spécifique à la phosphatidylsérine. De plus, l'annexine V ne produit un signal fluorescent rouge, que quand elle est fixée à la phosphatidylsérine. La phosphatidylsérine, localisée à la face interne de la membrane plasmique des cellules vivantes, est transloquée uniquement à la surface des cellules en apoptose où elle est marquée par l'annexine V. L'annexine V étant imperméable à la membrane plasmique d'une cellule, elle ne se lie à la phosphatidylsérine que lorsque celle-ci est exposée sur la surface cellulaire, phénomène qui se produit lorsque les cellules sont en en apoptose. Ainsi, l'annexine V sert de marqueur pour les cellules en apoptose.

D'autre part, le cytotox vert est une sonde fluorescente qui pénètre au sein d'une cellule uniquement lorsque son intégrité membranaire est compromise. Typiquement, cela se déroule dans les cellules en nécrose ou les cellules en apoptose tardive. Une fois entré, dans la cellule, le cytotox vert se lie spécifiquement à l'ADN, et ne produit un signal fluorescent vert que lorsqu'il est fixé à l'ADN. Ces deux molécules permettent donc de différencier les cellules viables (négatives aux deux sondes), les cellules en apoptose précoce (positives uniquement à l'annexine V), les cellules mortes par d'autres mécanismes que l'apoptose ainsi que les débris d'acides nucléiques (positives uniquement au cytotox) et les cellules nécrotiques ou en apoptoses tardives (positives simultanément aux deux sondes).

Sur la figure V.10, nous observons que les cellules traitées avec la puromycine, utilisée comme contrôle positif, sont majoritairement négatives à la fois au cytotox et à l'annexine V au démarrage de l'expérience. En 48 heures, après le traitement avec 1µg/ml de puromycine, moins de 1% de cellules restent négatives aux deux sondes, tandis que cette proportion est atteinte en 72 heures pour une concentration de 0,5µg/ml de puromycine.

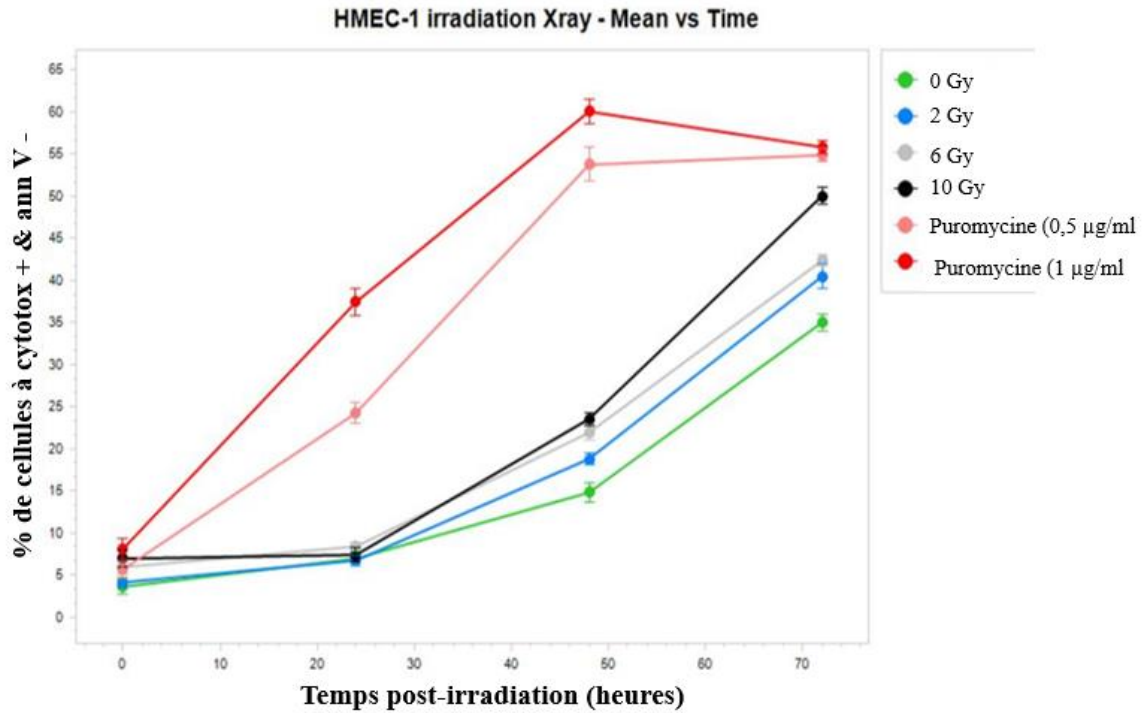
Nous remarquons que, pour les cellules irradiées respectivement à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy, la proportion de cellules viables (négatives aux deux sondes) est quasiment identique 24 heures après irradiation. Après 48 heures, la proportion de cellules viables diminue en fonction de la dose de radiation. De façon étonnante, une diminution de la proportion de cellules viables au cours du temps est également observée pour les cellules non irradiées. En effet, cette proportion est proche de 95% à 0h, et est inférieure à 50 % 72 heures après le début de l'expérience.



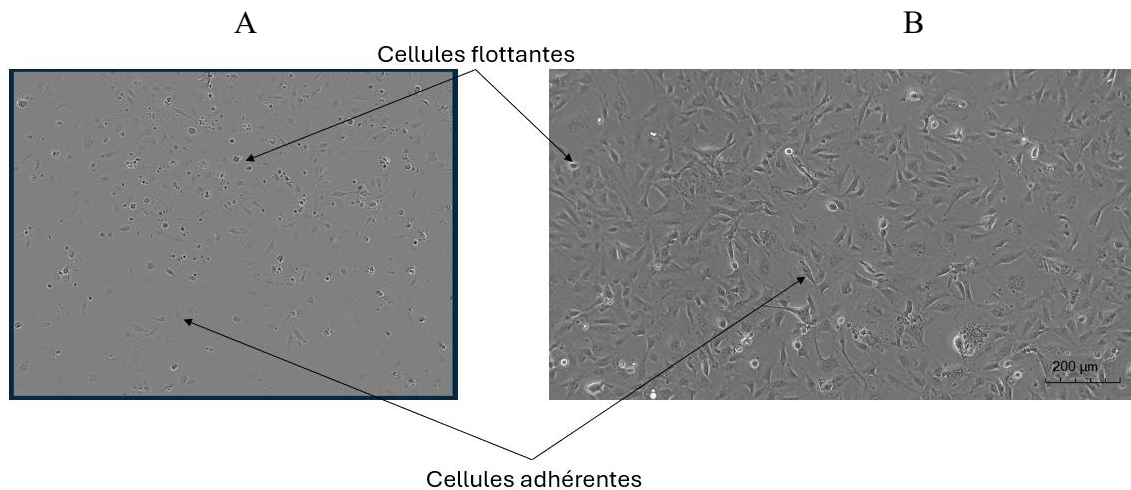
FigureV.10 Représentation graphique de la proportion de cellules viables (négatives au cytotox et annexin V), durant 3 jours après irradiation. Les couleurs rouge foncé et rouge claire montrent la proportion de cellules viables au fil du temps après traitement des cellules à 1 µg/ml et 0,5 µg/ml de puromycine, respectivement. Les couleurs verte, bleue, grise et noire montrent la même information pour les cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy, respectivement.

La figure V.11 représente la proportion de cellules positives au cytotox et négatives pour l'annexine V. D'après la littérature, cette figure devrait représenter la proportion de matériel génétique nu, sans membrane plasmique ou mourant par un autre processus que l'apoptose (signal cytotox positif et annexin négatif). Cependant, l'examen visuel des images acquises par le programme de l'Incucyte révèle que les structures cytotox+/annexin- correspondent bien à des cellules ayant une morphologie normale (avec membrane). De plus la proportion de cellules mortes trois jours après le traitement avec les deux sondes, est très élevée par rapport aux cellules n'ayant pas été exposée à ces sondes (figureV.12). Nous faisons donc le choix de considérer cette catégorie comme des cellules mourant par d'autres mécanismes que l'apoptose, tout en étant conscients que cette expérience reste à optimiser. Nous observons que les cellules meurent plus rapidement après un traitement avec la puromycine, et ce, en fonction de la concentration. De plus, pour les cellules irradiées, nous remarquons que la proportion de cellules positives au cytotox et négatives à l'annexine dépend de la dose de radiation, et cette différence apparait plus nettement 48 heures après l'irradiation. Il est également intéressant de noter que le pourcentage de cellules mortes après 72 heures, pour les irradiations de 10 Gy tend vers la valeur du contrôle positif. De plus, les cellules non irradiées deviennent également

positives au cytotox au fil du temps, ce qui suggère que le design de l'expérience entraîne une certaine toxicité, qui pourrait être due aux concentrations de cytotox et d'annexine utilisées.



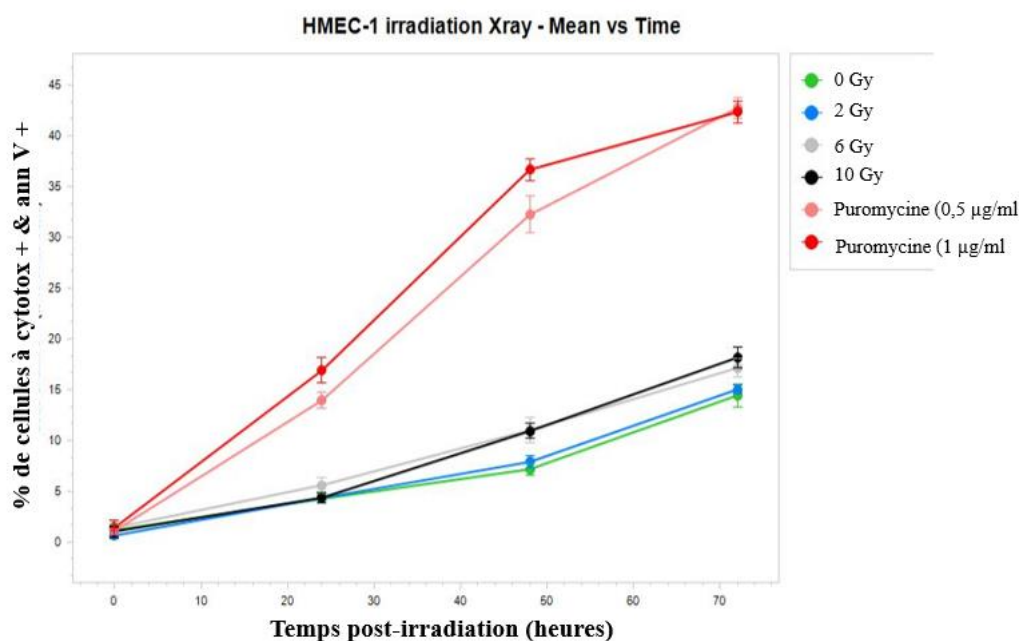
FigureV.11 Représentation graphique de la proportion de cellules mortes par des mécanismes autres que l'apoptose (positives au cytotox et négatives à l'annexin V), durant 3 les jours après irradiation. Les couleurs rouge foncé et rouge claire montrent la proportion de cellules mortes au fil du temps après traitement des cellules à 1 µg/ml et 0,5 µg/ml de puromycine, respectivement. Les couleurs verte, bleue, grise et noire montrent la même information pour les cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy, respectivement



FigureV.12 Photographies des cellules HMEC-1 non irradiées trois jours après traitement avec le cytotox et l'annexine V, prise par l'Incucyte (image A), et trois jours après le repiquage cellulaire sans changement de milieu et en absence de cytotox et d'annexin V, prise au microscope optique (image B). Les cellules viables sont adhérentes à la surface de la plaque, tandis que les cellules mortes flottent dans le milieu de culture. La proportion de cellules flottantes visibles dans les puits après le traitement avec le cytotox et l'annexine V est plus élevée que celle des puits n'ayant pas été exposées à ces sondes.

La figure V.13 représente l'évolution de la proportion de cellules positives pour le cytotox et l'annexine V, correspondant aux cellules en apoptose tardive et/ou en nécrose. Il est observé qu'après 72 heures, 40% des cellules traitées avec la puromycine (0.5 et 1 µg/ml) sont positives à la fois pour l'annexine V et le cytotox. De plus, pour les cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy, respectivement 13%, 14%, 18% et 19% des cellules présentent une positivité pour les deux sondes, 72 heures après le début de l'expérience. De façon étonnante, une augmentation progressive de la proportion de cellules positives pour le cytotox et l'annexine V est également observée pour les cellules non irradiées.

Un nombre réduit de cellules a été quantifié par le programme Incucyte dans la catégorie de cellules positives à l'annexine V et négatives au cytotox (apoptose précoce). Les résultats de cette classification ne sont pas présentés car ils sont moins pertinents.



FigureV.13 Représentation graphique de la proportion de cellules mortes par apoptose et/ou par nécrose (positives au cytotox et à l'annexine V), durant 3 jours après l'irradiation. Les couleurs rouge foncé et rouge claire montrent la proportion de cellules mortes par apoptose et/ou nécrose au fil du temps, après le traitement des cellules à 1 µg/ml et 0,5 µg/ml de puromycine, respectivement. Les couleurs verte, bleue, grise et noire montrent les mêmes informations pour les cellules irradiées à 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy et 10 Gy, respectivement.

VI. Discussion

L'objectif principal de cette recherche était d'analyser par des expérimentations *in vitro*, les effets de l'irradiation par rayons X sur les cellules endothéliales immortalisées (HMEC-1), en se focalisant sur les mécanismes d'inflammation, de sénescence et d'apoptose. Nos résultats mettent en lumière les influences de la dose de radiation et du temps post-irradiation sur ces processus cellulaires, comparant les effets aux cellules non irradiées, 6 h, 24 h, 72 h et 7 jours après l'irradiation.

Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression d'ICAM-1, à partir de 6 heures après l'irradiation à 10 Gy, et 24 heures après l'irradiation pour une dose minimale de 2 Gy. Cette expression continue à augmenter 72 heures et 7 jours post-irradiation, particulièrement avec des doses élevées de rayons X (6 Gy et 10 Gy).

De plus, pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8), une augmentation significative de l'expression a été observée 72 heures après l'irradiation de façon dose-dépendante, pour une dose minimale de 2 Gy, persistante pour l'IL-6 après 7 jours. Ces résultats suggèrent que des doses faibles de radiation induisent une inflammation transitoire, détectable 24 heures après l'irradiation, et des doses élevées induisent des réponses inflammatoires prolongées.

Dans le contexte radiothérapeutique, ces résultats suggèrent que l'irradiation des HMEC-1 par rayons X à une dose minimale de 2 Gy induit de l'inflammation, qui se manifeste 24 heures après l'irradiation. 72 heures après l'irradiation, l'inflammation est observée uniquement pour les doses élevées de radiation (6 et 10 Gy) et persiste jusqu'à 7 jours après l'irradiation. Nous pensons que l'irradiation des HMEC-1 à 2 Gy induit des lésions endothéliales qui sont réparées par des mécanismes propres aux cellules endothéliales au cours des 72 heures suivant l'irradiation. En revanche, les doses de radiation de 6 Gy et 10 Gy provoquent des dégâts significatifs aux cellules endothéliales, plus difficiles à réparer, ce qui entraîne une inflammation chronique des HMEC-1 pour ces doses, qui est trois fois plus importante à 7 jours qu'à 24 heures, et semble donc s'amplifier au cours du temps pour les hautes doses.

Cette hypothèse peut être vérifiée par l'étude de la cinétique de réparation des dommages à l'ADN après l'irradiation. Cela pourrait être réalisé via la détection par Western Blot ou immunofluorescence de l'abondance protéique de p53 et de γ H2AX, impliquées dans la réparation des dommages doubles brins de l'ADN et d'autres protéines. Nous pensons que l'augmentation de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules endothéliales induite par l'irradiation pourrait être impliquée dans l'augmentation et le maintien de l'inflammation des cellules endothéliales, de façon autocrine. Afin de tester cette hypothèse, dans un premier temps, le niveau de sécrétion de ces molécules pro-inflammatoires pourrait être testé par ELISA, à différentes durées post-irradiation. Dans un second temps, l'utilisation d'anticorps bloquants spécifiques de ces molécules inflammatoires pourrait être envisagé, afin de bloquer spécifiquement l'action de ces molécules pro-inflammatoires.

De plus, l'augmentation du niveau d'inflammation au fil du temps peut être due à d'autres facteurs tels que via l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué notamment dans l'inflammation endothéliale (60).

Nos résultats sont en accord avec certaines études ayant montré que la sécrétion de cytokines et la surexpression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales dépendaient de la dose et de la durée post-irradiation (21). Maria E. Rodriguez-Ruiz et al. ont également montré que les cellules endothéliales lymphatiques tumorales subissent une induction de l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 en fonction de la dose et du temps post-irradiation (61). Cette observation dans les tumeurs sollicite une exploration plus approfondie du mécanisme de l'activation des cellules endothéliales saines par rapport aux cellules endothéliales cancéreuses, afin de développer une cible thérapeutique spécifique aux cellules et tissus sains et de diminuer l'inflammation endothéliale spécifiquement dans les tissus sains.

Seule une combinaison de marqueurs permet de caractériser la sénescence cellulaire. En effet, aucun marqueur ne permet à lui seul d'affirmer qu'une cellule est sénescence. Ainsi, dans ce travail, la sénescence radio-induite a été évaluée par l'analyse de plusieurs marqueurs clés observés en cas de sénescence cellulaire. Nous avons, par qPCR, analysé l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (p16 et p21), évalué la diminution de l'expression de la lamine B1 et quantifié l'expression d'ARNm de gènes du SASP. Ces résultats ont été corroborés par des observations morphologiques des cellules et la mesure de l'activité SA- β GAL. La sénescence prématurée des cellules endothéliales pourrait être impliquée dans l'apparition d'effets secondaires radio-induits, et notamment augmenter le risque de développer des maladies cardiovasculaires et/ou de développer des dégâts au sein des tissus irradiés (6).

Les résultats révèlent que l'irradiation des HMEC-1 par rayons X à une dose de 10 Gy augmente l'expression de p21 6 heures après irradiation. Une surexpression dose-dépendante de p21 est observée. Cette surexpression persiste à 72 heures et 7 jours uniquement pour les doses de 6 Gy et 10 Gy, mais pas pour la dose de 2 Gy. Il semblerait donc que l'irradiation des HMEC-1 à faible dose induit des lésions cellulaires qui se manifestent rapidement. Nous pensons qu'au cours du temps, ces lésions seraient réparées ou impacteraient beaucoup moins de cellules qu'avec les hautes doses, permettant à certaines cellules de reprendre leur cycle cellulaire. Cette hypothèse expliquerait l'augmentation de l'expression de p21 observée 24 heures après l'irradiation à 2 Gy, et sa diminution dans les durées suivantes. Cette observation est cohérente avec celle rapportée dans une étude antérieure, qui a montré que l'expression de p21 et p53 augmente au fil du temps après une irradiation des cellules endothéliales à 15 Gy (22).

En revanche, l'expression de p16 n'a pas été modifiée par l'irradiation. Ces résultats suggèrent que l'irradiation pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire des HMEC-1, et ce par l'intermédiaire de p21, qui serait dose-dépendant, et qui dépendrait également de la durée post-irradiation. Une diminution de l'expression d'ARNm de la lamine B1 et une surexpression des gènes du SASP ont été observées à 72 heures post-irradiation de façon dose-dépendante, persistant à 7 jours pour des doses de 10 Gy.

Nos résultats montrent que l'expression de p21 est corrélée à la diminution de l'expression de la lamine B1 et à l'augmentation de l'expression des ARNm des molécules du SASP à partir de 72 heures post-irradiation, ceci, dépendant de la dose de radiation. De plus, l'activité de la SA- β GAL a montré une augmentation dose-dépendante des cellules sénescence à partir de 4 jours post-irradiation, confirmant les résultats de la RT-qPCR.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'irradiation des HMEC-1 induit leur sénescence prématurée 4 jours après l'irradiation, et ce de façon dose-dépendante. Cette sénescence cellulaire semble persister à 7 jours post-irradiation uniquement pour les cellules irradiées à 6 et 10 Gy, et ce de manière bien plus prononcée à 10 Gy par rapport à 6 Gy. Plus important encore, les changements morphologiques des HMEC-1 observés sur nos images prises, permettent une bonne compréhension des effets dose-dépendants des rayons X sur les cellules. L'irradiation des HMEC-1 à faible dose entraîne peu de modifications morphologiques des cellules entre 4 et 7 jours. En revanche, l'irradiation à hautes doses de rayons X induit d'importants effets sur la morphologie cellulaire au fil du temps post-irradiation.

La diminution de la proportion de cellules positives à la SA- β GAL entre 4 jours et 7 jours après l'irradiation à 6 Gy, peut s'expliquer par le fait qu'à 4 jours, plus de la moitié des cellules étaient négatives à la SA- β GAL. Nous postulons ainsi qu'au fil du temps, les cellules initialement négatives à la SA- β GAL prolifèrent entre le jour 4 et le jour 7, entraînant une diminution de la proportion de cellules positives à la SA- β GAL de 40% à 28% entre 4 et 7 jours après l'irradiation à 6 Gy. Cependant, pour les cellules irradiées à 10 Gy, plus de la moitié des cellules sont positives à la SA- β GAL après 4 jours. Nous pensons ainsi que certaines cellules ont

totallement perdu leur faculté de croissance et celles qui prolifèrent au fil du temps sont moins nombreuses, expliquant le fait que la proportion de cellules positives à la SA- β GAL entre 4 et 7 jours reste quasi-constante. Ces observations indiquent que la durée post-irradiation et la dose de radiation ont un impact sur la population cellulaire. Nous pensons que plus le temps s'écoule, plus les cellules non endommagées prolifèrent, mais cette proportion reste faible après une irradiation à haute dose de rayons X.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'analyse de la prolifération cellulaire, comme par la technique de marquage à l'EdU, permettant de mesurer le taux de prolifération cellulaire.

Les études menées par B. Baselet et al. montrent qu'à 24 heures après l'irradiation des cellules endothéliales de l'altère coronaire avec une dose unique de rayons X, le nombre de cellules en phase G0/G1 augmente en fonction de la dose, tandis que la proportion de cellules en phase G2/M diminue (62). Cela indique qu'après 24 heures, moins de cellules sont en phase de division cellulaire (G2/M), elles sont globalement en état d'arrêt du cycle cellulaire, ce qui explique l'augmentation du nombre en phase G0/G1. La même étude révèle une augmentation du nombre de cellules en phase S, 7 jours après l'irradiation des cellules à 2_Gy de rayons X, indiquant le redémarrage du cycle cellulaire 7 jours après l'irradiation. Ces résultats sont cohérents avec nos observations : nous constatons en effet qu'à 7 jours, les cellules irradiées à 2_Gy expriment p21 au même niveau que les cellules non irradiées, indiquant un état de non-arrêt ou de reprise du cycle cellulaire.

Nous avons analysé l'effet de l'irradiation par rayons X dans l'induction de la mort cellulaire, et ce par le marquage avec l'annexine V rouge et le cytotox vert, permettant de différencier les cellules viables, les cellules en apoptose précoce et/ou tardive, et celles en nécrose. La puromycine a été utilisée comme le contrôle positif de cette étude, et les résultats ont montré leur toxicité sur les HMEC-1, faisant de cette molécule un contrôle positif pertinent pour la caractérisation de la mort cellulaire.-

Nos résultats suggèrent que la proportion de cellules viables diminue de façon dose-dépendante et en fonction du temps post-irradiation. De façon surprenante, une diminution de la proportion de cellules viables a également été observée dans les cellules non irradiées, suggérant une toxicité potentielle des sondes utilisées.

Nous pensons que la membrane des cellules HMEC-1 est perméable au cytotox, et que celui-ci a induit des dommages aux cellules entraînant leur mort par d'autres mécanismes que l'apoptose. En effet, nos résultats suggèrent que les HMEC-1 meurent majoritairement par d'autres mécanismes que l'apoptose, tels que la nécrose, l'autophagie ou d'autres, mais cela est probablement causé par une toxicité des sondes utilisées, ainsi qu'à une perméabilité du cytotox au sein de notre type cellulaire.

Une des limites principales de cette étude est que l'analyse de la mort cellulaire n'a été réalisée qu'une seule fois et ces observations nécessitent une validation par des études supplémentaires pour confirmer la toxicité du cytotox et/ou de l'annexine V sur les HMEC-1. Puisque la technique utilisée dans ce travail semble, à cause de sa toxicité, peu appropriée pour caractériser la mort cellulaire dans les HMEC-1, la mort cellulaire pourrait être caractérisée par d'autres méthodes. Par exemple, cela pourrait être réalisée par cytométrie en flux en utilisant le marquage propidium-iodide (PI) et annexine V. De plus, l'analyse de l'apoptose pourrait être approfondie par des techniques complémentaires, telles que la détection par Western blot des caspases actives (caspase-3/7, -8, -9) responsables de l'apoptose.

VII. Conclusion et perspectives

Cette recherche visait à étudier *in vitro*, les effets de l'irradiation des rayons X sur les cellules endothéliales HMEC-1, et ce en se focalisant sur les mécanismes d'inflammation, de sénescence, et de mort cellulaire radio-induite.

En conclusion, les résultats de cette étude révèlent des réponses distinctes des cellules endothéliales HMEC-1 aux rayons X, qui dépendent en fonction de la dose et du temps post-irradiation dans l'induction des phénomènes d'inflammation, de sénescence et de mort cellulaire.

Nous avons montré que l'irradiation par rayons X induit de l'inflammation dans les HMEC-1 de façon dose-dépendante. Cette inflammation était chronique uniquement pour les doses élevées de radiation. De plus, nous avons observé que l'irradiation affecte probablement la prolifération cellulaire des HMEC-1, comme le suggère la surexpression de p21 de façon dose-dépendante, et qui dépendait de la durée post-irradiation. Nous avons également montré que l'irradiation des HMEC-1 induit leur sénescence prématurée, qui semble se manifester à partir de 4 jours post-irradiation, et ce de façon dose- et temps-dépendante. Nos résultats suggèrent que les doses plus faibles semblent induire des lésions réparables ou dans une proportion plus faible de cellules, permettant une reprise du cycle cellulaire, tandis que les doses élevées provoquent des dommages irréversibles entraînant une sénescence prolongée.

La mort cellulaire a été testée par double marquage cytotox/annexine V, via analyse par l'incucyte. La puromycine utilisée dans cette étude comme contrôle positif a montré une toxicité dose-dépendante. Une augmentation significative de la mortalité cellulaire a été observée trois jours post-irradiation, avec un effet dose-dépendant. De façon étonnante, une forte diminution de la viabilité a également été observée dans les cellules non irradiées, probablement induite par le cytotox et/ou l'annexine V. Ainsi, nous soulignons une potentielle toxicité du cytotox et/ou de l'annexine V dans les HMEC-1, nécessitant une validation complémentaire. Nous suggérons donc l'utilisation d'autres méthodes pour tester l'apoptose/mort cellulaire dans ce type cellulaire, comme par exemple le marquage par l'iodure de propidium et l'annexine V par cytométrie en flux, ou par l'étude de l'abondance protéique des caspases impliquées dans l'apoptose.

Ces résultats serviront de base dans l'étude des effets secondaires induits par la radiothérapie sur les cellules endothéliales. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents à la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation.

Nous recommandons des études comme :

- L'analyse de la cinétique de réparation des dommages à l'ADN après l'irradiation, en utilisant des marqueurs spécifiques tels que γ H2AX et p53 via des techniques comme le western blot ou la microscopie confocale.
- L'exploration des mécanismes moléculaires et les voies de signalisation associées à la sénescence radio-induite, via l'analyse du cycle cellulaire.
- Approfondir l'implication des cytokines pro-inflammatoires dans l'inflammation, via l'inhibition de ces molécules, et également la quantification de l'expression d'autres gènes pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou l'IL-1 β .

Le processus d'adhérence et de transmigration des leucocytes sur les cellules endothéliales lors de l'inflammation peut également être approfondi par des tests fonctionnels d'adhérence et de transmigration.

Une étude approfondie des mécanismes d'induction de l'inflammation, de la sénescence et de la mort cellulaire radio-induites au sein des cellules endothéliales pourrait révéler des cibles thérapeutiques pour protéger les cellules endothéliales. Des stratégies pour développer des inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires (comme IL-6 et IL-8) et des inhibiteurs de

molécules d'adhésion (ICAM-1) pour réduire l'adhésion des leucocytes et l'inflammation endothéliale pourraient être mises en place.

VIII. Bibliographie

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *PubMed, Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Eurobuch.ch, Le Cancer - Maurice Tubiana et Que sais-je ? ISBN :9782130534709. Disponible à la Bibliothèque Universitaire Moretus Plantin (BUMP Unamur).
3. International Agency for Research on Cancer (IARC), Cancer Topics. Disponible sur: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics>. Dernière Consultation: 29 janv. 2024.
4. World Health Organization (WHO), Cancer. Disponible sur: <https://www.who.int/health-topics/cancer>. Dernière consultation : 29 jan. 2024.
5. World Health Organization (WHO), Cancer : une charge toujours plus lourde dans le monde et des besoins en services croissants. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Dernière consultation 31 jan. 2024.
6. Venkatesulu BP, Mahadevan LS, Aliru ML, Yang X, Bodd MH, Singh PK, et al. Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms. *JACC Basic Transl Sci*. 1 août 2018;3(4):563-72. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.01.014. eCollection 2018 Aug.
7. Huynh-Le MP, Karunamuni R, Moiseenko V, Farid N, McDonald CR, Hattangadi-Gluth JA, et al. Dose-dependent atrophy of the amygdala after radiotherapy. *Radiother Oncol*. 1 juill 2019;136:44-9. doi: 10.1016/j.radonc.2019.03.024. Epub 2019 Apr 6.
8. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 1 sept 2003;4(9):529-36. doi: 10.1016/s1470-2045(03)01191-4.
9. Van der Meer DJ, van der Graaf WTA, van de Wal D, Karim-Kos HE, Husson O. Long-term second primary cancer risk in adolescent and young adult (15-39 years) cancer survivors: a population-based study in the Netherlands between 1989 and 2018. *ESMO Open*. 1 janv 2024;9(1):102203. doi: 10.1016/j.esmoop.2023.102203. Epub 2024 Jan 2.
10. DeZorzi C. Radiation-Induced Coronary Artery Disease and Its Treatment: A Quick Review of Current Evidence. *Cardiol Res Pract*. 16 oct 2018;2018:e8367268. doi: 10.1155/2018/8367268. eCollection 2018.
11. Teh BS, Woo SY, Butler EB. Intensity Modulated Radiation Therapy (IMRT): A New Promising Technology in Radiation Oncology. *The Oncologist*. 1999;4(6):433-42. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.4-6-433>
12. Daly-Schweitzer N, Juliéron M, Gan Tao Y, Moussier A, Bourhis J. La radiothérapie conformationnelle en modulation d'intensité (RCMI) : vers un nouveau standard en radiothérapie des cancers ORL ? *Ann Fr Oto-Rhino-Laryngol Pathol Cervico-Faciale*. 1 nov 2011;128(5):284-91.
13. Ahervo H, Korhonen J, Lim Wei Ming S, Guan Yunqing F, Soini M, Lian Pei Ling C, et al. Artificial intelligence-supported applications in head and neck cancer radiotherapy treatment planning and dose optimisation. *Radiography*. 1 mai 2023;29(3):496-502. doi: 10.1016/j.radi.2023.02.018. Epub 2023 Mar 6.

14. Sébastien P. Université de Namur, Faculté des sciences, département de physique (LARN). Interaction rayonnement-matière vivante (SPHYM101), 2022-2023. Chapitre III.
15. Wang L, Rivas R, Wilson A, Park YM, Walls S, Yu T, et al. Dose-Dependent Effects of Radiation on Mitochondrial Morphology and Clonogenic Cell Survival in Human Microvascular Endothelial Cells. *Cells*. janv 2024;13(1):39. doi: 10.3390/cells13010039
16. Bourthoumieu S. Table ronde : ondes et rayonnements : effets cellulaires: Ondes électromagnétiques : définition, spectre et propriétés. *Morphologie*. 1 juill 2007;91(293):80.
17. Sébastien P. Université de Namur, Faculté des sciences, département de physique (LARN). Radiobiologie (SPHYM-140). 2022-2023.
18. Wang H, Jiang H, Van De Gucht M, De Ridder M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers*. janv 2019;11(1):112. DOI: 10.3390/cancers11010112
19. Biologie cellulaire et moléculaire de Karp 4e édition - Gérald Karp, Janet Isawa, Wallace Marshall [Internet]. [cité 16 mars 2024]. ISBN 9782807308015.
20. Ghandour Z. Analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en oeuvre dans les vaisseaux sanguins par les composants des fibres élastiques. HAL Id: tel-00949211 <https://theses.hal.science/tel-00949211>
21. Soysouvanh F. Sénescence cellulaire radio-induite: application à l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques. HAL Id: tel-03139851 <https://theses.hal.science/tel-03139851>
22. Audrey L. a Etude mécanistique & fonctionnelle de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires. Thèse de Doctorat, Université de Nantes.
23. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 1 mai. 2016;248:97-109. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007. Epub 2016 Mar 9.
24. Id H. lignées de cellules endothéliales humaines comme modèle de l'organo-spécificité: étude du rôle des chimiokines et applications à l'inflammation cutanée. Thèse de Doctorat, Université d'Orleans
25. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. sept 2000;407(6801):249-57. doi: 10.1038/35025220.
26. Wijerathne H, Langston JC, Yang Q, Sun S, Miyamoto C, Kilpatrick LE, et al. Mechanisms of radiation-induced endothelium damage: Emerging models and technologies. *Radiother Oncol*. 1 mai 2021;158:21-32.
27. Wijerathne H, Langston JC, Yang Q, Sun S, Miyamoto C, Kilpatrick LE, et al. Mechanisms of radiation-induced endothelium damage: Emerging models and technologies. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. mai 2021;158:21-32. Published online 2021 Feb 11. doi: 10.1016/j.radonc.2021.02.007

28. Korpela E, Liu SK. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat Oncol.* 18 déc 2014;9(1):266. Korpela and Liu *Radiation Oncology* 2014, 9:266. <http://www.ro-journal.com/content/9/1/266>
29. Johansson S, Svensson H, Denekamp J. Timescale of evolution of late radiation injury after postoperative radiotherapy of breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol.* 1 oct 2000;48(3):745-50. doi: 10.1016/s0360-3016(00)00674-x.
30. Sia J, Lim Joon D, Viotto A, Mantle C, Quong G, Rolfo A, et al. Toxicity and Long-Term Outcomes of Dose-Escalated Intensity Modulated Radiation Therapy to 74Gy for Localised Prostate Cancer in a Single Australian Centre. *Cancers.* 1 déc 2011;3:3419-31. DOI:10.3390/cancers3033419
31. Tang LL, Guo R, Zhang N, Deng B, Chen L, Cheng ZB, et al. Effect of Radiotherapy Alone vs Radiotherapy With Concurrent Chemoradiotherapy on Survival Without Disease Relapse in Patients With Low-risk Nasopharyngeal Carcinoma. *JAMA.* 23 août 2022;328(8):728-36. doi: 10.1001/jama.2022.13997
32. Haberer-Guillerm S, Touboul E, Huguet F. Intensity modulated radiation therapy in nasopharyngeal carcinoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 1 juin 2015;132(3):147-51. doi: 10.1016/j.anorl.2014.02.008. Epub 2014 Dec 29.
33. Studer G, Linsenmeier C, Riesterer O, Najafi Y, Brown M, Yousefi B, et al. Late term tolerance in head neck cancer patients irradiated in the IMRT era. *Radiat Oncol Lond Engl.* 5 nov 2013;8:259.
34. van der Veen J, Nuyts S. Can Intensity-Modulated-Radiotherapy Reduce Toxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma? *Cancers.* 6 oct 2017;9(10):135. doi: 10.3390/cancers9100135
35. Dutz A, Agolli L, Baumann M, Troost EGC, Krause M, Hölscher T, et al. Early and late side effects, dosimetric parameters and quality of life after proton beam therapy and IMRT for prostate cancer: a matched-pair analysis. *Acta Oncol.* 3 juin 2019;58(6):916-25. DOI: 10.1080/0284186X.2019.1581373
36. Fischer-Valuck BW, Rao YJ, Michalski JM. Intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer. *Transl Androl Urol.* juin 2018;7(3):297-307. doi: 10.21037/tau.2017.12.16
37. Baselet B, Sonveaux P, Baatout S, Aerts A. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(4):699-728. doi: 10.1007/s00018-018-2956-z
38. Rannou E, François A, Toullec A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, et al. In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci Rep.* 29 oct 2015;5:15738. DOI: 10.1038/srep15738
39. Horan N, Cooper JS. Radiation Cystitis and Hyperbaric Management. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cité 11 oct 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470594/>
40. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* juin 2018;28(6):436-53. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.001. Epub 2018 Feb 21.

41. Lafargue A, Degorre C, Corre I, Alves-Guerra MC, Gaugler MH, Vallette F, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic Biol Med.* 1 juill 2017;108:750-9. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019
42. Khavinson V, Linkova N, Dyatlova A, Kantemirova R, Kozlov K. Senescence-Associated Secretory Phenotype of Cardiovascular System Cells and Inflammaging: Perspectives of Peptide Regulation. *Cells.* janv 2023;12(1):106. doi: 10.3390/cells12010106.
43. Jos P. Low- and high-dose irradiation effects on microvascular endothelial cells of different origin (tumor and normal tissues). TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN.
44. Lee AH, Ghosh D, Koh IL, Dawson MR. Senescence-associated exosomes transfer miRNA-induced fibrosis to neighboring cells. *Aging.* 23 févr 2023;15(5):1237-56. doi: 10.18632/aging.204539
45. Wilkinson HN, Hardman MJ. Senescence in Wound Repair: Emerging Strategies to Target Chronic Healing Wounds. *Front Cell Dev Biol [Internet].* 11 août 2020 [cité 4 mai 2024];8. doi: 10.3389/fcell.2020.00773. eCollection 2020.
46. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell.* 31 oct 2019;179(4):813-27. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.005.
47. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *NATURE*[Vol 454|24 July 2008|doi:10.1038/nature07201.
48. Cytlak UM, Dyer DP, Honeychurch J, Williams KJ, Travis MA, Illidge TM. Immunomodulation by radiotherapy in tumour control and normal tissue toxicity. *Nat Rev Immunol.* févr 2022;22(2):124-38. DOI: 10.1038/s41577-021-00568-1.
49. Ladaigue S. Régulation des interactions entre monocytes et cellules endothéliales après irradiation à forte dose. HAL Id: tel-03826175 <https://theses.hal.science/tel-03826175> Submitted on 24 Oct 2022.
50. ESTEPHAN H. Implication de l'acide sphingomyélinase et du céramide sécrétés par les cellules endothéliales dans la modulation de la réponse à la radiothérapie. Thèse de Doctorat en Cotutelle, Université de Nantes et Université Libanaise.
51. Staneva G, Momchilova A, Koumanov K, Angelova M. advances review. 2015. developing cell-scale biomimetic systems. a tool for understanding membrane organization and its implication in membrane-associated pathological processes. doi:10.1016/b978-0-12-411516-3.00007-3
52. Niaudet C, Bonnaud S, Guillonnet M, Gouard S, Gaugler MH, Dutoit S, et al. Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis. *Cell Signal.* 1 mai 2017;33:10-21. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.02.001. Epub 2017 Feb 6.
53. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, et al. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1 déc 1992;99(6):683-90. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748.

54. HMEC-1 - CRL-3243 | L'ATCC [Internet]. [cité 30 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.atcc.org/products/crl-3243>
55. Grégory D. Radiothérapie Flash, Institut cancérologie de l'Ouest (ICO) 20220324_BioGenOuest_Delpon.pdf.
56. X. Delvaux, Université de Namur, Faculté des sciences, département de physique, travaux pratiques de Radiobiologie. 2022-2023.
57. Wagner EM. Monitoring Gene Expression: Quantitative Real-Time RT-PCR. In: Freeman LA, éditeur. Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 10 mai 2024]. p. 19-45. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_2
58. Cai X, Li L, Krumholz A, Guo Z, Erpelding TN, Zhang C, et al. Multi-Scale Molecular Photoacoustic Tomography of Gene Expression. PLoS ONE. 27 août 2012;7(8):e43999. doi: 10.1371/journal.pone.0043999. Epub 2012 Aug 27.
59. Valieva Y, Ivanova E, Fayzullin A, Kurkov A, Igrunkova A. Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. Diagnostics. 25 sept 2022;12(10):2309. doi: 10.3390/diagnostics12102309.
60. Millar MW, Fazal F, Rahman A. Therapeutic Targeting of NF- κ B in Acute Lung Injury: A Double-Edged Sword. Cells. 21 oct 2022;11(20):3317. doi: 10.3390/cells11203317.
61. Rodriguez-Ruiz ME, Garasa S, Rodriguez I, Solorzano JL, Barbes B, Yanguas A, et al. Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule Are Induced by Ionizing Radiation on Lymphatic Endothelium. Int J Radiat Oncol. 1 févr 2017;97(2):389-400. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.10.043.
62. Baselet B, Belmans N, Coninx E, Lowe D, Janssen A, Michaux A, et al. Functional Gene Analysis Reveals Cell Cycle Changes and Inflammation in Endothelial Cells Irradiated with a Single X-ray Dose. Front Pharmacol [Internet]. 25 avr 2017 [cité 27 mai 2024];8. | <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00213>
63. Stéphanie B. Etude in vivo et in vitro de la régulation de la mort radio induite des cellules endothéliales par la Sphingosine-1-Phosphate. Thèse de Doctorat Université de Nantes
64. Wiley-VCH - Atoms, Radiation, and Radiation Protection. ISBN: 978-3-527-40606-7. Disponible à la BUMP Unamur.

Annexe

Interaction entre une particule chargée et la matière

Lorsqu'une particule chargée traverse la matière, elle interagit soit avec le noyau ou avec les électrons des atomes qui constituent cette matière. Au cours de cette interaction, la particule perd progressivement son énergie le long de sa trajectoire en ionisant ou excitant des atomes de la matière qu'elle traverse. Cette perte d'énergie dans la matière est caractérisée par le pouvoir d'arrêt, qui traduit la capacité d'un matériau à atténuer ou à arrêter une particule chargée qui la traverse. Autrement dit, le pouvoir d'arrêt est la quantité d'énergie perdue par unité de longueur : il est désigné par $-\frac{dE}{dx}$ (17).

$$-\frac{dE}{dx} = S_{tot}(E) = S_{el}(E) + S_{nucl}(E) \quad \text{MeV.cm}^{-1}$$

Où dE est la quantité d'énergie perdue dans la matière, dx l'épaisseur du matériau traversé, $S_{tot}(E)$, $S_{el}(E)$ et $S_{nucl}(E)$ sont respectivement le pouvoir d'arrêt total, électronique et nucléaire.

Le pouvoir d'arrêt fait également référence à une grandeur radiobiologique connu sous le nom du transfert linéique d'énergie (LET), qui représente l'énergie transférée par unité de longueur par une particule ionisante lorsqu'elle traverse la matière. Il s'exprime en $KeV.\mu m^{-1}$ (64).

En général, les particules chargées, plus lourdes que les électrons, perdent leur énergie dans la matière, en interagissant avec les électrons de celle-ci. Ce qui rend la contribution du pouvoir d'arrêt nucléaire négligeable par rapport au pouvoir d'arrêt électronique. L'interaction entre la particule chargée et les électrons pouvant être influencée par plusieurs paramètres, tels que la densité de la matière traversée, la vitesse et le numéro atomique de la particule chargée, le pouvoir d'arrêt se calcule ainsi à l'aide la formule de Bethe Bloch, qui tient compte de ces paramètres.

$$\left(\frac{dE}{\rho dx}\right)_{tot} = \frac{2\pi r^2 N_A Z m_e C^2 z^2}{A} \left[\ln \left(\frac{4m_e^2 C^4 \beta^2}{I^2 (1 - \beta^2)^2} - 2 \right) \right]$$

Où Z désigne le numéro atomique du matériau traversé, z représente le numéro atomique de la particule chargée, et le paramètre β caractérise la vitesse de la particule par rapport à la célérité, défini par $\beta = \frac{v}{c}$, où c représente la vitesse de la lumière dans le vide (3.10^8 m/s), et v est la vitesse de la particule chargée traversant la matière. Le terme I désigne l'énergie moyenne d'ionisation.

L'augmentation du numéro atomique Z du matériau traversé accroît sa capacité à ralentir la particule à travers les interactions entre ses électrons et la particule. De même, une particule chargée de numéro atomique élevé z , interagit plus intensément avec la matière, transférant ainsi son énergie à la matière par ionisation. Le paramètre β permet de tenir compte des effets relativistes, lorsque la vitesse de la particule se rapproche de celle de la lumière dans le vide, où les effets relativistes deviennent importants, entraînant l'augmentation de la valeur $\frac{1}{\beta^2}$ et, par conséquent, la diminution du pouvoir d'arrêt. Cependant, à des vitesses plus faibles par rapport à celle de la lumière, les effets relativistes sont moins prononcés, ce qui conduit à une augmentation du pouvoir d'arrêt. Autrement dit, une particule rapide dans la matière a moins de temps pour interagir suffisamment avec les électrons de celle-ci, réduisant ainsi le pouvoir d'arrêt de la matière. A l'inverse, une particule plus lente interagit davantage avec les électrons,

entraînant une perte d'énergie importante au cours de ces interactions, ce qui explique l'augmentation du pouvoir d'arrêt dans ce cas.

Des exemples illustrant l'application des particules chargées dans le traitement des cancers sont la protonthérapie, qui repose sur l'utilisation des protons (^1H) comme particule chargée, ainsi que l'hadronthérapie, qui est basée sur l'utilisation d'ions carbone (^{12}C). Ces particules ont la capacité de délivrer une dose maximale de radiation à une profondeur spécifique dans la matière, phénomène connu sous le nom de pic de Bragg.

2. Principe de fonctionnement de la technique RT-qPCR

La RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) qui signifie Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative à Transcription Inverse, est une technique permettant de quantifier la quantité d'ARN spécifique présente dans un échantillon. Comme son nom l'indique, cette technique se compose de deux processus distincts : la transcription inverse (RT) et la PCR quantitative (qPCR).

La RT consiste à convertir les molécules d'ARNm de l'échantillon en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une enzyme appelée transcriptase inverse. Cette enzyme synthétise un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN. Bien que l'ARN soit l'acide nucléique que nous souhaitons quantifier, cette étape est cruciale car la PCR nécessite de l'ADN comme matrice d'amplification et non de l'ARN.

La PCR quantitative est une étape qui succède à la RT et qui vise à amplifier l'ADNc. Cette technique est capable d'amplifier une simple copie d'une séquence particulière d'ADN et la rendre détectable par le thermocycleur. Ce processus de quantification est basé sur l'utilisation d'une enzyme polymérase d'ADN, des amorces spécifiques (primers), et une molécule fluorescente, généralement le SYBR Green, qui devient fluorescent une fois liée sur l'ADN double brin. Les amorces sont de courtes séquences d'ADN qui ont la faculté de se lier spécifiquement à une cible d'ADNc à quantifier.

La technique débute par le mélange d'ADN polymérase thermostable avec des amorces spécifiques, notamment des amorces avant (forward) amorces arrière (reverse) ainsi qu'une enzyme fluorescente. Ce mélange est soumis à une élévation de température par le biais de la machine de PCR (Thermocycleur) jusqu'à atteindre 90°C , ce qui permet la dénaturation des brins d'ADN en deux brins simples. Ensuite, le programme abaisse la température à 60°C pour faciliter l'hybridation des amorces aux brins d'ADN cible. Les amorces avant et arrière s'hybrident respectivement aux brins supérieurs et inférieurs des brins simples d'ADN. Par la suite, la température est à nouveau augmentée par le programme jusqu'à 72°C , permettant ainsi aux enzymes de l'ADN polymérase d'ajouter des nucléotides à l'extrémité 3' des amorces, formant ainsi un nouveau brin (extension des amorces). Cette extension allonge progressivement les brins de l'ADN cibles, aboutissant à la formation d'un brin d'ADN double. Ce même cycle est répété pour les brins nouvellement formés, et à chaque cycle, le nombre d'ADN est doublé. Après n cycles, on retrouve 2^n copies d'ADN(19).

A chaque cycle de répliation de la séquence cible, les molécules fluorescentes se fixent aux ADN doubles brins, et émettent un signal fluorescent détectable par la machine de PCR. L'intensité de ce signal est proportionnelle à la quantité totale d'ADN présente dans le milieu.

En conséquence, le nombre d'ADN double à chaque cycle de PCR, après n cycles, le nombre total d'ADN sera de 2^n molécules.

Le nombre de cycle de quantification requis pour un gène particulier dépend principalement de son abondance dans l'échantillon. Plus le gène est abondant, moins de cycles seront nécessaires pour atteindre le seuil de fluorescence, et inversement. Le nombre de cycles effectués est généralement noté par CT.