



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE VERSAILLES

Spécialité: Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le par

Ingrid NOSEL

2013

Quantification chez l'homme et à l'échelle du génome des modifications d'expression génique induites par de faibles doses de rayonnement ionisant

Directeur de thèse : Dr Patrick Laloi

Co-directeur de thèse : Dr Gaëtan Gruel

Membres du jury :

Pr Javier PEREA

Président du jury

Dr Patrick LALOI

Directeur de thèse

Pr Marie-Dominique GALIBERT

Rapporteur

Pr Lydie SPARFEL

Rapporteur

Dr Dietrich AVERBECK

Examineur

Dr Rafi BENOTMANE

Examineur



Thèse réalisée au Laboratoire de dosimétrie biologique
IRSN PRP-HOM/SRBE/LDB
31 avenue de la division Leclerc
BP 17 92262 Fontenay aux Roses Cedex
Tél. : +33 (0)1 58 35 72 60

Sous la direction de Patrick Laloi patrick.laloi@irsn.fr

Co-encadrement Gaetan Gruel gaetan.gruel@irsn.fr

Financement Allocation de recherche ministérielle sur sujet fléché

UN plan, quand il apparaît à l'esprit, le séduit et le captive, il est tout lumière, ordre et nouveauté; puis, lorsque vient l'heure d'exécution et de travail, lorsqu'il faut ranger dans le cadre et dans les lignes régulières qu'il présente, la masse brute et informe des matériaux amassés, alors commence l'épreuve décisive. Rien de plus laborieux que le passage d'une conception abstraite à une œuvre effective. Mais, quoi qu'il advienne de celle-ci, un plan qui a changé le point de vue habituel et haussé le niveau a pu seul m'engager dans ce travail qui a là son originalité principale.

Emile Littré (1801-1881)

lexicographe et philosophe

Table des matières

Remerciements	xiv
I État de l'art sur les radiations ionisantes et le vivant	2
Chapitre 1.1 Les rayonnements ionisants	3
1.1.1 Dépôt d'énergie des particules ionisantes	4
1.1.1.1 Dose absorbée	4
1.1.1.2 Notion de TEL	5
1.1.1.3 Dose équivalente	6
1.1.2 Les différentes sources d'irradiation de l'Homme	6
Chapitre 1.2 Les effets sur la santé des rayonnements ionisants	8
1.2.1 Les effets obligatoires ou déterministes	9
1.2.2 Les effets aléatoires ou stochastiques	11
1.2.2.1 Les effets cancérogènes	11
1.2.2.2 Les effets génétiques héréditaires	12
Chapitre 1.3 L'interaction des radiations ionisantes avec les différents constituants cellulaires	14
1.3.1 Radiolyse de la molécule d'eau	15
1.3.2 Les dommages aux lipides membranaires	16
1.3.3 Dommages aux protéines	17
1.3.4 Altération des acides nucléiques	18
1.3.4.1 Cassures à l'ADN	20
1.3.4.2 Altération des bases des nucléotides	21
1.3.4.3 Destruction des sucres	22
1.3.4.4 Pontage ADN-protéine	22

Chapitre 1.4 Réponse cellulaire et moléculaire à l'irradiation	24
1.4.1 Progression du cycle cellulaire	26
1.4.1.1 Mécanismes moléculaires de l'arrêt en phase G1	29
1.4.1.2 Mécanismes moléculaires de l'arrêt en phase G2	30
1.4.2 Les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN	32
1.4.2.1 Mécanismes de réparation des cassures simple brin et bases en-	
dommagées de l'ADN	32
1.4.2.2 Mécanismes de réparation des cassures double-brin	36
1.4.3 Mort cellulaire radio-induite	39
1.4.3.1 L'apoptose	39
1.4.3.2 La nécrose	42
1.4.3.3 Sénescence	43
Chapitre 1.5 La problématique des faibles doses	45
1.5.1 Réponse moléculaire identifiée aux faibles doses	45
1.5.2 Phénomènes biologiques identifiés aux faibles doses	46
1.5.2.1 Effet bystander	46
1.5.2.2 Instabilité génomique	47
1.5.2.3 Réponse adaptative	48
Chapitre 1.6 Étude du transcriptome en réponse aux radiations ionisantes	50
1.6.1 Mécanismes de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes .	51
1.6.1.1 Mécanismes de régulation transcriptionnelle	51
1.6.1.2 Mécanismes de régulation post-transcriptionnelles des ARNm . . .	54
1.6.1.2.1 Dégradation exonucléolytique des ARNm	54
1.6.1.2.2 Dégradation par les microARN	54
1.6.2 Historique de mesure du transcriptome	57
1.6.3 Effets des radiations ionisantes sur la transcription des gènes	59
1.6.3.1 Les facteurs de transcription activés en réponse aux radiations	
ionisantes	63
II Matériel et méthode	68
Chapitre 2.1 Traitement des échantillons biologiques	69
2.1.1 Collecte des échantillons biologiques et irradiation <i>ex-vivo</i>	69

2.1.2 Purification lymphocytaire	70
2.1.3 Extraction des ARN	71
Chapitre 2.2 Analyse sur puce à oligonucléotides	73
2.2.1 Amplification et marquage des ARN	73
2.2.2 Purification des ARN amplifiés	75
2.2.3 Hybridation des échantillons	75
2.2.4 Visualisation des images et extraction des signaux de fluorescence	76
2.2.5 Soumission dans la base de donnée GEO (Gene Expression Omnibus)	77
Chapitre 2.3 Analyse des données d'expression	78
2.3.1 Présentation du langage R	78
2.3.2 Normalisation des données	79
2.3.3 Filtrage	79
2.3.4 Analyse de l'expression différentielle des gènes	80
2.3.4.1 Problématique des tests multiples	81
2.3.4.1.1 Correction de la <i>P.valeur</i>	82
2.3.4.1.2 Filtre sur l'amplitude de la modulation	82
2.3.5 corrélation de Spearman	83
2.3.6 Regroupement de profils similaires	83
Chapitre 2.4 Interprétation biologique des données de puce à oligonucléotide	86
2.4.1 Bases de données permettant d'annoter les gènes	86
2.4.1.1 La base de données KEGG	86
2.4.2 Outils analytiques analysant les annotations	87
2.4.2.1 Logiciel web ToppGene	87
III Résultat-Discussion	89
Chapitre 3.1 Stratégie expérimentale	90
Chapitre 3.2 Résultats préliminaires à l'étude du transcriptome	92
3.2.1 Numération de la formule sanguine des échantillons	92
3.2.2 Taux d'enrichissement cellulaires	93
3.2.3 Contrôle qualitatif et quantitatif des échantillons	95
3.2.4 Contrôles de la qualité des hybridations	97

3.2.4.1	Linéarité du signal des ARN exogènes	97
3.2.4.2	Uniformité du signal d'hybridation avant normalisation	97
3.2.4.3	Analyse des signaux d'hybridation après normalisation	99
3.2.5	Classification hiérarchique des conditions expérimentales	101
3.2.6	Discussion des résultats	102
Chapitre 3.3	Vue d'ensemble de la réponse aux faibles doses	105
3.3.1	Quantification de l'expression des gènes modulés	105
3.3.1.1	Quantification du nombre de gènes modulés pour chaque dose	107
3.3.1.2	Quantification des gènes modulés pour chaque temps	108
3.3.1.3	Matrice d'intersection des gènes modulés	110
3.3.1.4	Analyse des scores de corrélation	112
Chapitre 3.4	Étude des profils de modulation en fonction de la dose d'irradiation	115
3.4.1	Identification de profils d'expression d'intérêt	115
3.4.2	Classification des gènes appartenant aux profils de type I	116
3.4.3	Classification des gènes appartenant aux profils de type II	118
3.4.4	Discussion sur la classification des gènes	123
Chapitre 3.5	Interprétation biologique des profils de modulation d'expression	124
3.5.1	Analyse des fonctions biologiques	124
3.5.1.1	Gènes différentiellement modulés en fonction de la dose.	124
3.5.1.1.1	Sur-expression à partir de 50 mGy	125
3.5.1.1.2	Sur-expression à partir de 100 mGy	126
3.5.1.1.3	Sur-expression à partir de 500 mGy	126
3.5.1.1.4	Synthèse	127
3.5.1.2	Gènes modulés de manière similaire pour l'ensemble des doses	131
3.5.1.2.1	Sur-expression	131
3.5.1.2.2	Répression	133
3.5.1.3	Discussion sur l'analyse fonctionnelle	133
3.5.2	Régulateurs de l'expression des gènes	136
3.5.2.1	Analyse des groupes de gènes surexprimé différentiellement avec la dose	136
3.5.2.2	Analyse des groupes de gènes modulés de manière similaire pour l'ensemble des doses.	138
3.5.2.2.1	Surexpressions	138

3.5.2.2 Répressions	141
3.5.2.3 Analyse des régulateurs sur l'ensemble des 2745 gènes et synthèse	143
Chapitre 3.6 Recherche d'un groupe de gènes pour la discrimination d'échantillons irradiés aux faibles doses	146
3.6.1 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des 370 gènes modulés	146
3.6.2 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des gènes des groupes 1, 2 et 3	149
3.6.3 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des gènes des groupes 3	151
3.6.4 Discussion	153
IV Conclusion générale et perspectives	156
V Références bibliographiques	161
VI Publication	185
VII Annexes	197
Annexe A Scripts R	198
Annexe B Résultats des dosages des ARN totaux et amplifiés	207
Annexe C Classification hiérarchique sur les 2745 gènes	210
Annexe D Profils d'expression et variabilité inter-individuelle	235

Table des figures

Figure 1.1.1 : Trajectoire de rayonnement ionisant à TEL faible et élevé	5
Figure 1.2.1 : Probabilité d'apparition des effets déterministes et stochastiques .	9
Figure 1.2.2 : Évolution temporelle du taux de lymphocytes après une exposition accidentelle	10
Figure 1.3.1 : Peroxydation lipidique	16
Figure 1.3.2 : Structure d'un brin d'ADN	18
Figure 1.3.3 : Schéma CDB et CSB	21
Figure 1.3.4 : Altérations des bases de l'ADN	22
Figure 1.4.1 : Effets cellulaires d'une exposition aux radiations ionisantes	25
Figure 1.4.2 : Les points de régulation du cycle cellulaire	28
Figure 1.4.3 : Point de contrôle en G1	30
Figure 1.4.4 : Point de contrôle en G2	31
Figure 1.4.5 : Mécanisme de réparation par excision de base	33
Figure 1.4.6 : Réparation par excision de nucléotide	35
Figure 1.4.7 : Recombinaison homologue	37
Figure 1.4.8 : Jonction des extrémités non homologues	38
Figure 1.4.9 : Apoptose radio-induite	41
Figure 1.4.10 : Morphologie d'une cellule en apoptose et en nécrose	43
Figure 1.5.1 : Instabilité génomique radio-induite	47
Figure 1.6.1 : Acteurs de la régulation de la transcription chez les eucaryotes . .	52
Figure 1.6.2 : séquence consensus de promoteur génique	53
Figure 1.6.3 : Évolution des références bibliographiques sur les données de biopuces	58
Figure 1.6.4 : Gènes participant au contrôle de la réponse cellulaire à l'irradiation et fréquemment décrits dans la littérature	60
Figure 2.1.1 : Procédure pour la sélection négative des lymphocytes T CD4 ⁺ . .	71

Figure 2.2.1 : Procédure d'amplification et de marquage des ARNm	74
Figure 2.2.2 : Visualisation en fausses couleurs des images en log-intensité des lames hybridées en fausses couleurs	76
Figure 2.3.1 : Effet de la normalisation par quantiles sur les distributions des intensités de fluorescence	79
Figure 2.3.2 : Schéma d'une classification hiérarchique basée sur les distances euclidiennes	84
Figure 2.3.3 : Principe de la classification hiérarchique	85
Figure 2.4.1 : Représentation schématique de la méthodologie de travail des différentes applications de la suite ToppGene	88
Figure 3.1.1 : Schéma du protocole expérimental	91
Figure 3.2.1 : Proportion estimée des différents types cellulaires pour chaque individu	93
Figure 3.2.2 : Résultat du passage des cellules triées et non triées en cytométrie en flux	94
Figure 3.2.3 : Profils type de migration d'ARN	96
Figure 3.2.4 : Corrélations entre les concentrations connues des ARN exogènes et les intensités d'hybridation	97
Figure 3.2.5 : Distribution spatiale des signaux d'hybridation	98
Figure 3.2.6 : Normalisation des intensités brutes	99
Figure 3.2.7 : CV des sondes répliquées	100
Figure 3.2.8 : Regroupement hiérarchique des conditions expérimentales	102
Figure 3.2.9 : Organigramme des principaux contrôles qualités	104
Figure 3.3.1 : Réalisation des listes d'union de gènes	107
Figure 3.3.2 : Quantification des modulations géniques	108
Figure 3.3.3 : Nombre de gènes modulés en fonction du temps et de la dose d'irradiation	109
Figure 3.3.4 : Principe de base de l'étude comparative des gènes en commun entre deux doses	110
Figure 3.3.5 : Matrice d'intersection des inductions A et répressions géniques B	111
Figure 3.3.6 : Matrice d'intersection des inductions A et répressions géniques B	112
Figure 3.3.7 : Scores de corrélation de Spearman	113

Figure 3.4.1 : Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type I	117
Figure 3.4.2 : Profils moyens des gènes provenant des groupes 1, 2 et 3.	118
Figure 3.4.3 : Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II.	119
Figure 3.4.4 : Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II	120
Figure 3.4.5 : Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II	121
Figure 3.4.6 : Profils moyens des gènes provenant des groupes 4, 5, 6 et 7	122
Figure 3.5.1 : Réseau d'interaction des processus biologiques propres à chaque groupe	128
Figure 3.5.2 : Potentielles voie de signalisation modulées en réponse aux faibles doses	130
Figure 3.5.3 : Phosphorylation oxydative	132
Figure 3.5.4 : Synthèse des principaux processus biologiques modulés en réponse aux faibles doses.	135
Figure 3.5.5 : Matrice de synthèse des annotations de micro ARN enrichies avec leur gènes annotés (groupe 7)	143
Figure 3.5.6 : Séquences consensus enrichies sur les 2745 gènes modulés	145
Figure 3.6.1 : Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des 370 gènes sélectionnés	148
Figure 3.6.2 : Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des gènes des groupes 1, 2 et 3	150
Figure 3.6.3 : Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des gènes du groupe 3	152
Figure 4.6.4 : Mécanisme hypothétique moléculaire en réponse aux faibles doses basés sur l'interprétation des données du transcriptome	160

Liste des tableaux

Table 1.1.1 : Facteurs de pondération	6
Table 1.1.2 : Sources d'exposition aux faibles doses	7
Table 1.2.1 : Incidence des effets génétique des radiations	12
Table 1.3.1 : Fréquence des dommages radio-induits à l'ADN	20
Table 1.4.1 : Protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin	36
Table 1.6.1 : Les revues scientifiques abordant l'aspect modulation d'expression aux faibles doses de radiations ionisantes dans les cellules humaines.	62
Table 1.6.2 : Facteurs de transcription activés en réponse à l'irradiation	64
Table 3.2.1 : Enrichissement en lymphocyte T4	95
Table 3.3.1 : Présentation des 24 conditions	106
Table 3.5.1 : Processus biologiques du groupe 3	125
Table 3.5.2 : Processus biologiques du groupe 2	126
Table 3.5.3 : Processus biologiques du groupe 1	127
Table 3.5.4 : Processus biologiques du groupe 4	131
Table 3.5.5 : Processus biologiques du groupe 7	133
Table 3.5.6 : Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 1, 2 et 3	138
Table 3.5.7 : Séquences consensus de facteur de transcription enrichies dans la liste des gènes du groupe 4.	139
Table 3.5.8 : Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 5 et 6.	141
Table 3.5.9 : Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 7.	142

Table 3.6.1 : Récapitulatif du potentiel de discrimination de dose des différentes listes de gènes. 153

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNa : Acide ribonucléique amplifié

ARNc : Acide ribonucléique complémentaire

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BER: Base excision repair

BH: Benjamini Hochber

CDK: Cycline dependant kinase

Co-60: Cobalt-60

Cy3: Cyanine 3

DSB: Double strand break

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

eV: Electron Volt

FDR: False discover rate

GO: Gene ontology

Gy: Gray

HR: Homologue recombination

Log2: Logarithme de base 2

MMR: Mismatch repair

NER: Nucleotide excision repair

NHEJ: Non Homologous End-joining

PCR: Polymerase chain reaction

RIN: RNA Integrity Number

RT : Reverse transcription

Sv : Sievert

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

UTR : Utranslated region

REMERCIEMENTS

J'E remercie Mr Philippe VOISIN ainsi que son adjointe Mme Laurence Roy pour leur accueil au sein du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie (SRBE) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN). Je tiens également à faire part de ma gratitude envers le Professeur Pereira pour avoir accepté de faire partie du jury en tant que président. Un énorme remerciement aux professeurs Marie Dominique Galibert et Sparfael Lydie pour leurs qualités de rapporteurs. Merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Remerciements au Dr Benotmane Rafi et Dr Dietrich Averebeck pour leurs qualités d'examineurs. En outre, je tiens également à saluer leur entière implication dans l'évaluation des mes travaux. J'adresse mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, Patrick Laloi, pour son merveilleux soutien et ses conseils sans pareil. J'adresse également des profonds remerciements au chef du laboratoire de dosimétrie biologique Franscec Paco Barquinero pour sa sympathie et sa bienveillance à l'égard de mon sujet pendant ses deux dernières années.

J'ai tout particulièrement à cœur de remercier le plus chaleureusement du monde Dr Gaetan Gruel, mon co-directeur de thèse pour m'avoir confié ce sujet qui m'aura permis d'acquérir un professionnalisme certain, une maîtrise "biologistique" avérée et une confiance en moi m'amenant à une maturité scientifique extraordinaire! Certaines fois

où nous aurions tendance à omettre les bienfaits qu'autrui puisse nous faire, je tiens tout particulièrement à insister sur la reconnaissance que j'ai pour toi pour ton engagement et ce savoir incommensurable que tu m'auras transmise. J'aurais beaucoup appris à tes côtés ! Un grand merci également à Aurélie Vaurijoux pour sa disponibilité et sa gentillesse, merci pour tes conseils techniques et scientifiques. Auprès de toi, j'aurais appris rigueur et précision qui sont des atouts indispensables pour l'accomplissement d'une carrière scientifique. Sachant que tu viens d'entamer ta thèse et ayant pleinement connaissance de l'implication nécessaire pour mener à bien ce projet de vie, je te souhaite le plus sincèrement du monde un bon courage pour la suite.

Aussi, profonds remerciements à Dr Roch Lefèvre Sandrine pour son soutien et ses conseils scientifiques ainsi que sa bonne humeur très appréciable dans une équipe où le travail intense nous fait parfois oublier de se détendre. Quant à Grégoire Eric, mille fois merci pour ta disponibilité sans bornes et tes judicieux conseils, ton recul sur les choses et ta bonne humeur. Toutes ces qualités s'avèrent précieuses pour calmer la fougue dont parfois fait preuve la jeunesse.

Grand merci à Cécile Martin, pour tous les échanges que nous avons pu avoir. J'aurais voulu te connaître plus tôt, cependant je tiens à ce que tu saches, que nos routes ne se croiseront pas vainement, car de toi je garderai un souvenir impérissable. Merci à toi Pascale Voisin pour ta gentillesse et ton attention. Te souhaitant un bon courage si tu décidais de continuer à faire le tour du stade du panorama sans ma présence. Merci à Geraldine Gonon pour ta bonne humeur, et tes précieux conseils. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Mes sincères remerciements à tous ceux que j'ai pu croiser au sein du LDB et qui sont parti vers d'autres aventures. Merci entre autre à Marco Valente et Liboutet Muriel, je garde un très bon souvenirs de vos passages et des fous rires que l'on a pu avoir ! Je voudrais aussi remercier Odile, Sarah, Karl, Rym, Momo pour leur gentillesse !

Je remercie plus largement les membres du SRBE pour leur accueil ainsi que l'aide qu'ils ont pu m'apporter à un moment ou un autre. Enfin je souhaite remercier toutes les personnes qui d'une façon ou d'un autre m'ont épaulée durant mon parcours. Merci à tous les doctorants que j'ai pu rencontrer lors des colloques, doctoriales et autres. Sabrina, Suzanna, Neige, Sophie, Julie etc... merci pour tous ces bon moments, que de souvenirs !

Un très grand merci à mes très chers parents. Grand merci à mes chères frères et sœurs. Merci également à mon compagnon pour son soutien et son encouragement. Et finalement, je tiens à remercier Dieu sans qui tout cela n'aurait été possible. Sans qui tout cela n'aurait pu être rêvé. A maintes reprises, il m'aurait été possible de baisser les bras et à maintes reprises il a su les relever. Si je devais tous vous remercier pour votre amour, votre patience, votre engagement ce serait à travers lui que je le ferais le mieux !

Je vous souhaite à tous, dans vos parcours de vie distinct, l'accomplissement sans faille de tous vos rêves et que l'amour irradie vos vie !

Contexte et objectifs de la thèse

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Dosimétrie Biologique (LDB) de l'Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire (IRSN). Ce laboratoire a pour objectif de développer une organisation opérationnelle et des méthodes pour réaliser des évaluations par dosimétrie biologique de la dose reçue par des individus en cas d'accident radiologique. Pour cela, le laboratoire s'appuie sur une technique de référence basée sur le dénombrement d'aberrations chromosomiques. Cependant cette approche présente un seuil de détection à 100 mGy. L'un des objectifs du laboratoire est de repousser les limites de cette technique de référence à travers différents projets de recherches à visée appliquée s'appuyant sur les effets des rayonnements ionisants sur l'ADN. Ainsi le laboratoire explore le potentiel de différentes approches (puces à Oligonucléotides, Multi-FISH, γ H2AX. . .) qui permettrait d'estimer à terme des doses d'exposition inférieures à 100 mGy. L'utilisation au sein du LDB des puces à oligonucléotides a permis de mettre en évidence une réponse transcriptomique précoce, significative et importante des lymphocytes T CD4⁺ exposés à une faible dose (50 mGy) de rayonnements ionisants (Gruel et al.,2008).

Basés sur ce constat, ces travaux de thèse ont débuté, dans le but d'explorer cette réponse transcriptionnelle en fonction du temps et de la dose et d'émettre des hypothèses concernant de potentiels capteurs moléculaires de l'exposition impliqués dans la réponse cellulaire aux faibles doses. Pour cela, une approche à large spectre utilisant la biotechnologie des puces à oligonucléotides a été utilisée afin d'étudier les modifications du transcriptome en réponse aux faibles doses. Cette approche a aussi pour but d'émettre des hypothèses sur les acteurs moléculaires impliqués dans cette réponse.

Première partie

État de l'art sur les radiations ionisantes et le vivant

CHAPITRE 1.1

LES RAYONNEMENTS IONISANTS

Le phénomène de radioactivité a été découvert en 1896 par Henri Becquerel¹. La radioactivité est omniprésente dans notre environnement et le vivant subit une exposition universelle à ce phénomène. Afin de comprendre et d'étudier les possibles conséquences de cette exposition, il est nécessaire de connaître en quoi consiste le phénomène de radioactivité. Lors de la désintégration spontanée d'un noyau radioactif instable, une énergie est dégagée par émission d'un ou plusieurs types de rayonnements. Ces rayonnements sont dits "ionisants" et se caractérisent par leur aptitude à arracher un électron à la matière qu'ils traversent. Par conséquent, ils sont susceptibles d'induire par ionisation des modifications structurales de la matière.

Il existe différents types de rayonnements ionisants, tels que les rayons alpha, bêta et les rayons gamma.

- **Les rayonnements α** (alpha) sont des noyaux d'hélium [${}^4_2\text{He}$], de charge positive, constitués de deux protons et deux neutrons. Les particules alpha sont peu pénétrantes. Une feuille de papier suffit à les arrêter et leur trajet ne dépasse pas quelques dizaines de micromètres dans les tissus biologiques.

1. Henri Becquerel (1852-1908)

- **Les rayonnements β** (bêta) peuvent être chargées négativement β^- [électrons] ou positivement β^+ [positrons]. Elles sont plus petites et donc plus pénétrantes que les particules alpha. Leur portée reste tout de même assez limitée. Elles sont arrêtées par une feuille d'aluminium ou par quelques millimètres d'épaisseur de tissus biologiques.
- **Les rayonnements γ** (gamma) sont composés de photons. Ce sont des rayonnements électromagnétiques de hautes fréquences ($>10^{18}$ hertz) émis par le noyau d'un atome. Ces rayons gamma sont susceptibles de céder à un atome tout ou une partie de leur énergie. Ils peuvent parcourir plusieurs centaines de mètres dans l'air. D'épais écrans de béton ou de plomb sont nécessaires pour s'en protéger. Ils sont très pénétrants au niveau de l'organisme.

1.1.1 Dépôt d'énergie des particules ionisantes

1.1.1.1 Dose absorbée

Lorsque le rayonnement traverse la matière, une certaine portion de son énergie est transférée. La dose absorbée correspond à la grandeur dosimétrique qui quantifie l'énergie totale, déposée dans la matière irradiée². Elle a pour unité de mesure le Gray (Gy), en hommage au radiophysicien Louis Harold Gray³. Dans le système international (S.I), une dose absorbée de 1 Gy équivaut à une quantité d'énergie transférée de 1 J.Kg⁻¹. Le débit de dose correspond à l'intensité de l'irradiation et correspond donc à l'énergie absorbée par la matière par unité de temps.

2. La dose absorbée sera l'unité de grandeur utilisé tout au long du rapport.

3. Louis Harold Gray (1905-1965)

1.1.1.2 Notion de TEL

Le transfert d'énergie linéique (TEL) est défini comme la densité d'énergie transférée par le milieu, rapporté à l'unité de longueur de la trajectoire de la particule. Il est exprimé en $\text{eV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ($1\text{eV} = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$) et dépend du type de rayonnement et de son énergie. On peut distinguer les rayonnements à faible TEL et les rayonnements à TEL élevé.

Les rayonnements γ présentent un transfert d'énergie linéique faible. La densité d'ionisation est faible sur la trajectoire du photon. En fin de parcours, des grappes d'ionisation peuvent se former. Les trajectoires d'une particule à faible TEL sont illustrées en Figure 1.1.1 a) (Goodhead, 1994).

Les rayonnements α présentent un transfert d'énergie linéique élevé. Ces rayonnements à TEL élevé se caractérisent par une trajectoire avec une production d'ionisations moins dispersées et en plus grande densité, comme l'illustre la Figure 1.1.1 b) (Goodhead, 1994).

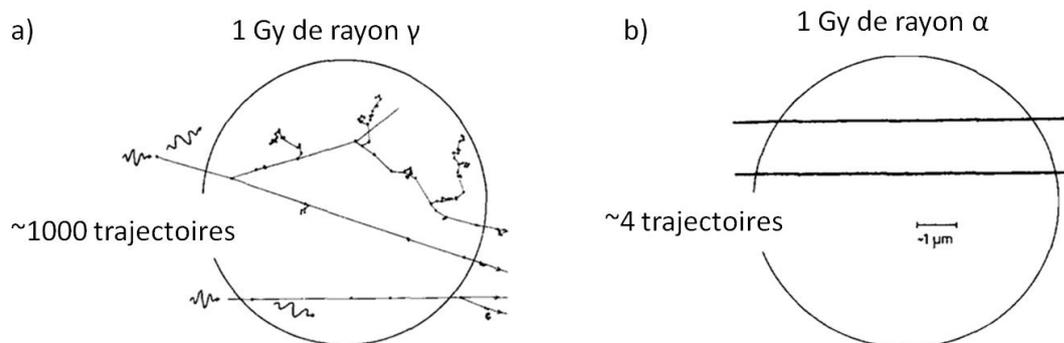


FIGURE 1.1.1: **Trajectoire de rayonnement à TEL faible et élevé.** Représentation schématique d'un noyau cellulaire traversé par deux trajectoires simulées d'un (a) TEL faible et d'un (b) TEL élevé. Une dose de 1 Gy déposée dans un noyau cellulaire produit environ 1000 trajectoires pour les particules de faible TEL ou 4 trajectoires pour les particules de TEL élevé, d'après (Goodhead, 1994).

1.1.1.3 Dose équivalente

La dose équivalente est une pondération de la dose absorbée par un facteur de pondération radiologique (W_r) propre à chaque rayonnement (Table 1.1.1). La dose équivalente prend en compte les différents types de rayonnements et les différents effets biologiques produits. L'unité de la dose équivalente est le Sievert (Sv) et correspond à 1 Gy pour un facteur W_r de 1.

Nature du rayonnement	Facteur de pondération radiologique W_r
β , électrons, γ	1
protons	2
neutrons	5 à 20 (fonction continue de l'énergie)
α	20

TABLEAU 1.1.1: Valeurs des facteurs de pondération des différents types de rayonnements (ICRP 2007)

1.1.2 Les différentes sources d'irradiation de l'Homme

L'Homme a toujours été exposé aux radiations ionisantes provenant de sources naturelles. Ces sources naturelles de radioactivité, constituent 75 % de la dose annuelle reçue par l'Homme. La dose effective moyenne due à l'irradiation naturelle d'un organisme humain est de 2.4 mSv par an (UNSCEAR, 2008). Précisons cependant que pour des raisons principalement géologiques (composition des sols, altitude) le niveau de radioactivité naturelle peut différer d'une région à l'autre du globe. Cette irradiation naturelle comporte trois origines distinctes :

- les rayonnements cosmiques (exposition externe),
- les radio-éléments naturels présents dans la croûte terrestre, comme le radon,
- les radio-éléments contenus dans l'alimentation, comme l'isotope 40 du potassium (^{40}K) et l'isotope 14 du carbone (^{14}C) (exposition interne / externe).

L'exposition résultante de la radioactivité artificielle, représente 25 % de la dose annuelle reçue par l'homme. L'irradiation par des sources artificielles en France, correspond à une dose annuelle délivrée de 1 mSv par habitant (Council, 2006). Pour des raisons d'ordre économique, cette exposition artificielle est très variable d'une région à l'autre du globe (UNSCEAR, 2010).

Dans les pays occidentaux, l'Homme est de plus en plus exposé aux radiations ionisantes issues de sources artificielles (UNSCEAR, 2010). D'une part, les rayonnements ionisants sont devenus un outil incontournable de l'arsenal diagnostique et thérapeutique de la médecine (UNSCEAR, 2000) et d'autre part, le risque local d'exposition environnementale est augmenté suite aux divers événements accidentels, liés aux activités industrielles ou militaires. Il faut souligner ces dernières années, une augmentation des doses collectives liées aux expositions diagnostiques et thérapeutiques (UNSCEAR, 2008). Le Tableau 1.1.2 présente les principales sources d'exposition aux faibles doses chez l'homme.

Expositions	dose délivrée (mGy ou mSv)
Exposition naturelle (dose moyenne annuelle)	2.4
Exposition artificielle (pour examen) : Radiographie de la poitrine	0.1-0.3
Radiographie de l'estomac	0.6-2.7
Scanner	20

TABLEAU 1.1.2: Sources d'exposition aux faibles doses de rayonnements chez l'Homme (Anzai et al., 2012).

CHAPITRE 1.2

LES EFFETS SUR LA SANTÉ DES RAYONNEMENTS

IONISANTS

Les effets sur la santé des rayonnements ionisants dépendent de leur nature (α , β , γ), de la quantité d'énergie déposée dans chaque organe ou tissu du corps humain (dose d'irradiation), des modalités d'exposition (exposition globale, partielle ou localisée), de la radiosensibilité du tissu irradié ainsi que du temps d'exposition.

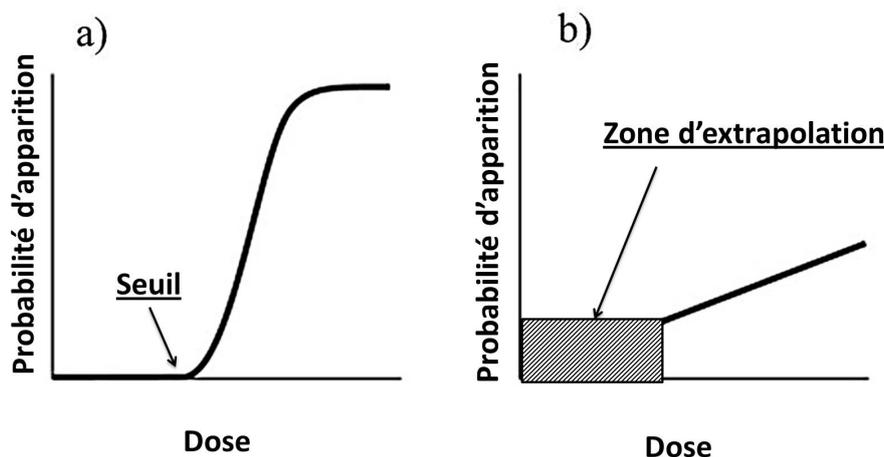


FIGURE 1.2.1: **Probabilité d'apparition des effets a) déterministes et b) stochastiques.** La probabilité d'apparition des effets déterministes dépend d'un seuil de dose. Celle des effets stochastiques augmente avec la dose d'irradiation, une zone d'extrapolation est représentée pour le domaine des faibles doses. D'après (Anzai et al., 2012).

En radioprotection, on distingue deux types d'effet sur l'organisme : les effets déterministes et les effets stochastiques qui diffèrent par leur probabilité d'apparition (Figure 1.2.1).

1.2.1 Les effets obligatoires ou déterministes

Les effets déterministes, sont essentiellement la conséquence de la destruction massive des cellules de l'organisme. Ce sont des effets à seuil, c'est-à-dire qu'ils apparaissent au dessus d'une certaine dose d'irradiation avec la probabilité maximale (Figure 1.2.1 a). Précoces, ils surviennent dans les jours ou les semaines qui suivent l'exposition. Ces effets peuvent être réversibles spontanément ou suite à un traitement médical (UNSCEAR, 2008). Les effets déterministes impliquent généralement des expositions à des fortes doses et ne sont généralement pas cliniquement exprimés aux faibles doses. La gravité de ceux-ci augmente avec la dose et ils peuvent mettre en jeu le pronostic vital de la personne. Notons qu'aucune symptomatologie clinique ou biologique reproductible

n'est observée pour des doses inférieures à 0.5 Gy. La dose absorbée par l'organisme et correspondant à une probabilité de décès de 50 % dans les 60 jours sans traitement (DL 50/60) est estimée à 3.5 Gy chez l'Homme.

Lors d'une irradiation globale et selon la dose absorbée, l'apparition des syndromes suivants est observée :

- **Le Syndrome hématopoïétique** est le symptôme le plus précoce suite à une irradiation globale. Il se manifeste à partir de 0.5 Gy et se caractérise par une diminution précoce des lymphocytes et retardée au niveau des autres cellules du système hématopoïétique (UNSCEAR, 2006a), (Dainiak, 2002). Le degré et la durée de cette diminution dépendent de la dose (Figure 1.2.2). Par conséquent, les symptômes cliniques manifestés chez l'individu sont habituellement une anémie et une fatigue générale.

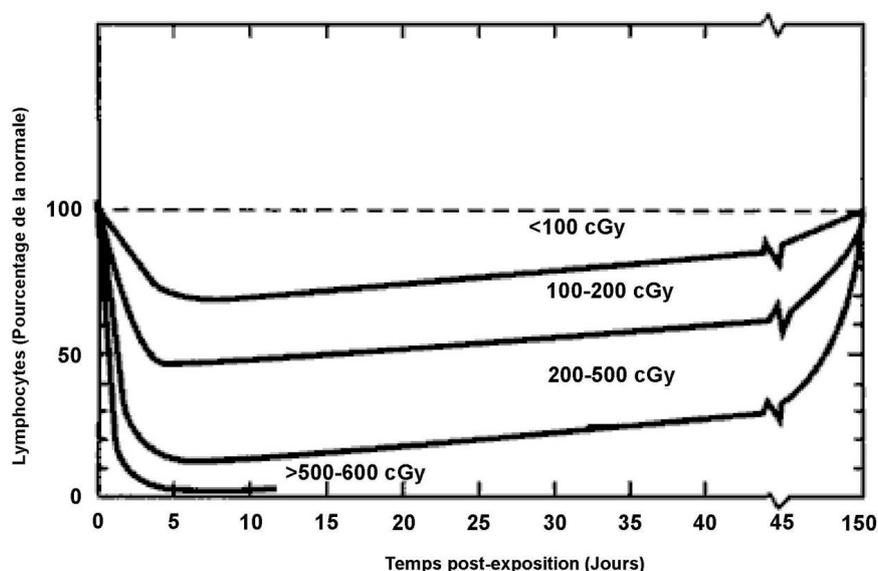


FIGURE 1.2.2: Évolution temporelle en fonction de la dose du taux de lymphocytes chez l'Homme après une exposition accidentelle.

(Source : Federation of American Scientists - Nato handbook on the medical aspects of NBC defensive operations. <http://www.fas.org/main/home.jsp>)

- **Le syndrome gastro-intestinal** apparaît à partir de 5.5 Gy et s’ajoute au syndrome hématopoïétique. Les symptômes biologiques se caractérisent par l’observation d’une destruction des cellules intestinales et donc de la muqueuse intestinale. Cliniquement, l’individu est sujet à des vomissements et des diarrhées.
- **Le Syndrome neurologique** ne s’observe qu’à partir de 7.5 Gy. Dès lors, les symptômes cliniques manifestés sont un œdème cérébral et le coma.

1.2.2 Les effets aléatoires ou stochastiques

Un effet biologique est dit aléatoire ou stochastique quand sa fréquence d’apparition présente un “caractère probabiliste”. Les effets stochastiques sont essentiellement la conséquence à long terme, chez un individu ou sa descendance, de la transformation d’une cellule de l’organisme exposé. Leur probabilité d’apparition augmente avec la dose d’irradiation (Figure 1.2.1 b) et leur gravité est indépendante de l’intensité d’irradiation. Ces effets stochastiques sont considérés sans seuil et la moindre “faible dose” possède une probabilité non nulle, de les générer. Cliniquement, on distingue deux catégories d’effets stochastiques : les effets cancérigènes et les effets héréditaires ([UNSCEAR, 2008](#)).

1.2.2.1 Les effets cancérigènes

Les cancers sont le résultat de lésions délétères, au niveau de l’ADN des cellules somatiques, ayant fait l’objet de réparations fautives mais viables. Un cancer radio-induit est le risque tardif redouté après une exposition aux radiations ionisantes, avec à titre indicatif, un délai d’apparition de 2 à 15 années pour une leucémie ([Verger et al., 1998](#)).

Les études épidémiologiques réalisées sur les survivants des bombes d’Hiroshima et Nagasaki, ont montré une augmentation significative du risque de cancer avec la dose absorbée ([Verger et al., 1998](#)). Cependant le risque d’apparition de cancer aux faibles doses, reste un sujet de controverses. En effet, l’augmentation du risque de cancers radio-induits est difficile à démontrer épidémiologiquement pour des doses inférieures à 100

mSv. Actuellement, le seul moyen d'étudier des risques associés aux faibles doses, consiste à extrapoler mathématiquement les résultats provenant des fortes doses (Commission, 2001). De plus, il est impossible actuellement de distinguer un cancer radio-induit d'un cancer non radio-induit. Les données menées sur des expérimentations animales, des systèmes *in-vitro* (Sankaranarayanan, 1991) et les données épidémiologiques permettent de faire progresser la connaissance sur les phénomènes de carcinogénèse radio-induits.

1.2.2.2 Les effets génétiques héréditaires

Une mutation sur des cellules germinales, peut induire des effets génétiques transmissibles à la descendance. Afin de mieux comprendre les effets génétiques des radiations ionisantes, de nombreuses études basées sur des expérimentations animales (expériences de mutagenèse des cellules germinales) ont été menées (Backlund et al., 2001), (Lindsay et al., 2007). Ainsi, des effets génétiques ont été prouvés sur quelques modèles (drosophile, souris), mais les résultats de ces effets sont difficilement extrapolables à l'Homme.

		Mother's radiation status ^{a)}			
		Unexposed	Low dose	Moderate dose	High dose
Father's Radiation status ^{a)}	Unexposed	294/31,904 (0.92%)	121/14,684 (0.82%)	23/2,932 (0.78%)	19/1,676 (1.1%)
	Low dose	28/3,670 (0.76%)	62/5,994 (1.0%)	7/703 (1%)	3/318 (0.9%)
	Moderate dose	12/839 (1.4%)	4/658 (0.6%)	6/615 (1%)	3/145 (2%)
	High dose	6/534 (1%)	4/422 (0.9%)	1/192 (0.5%)	1/145 (0.7%)

^{a)} Low dose = exposed at > 3 km, any shielding at 2.0–2.9 km, heavy or moderate shielding at 1.5–1.9 km, heavy shielding at < 1.4 km. Moderate dose = no shielding at 2.0–2.9 km, light shielding at 1.5–1.9 km, moderate or light shielding at 1.0–1.4 km, moderate shielding at < 1.0 km. High dose = no shielding at 1.0–1.9 km, light or no shielding at < 1.0 km, or presence of acute radiation symptoms at any distance < 3 km.

TABLEAU 1.2.1: **Incidence des effets génétiques observées sur une cohorte des descendants des survivants des bombes atomiques.** Aucune augmentation significative des effets génétiques n'est observée dans la descendance des survivants des bombes atomiques. D'après (Nakamura, 2006).

Les études épidémiologiques réalisées sur les descendants des survivants de Hiroshima et Nagasaki, comme le montre le Tableau 1.2.1, n'ont montré aucun résultat statistiquement significatif, sur l'induction d'effets génétiques héréditaires en réponse aux radiations ionisantes ([Satoh et al., 1996](#)), ([Nakamura, 2006](#)), ([Tubiana et al., 2006](#)). Même constatation sur les autres études épidémiologiques menées sur des patients ayant subi des traitements en radiothérapie ([Sankaranarayanan, 1991](#)).

CHAPITRE 1.3

L'INTERACTION DES RADIATIONS IONISANTES AVEC LES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS CELLULAIRES

Les effets biologiques correspondent aux effets observés lorsque les radiations ionisantes interagissent avec un tissu vivant. Les systèmes biologiques étant structurés en différents niveaux d'organisation (atomes, molécules, cellules, tissus et organismes), les réponses biologiques peuvent potentiellement être observables à tous ces niveaux d'organisation. L'irradiation d'une population de cellules produit une cascade d'évènements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques. Lors d'une irradiation, le caractère aléatoire des évènements de dépôt d'énergie implique que les modifications radio-induites sont susceptibles de se produire dans n'importe quelle molécule composante de la cellule. Ainsi, les radiations sont susceptibles d'endommager directement la structure fonctionnelle des protéines, lipides et acides nucléiques. À cela, s'ajoute les effets indirects produits par l'effet des molécules endommagées par les effets directs. Cependant, les dommages infligés aux différentes macromolécules de la cellule n'ont pas la même conséquence pour le devenir cellulaire.

1.3.1 Radiolyse de la molécule d'eau

La cellule étant composée à 80 % de molécules d'eau, l'interaction entre ces dernières et les radiations ionisantes reste la plus probable. L'interaction physique des rayonnements ionisants excite la molécule d'eau provoquant sa décomposition chimique. Ceci entraîne la formation d'espèces radicalaires d'hydrogène et d'hydroxyle, respectivement sous forme de radicaux libres $H\bullet$ et $OH\bullet$.

Ces espèces radicalaires se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires, non appariés dans une orbitale externe. Cela leur confère une grande réactivité chimique et une durée de vie très courte. Elles peuvent altérer chimiquement les autres constituants cellulaires (membrane, protéines et acides nucléiques). Notons que le radical hydroxyle est l'espèce radicalaire la plus réactive formée par la radiolyse de l'eau. Ces événements radiolytiques se produisent en trois étapes avec des échelles de temps différentes ([Le Caër, 2011](#)) :

1. **La phase physique** : s'étend de 0 à 10^{-15} secondes. Les molécules d'eau peuvent soit subir un processus d'ionisation soit un processus d'excitation. Lors de l'ionisation, un électron est éjecté. Celui-ci va alors s'entourer d'une cage de molécules d'eau, formant un électron dit aqueux et noté e^- .
2. **La phase physico-chimique** : s'étend de 10^{-15} à 10^{-12} secondes. La réorganisation des molécules d'eau ionisées ou excitées conduit à la formation du radical $H\bullet$ et du radical hydroxyle $OH\bullet$.
3. **La phase chimique** : s'étend de 10^{-12} à 10^{-6} secondes, les espèces diffusent dans la solution et peuvent réagir avec les autres espèces non radicalaires créées par recombinaison.

1.3.2 Les dommages aux lipides membranaires

Les membranes biologiques sont aussi susceptibles d'être endommagées par les radiations ionisantes. Les dommages membranaires, concernent la modification des phospholipides, constituant majeur, de la membrane plasmique. Ainsi, les fonctions de la membrane cellulaire peuvent être affectées comme notamment son rôle essentiel dans les échanges entre la cellule et le milieu environnant. Les radicaux libres générés lors de la radiolyse de l'eau, sont susceptibles de provoquer la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Gutteridge and Halliwell, 1990), (Repetto et al., 2012). Les réactions de peroxydation, modifient la structure et la fonction des lipides membranaires. Les réactions de peroxydation lipidique se déroulent en trois étapes (Figure 1.3.1) :

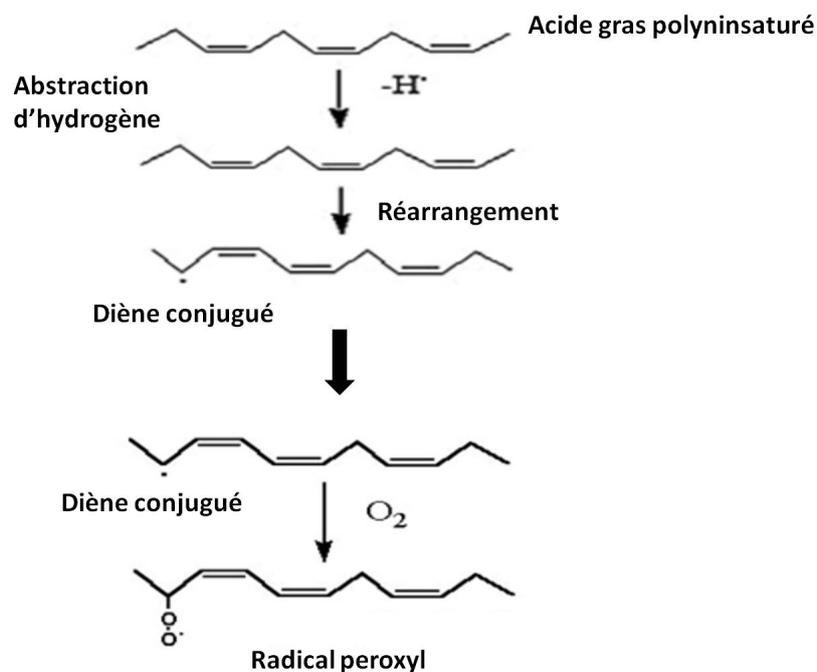


FIGURE 1.3.1: **Péroxidation lipidique**. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne amorcée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène ou addition d'un radical oxygène, entraînant des dommages oxydatifs et des acides gras polyinsaturés.

1. **L'étape d'initiation** : correspond à la réaction des radicaux hydroxyles OH^{\bullet}

avec les acides gras polyinsaturés aboutissant à la création de lipide radical.

2. **L'étape de propagation** : est caractérisée par la réaction des molécules d'oxygènes avec les lipides radicaux qui aboutira à la production de lipides peroxydes radicaux.
3. **L'étape de terminaison** : durant cette étape, les lipides peroxyde radicaux ($\text{ROO}\bullet$) sont transformés en lipide hydroperoxide (ROOH) stable aboutissant à la formation de différents produits de décomposition. Cette décomposition peroxydative aboutit à la formation de composés chimiques de deuxième génération comme les alcools, les cétones, les alcanes, aldéhydes et les éthers, néfastes pour les autres composants cellulaires.

1.3.3 Dommages aux protéines

Chaque cellule contient plusieurs milliers de protéines différentes, qui réalisent une grande variété de fonctions. Les radiations ionisantes peuvent altérer les protéines cellulaires, directement par impact au niveau des chaînes protéiques ou indirectement via les radicaux libres formés par la radiolyse de l'eau. Les dommages induits sur les protéines, peuvent engendrer des modifications structurales (fragmentation, réarrangements, modification des acides aminés, dimérisations par pontage intra- ou inter-protéines) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Les modifications chimiques les plus observées sont l'oxydation et la carbonylation entraînant la dénaturation et l'inactivation des protéines (Davies, 1987), (Stadtman and Levine, 2000), (Nyström, 2005), (Daly, 2012). Les radicaux libres agissent essentiellement sur les chaînes latérales de certains acides aminés (Stadtman and Levine, 2000). Les chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine), des acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sont les plus sujettes à l'oxydation. Le thiol des cystéines et le méthyle des méthionines sont oxydés en sulfates.

Les dommages aux protéines auraient des conséquences cellulaires surtout lors d'exposition à de fortes doses. Il semblerait que la différence de radiosensibilité extrême entre divers organismes (mammifères et bactéries radiorésistantes tel que *Deinococcus radiodurans* par exemple), pourrait être due à la présence de systèmes de préservation des fonctions protéiques essentielles pour la survie cellulaire comme par exemple la réparation des dommages à l'ADN (Daly, 2012).

1.3.4 Altération des acides nucléiques

L'ADN est constitué de deux brins complémentaires liés par des liaisons hydrogènes et qui s'arrangent en une structure en double hélice. Chaque brin est constitué d'un enchaînement de nucléotides, eux-mêmes composés de bases azotées, de sucres (désoxyribose) et de groupements phosphate (Figure 1.3.2).

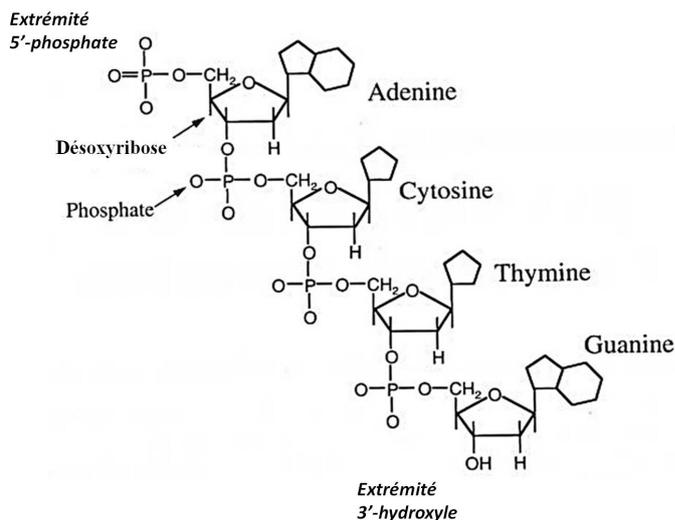


FIGURE 1.3.2: Structure d'un brin d'ADN. D'après(Hall EJ, 2011).

Les lésions à l'ADN peuvent être spontanées comme il s'en produit quotidiennement dans nos cellules ou provoquées par des agents extérieurs (UV, rayonnements ionisants, agent alkylants, autres toxiques, etc). Ces lésions sont considérées comme critiques, car

susceptibles d'induire des effets mutagènes et létaux. Par conséquent, les effets des radiations sur la structure de l'ADN, ont été largement étudiés ([Goodhead, 1994](#)) ([Kruhlak et al., 2006](#)), ([Kinner et al., 2008](#)). Comme pour toutes les autres biomolécules, les altérations à l'ADN peuvent être formées directement par des réactions d'ionisations et d'excitations ou indirectement via les radicaux libres présents dans l'environnement cellulaire .

Divers types de dommages à l'ADN peuvent être induits par les radiations ionisantes :

- cassures de chaînes d'ADN,
- altération des bases puriques et pyrimidiques,
- destruction des sucres,
- pontages ADN-protéines.

Les rendements des dommages à l'ADN causés par des rayonnements ionisants de faibles TEL, ont été estimés dans les cellules diploïdes de mammifères. Le Tableau 1.3.1 ci-dessous décrit les fréquences des différents types de dommages radio-induits ([Ward, 1988](#)). Les rayonnements de faible TEL, tels que les rayons γ , agissent sur l'ADN essentiellement par effet indirect, c'est-à-dire par l'intermédiaire des radicaux libres provenant de la radiolyse de l'eau. Les espèces radicalaires sont estimées être responsable entre 60-70 % des dommages à l'ADN, avec environ 30-40 % des dommages provenant de l'interaction directe des électrons avec l'ADN ([Hall EJ, 2011](#)). Précisons que les dommages à l'ADN radio-induits s'ajoutent aux dommages liés aux espèces radicalaires produits en permanence par le métabolisme oxydatif.

Type de dommage	Taux de dommages induits spontanément/cellule/jour	Fréquence de dommages radio-induits /cellule/Gy
Cassures simple-brin	55000	1000
Dommages de bases	3200	2000
Cassures double-brin	8	20-40
Pontage ADN-ADN	8	30
Pontages ADN-Protéine	?	150

TABLEAU 1.3.1: **Dommages à l'ADN induits spontanément et radio-induits** (d'après (Ward, 1988), (Rothkamm and Löbrich, 2003), (Stenerlöv et al., 2003), (Costes et al., 2010))

1.3.4.1 Cassures à l'ADN

On distingue deux types de cassures, les cassures simple brin et les cassures double brin (Figure1.3.3). La rupture simple brin de l'ADN peut survenir après ionisation au niveau de la liaison phosphodiester 3' ou 5' entre le phosphate et le désoxyribose. Une dose de 1 Gy provoquerait environ 1000 cassures simple brin par cellule (Tableau 1.3.1) (Ward, 1988). La quantité de cassures simple brin varie linéairement avec la dose et son taux de formation est plus faible lorsque le TEL du rayonnement augmente (Hall EJ, 2011).

Lorsque les ruptures de chaînes sont multiples et se produisent à quelques paires de base de distance, elles entraînent la formation de cassures double brin (Figure1.3.3). Les cassures double brin représentent un faible pourcentage des lésions de l'ADN radio-induites, car d'après la littérature, une dose de 1Gy provoquerait 20-40 cassures double brin par noyau (Ward, 1988), (Rothkamm and Löbrich, 2003), (Stenerlöv et al., 2003), (Costes et al., 2010). Leur induction est proportionnelle à la dose (Iliakis, 1991). La réparation de ce type de lésion est complexifiée en raison de l'absence de brin matrice pour

l'étape de resynthèse (Voir Chapitre 1.4.2). Si ces lésions sont non ou mal réparées, elles peuvent être létales pour la cellule (mort cellulaire suite au blocage de la réplication). En cas de réparation fautive, elles peuvent être à l'origine de translocation et d'aberrations chromosomiques responsables d'instabilité génomique (Badie et al., 1995).

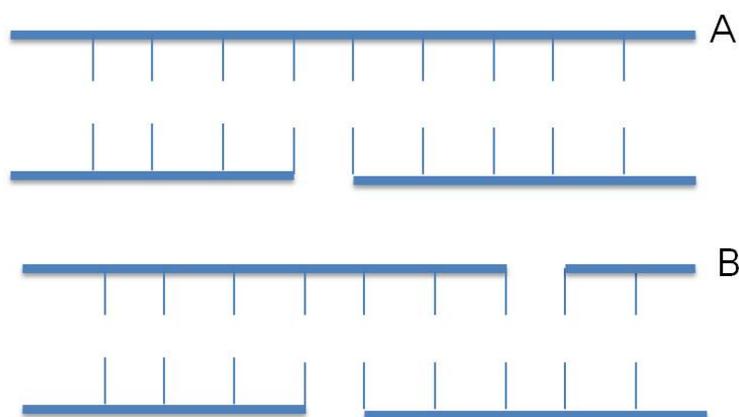


FIGURE 1.3.3: **Cassures simple brin et double brin.** Illustration d'une cassure simple brin (A) et d'une cassure double brin (B).

1.3.4.2 Altération des bases des nucléotides

Les radiations ionisantes interagissent avec les bases de l'ADN et peuvent former des bases oxydées. Ces modifications de bases résultent essentiellement de l'attaque par les radicaux hydroxyles (Cadet et al., 1999). Les bases pyrimidiques sont plus radio-sensibles que les bases puriques. Les produits d'oxydation sont présentés en Figure 1.3.4. Les radicaux hydroxyles agissent au niveau du cycle aromatique des pyrimidines (thymine et cytosine) (Cadet et al., 1997). Les radiations ionisantes sont aussi susceptibles de créer des sites abasiques résultant de l'élimination radio-induite d'une base normale.

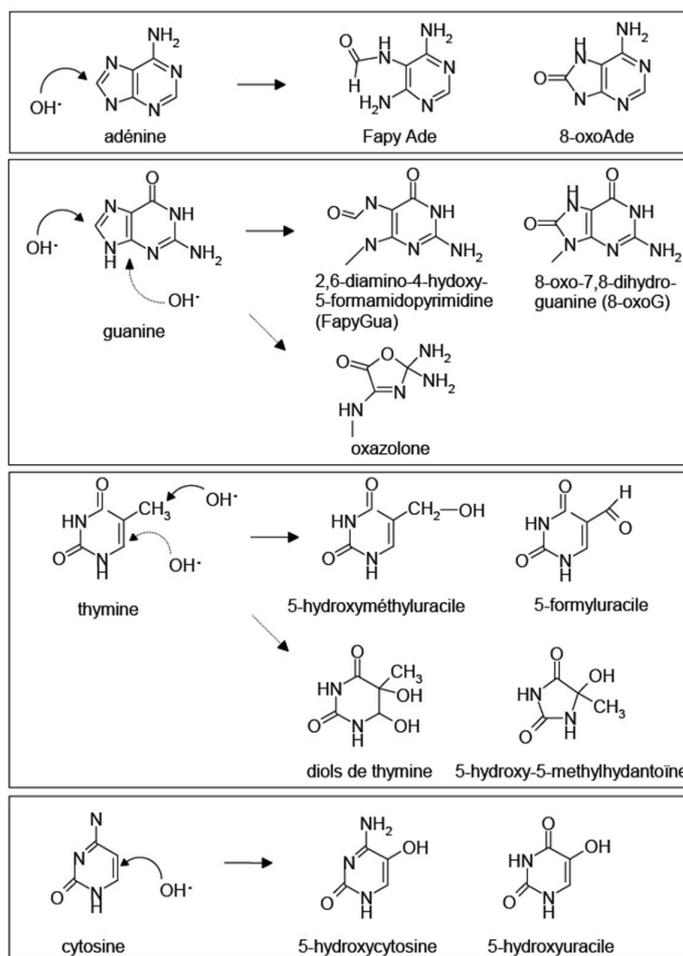


FIGURE 1.3.4: Les altérations des bases de l'ADN par l'hydroxyle radical. (Cadet et al., 1997)

1.3.4.3 Destruction des sucres

L'altération du 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles peut provoquer la libération de sucre avec une formation de cassures simple brin. L'attaque du désoxyribose en réponse aux radiations ionisantes, reste un phénomène rare (0.2 à 0.3 altérations pour 10 cassures simples brins radio induites)(Tubiana, 2008).

1.3.4.4 Pontage ADN-protéine

Les radiations ionisantes peuvent créer des pontages par formation de liaisons chimiques entre une base de l'ADN et un acide aminé (Cadet et al., 1997). Ces ajouts de

protéines modifient la structure de la molécule d'ADN et donc son fonctionnement. En effets, ces pontages se révèlent particulièrement embarrassants notamment, lors des processus de réplication et transcription nécessitant une séparation des deux brins d'ADN. Environ 150 pontages ADN-protéines par Gy, se formeraient par cellule pour les rayonnements de faibles TEL (Ward, 1988), (Goodhead, 1994). On peut noter que ces dommages sont plus nombreux que les cassures double brin. Des travaux ont pu mettre en évidence la formation de pontages, entre notamment les acides aminées et les bases suivantes :

- la tyrosine et la thymine (Weir Lipton et al., 1996), (Dizdaroglu et al., 1989), (Margolis et al., 1988),
- la tyrosine et la cytosine (Gajewski and Dizdaroglu, 1990),
- la lysine et la thymine (Morimoto et al., 1998).

CHAPITRE 1.4

RÉPONSE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE À L'IRRADIATION

La réponse cellulaire et moléculaire a été bien caractérisée chez les mammifères suite à des doses de rayonnements ionisants supérieures à 1 Gy. La plupart des mécanismes de réponse décrits prennent leur origine au niveau de la détection des dommages radio induits. En réponse aux lésions radio-induites des voies de transduction du signal sont activées. La transduction du signal correspond aux différents mécanismes moléculaires consistant à transmettre des signaux d'un compartiment cellulaire à un autre. Elle peut aboutir au contrôle de l'expression des gènes. Ces voies de signalisation sont nombreuses et complexes et peuvent interagir entre elles. Elles sont régulées par des modifications post - traductionnelles des protéines, le plus souvent par phosphorylation et déphosphorylation sous l'action de kinases et de phosphatases.

En ce qui concerne la réponse cellulaire aux dommages des protéines, tout ce qui est connu à l'heure actuelle concerne l'élimination des protéines altérées non fonctionnelles par le complexe du protéasome. Le complexe protéasome dégrade l'excès de protéines oxydés lorsque les modifications sont irréversibles ([Adams, 2003](#)). Des mécanismes de gestion spécifique des dommages aux protéines radio-induites n'ont pas encore été iden-

tifiés. Cependant, il a été démontré que la structure du protéasome peut être modifiée en réponse aux radiations ionisantes. En effet, il semblerait que l'exposition des cellules aux radiations ionisantes ralentit la vitesse de dégradation des substrats à travers le protéasome (Pervan et al., 2005).

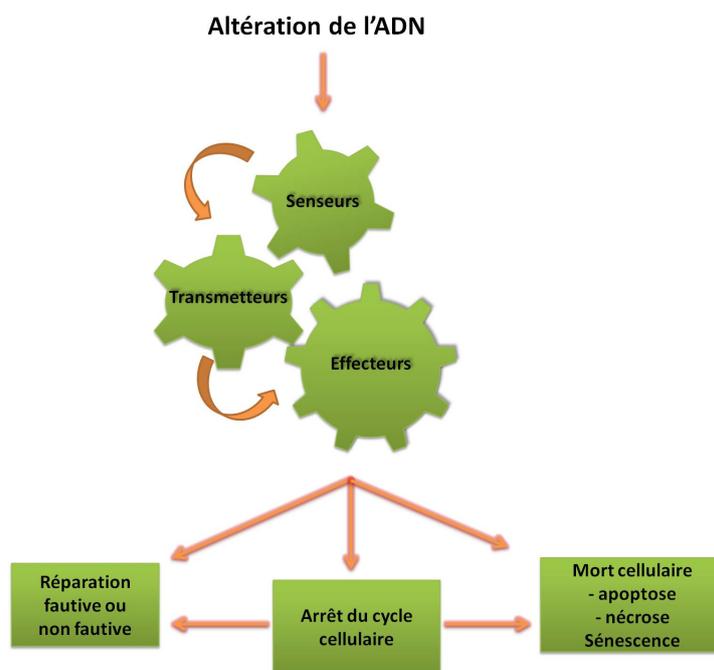


FIGURE 1.4.1: **Vision globale de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.**

La présence de dommages à l'ADN est signalée par des protéines détectrices (senseurs moléculaires) qui se lient aux dommages. Ensuite, sont déclenchées des cascades de signalisation (transmetteurs) visant à contrôler l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation ou la mort cellulaire (effecteurs).

Les conséquences des dommages à l'ADN ont été beaucoup étudiées et suivent un schéma global mis en place suite à leurs détections (Figure 1.4.1). On considère que la détection des dommages peut se faire par l'intermédiaire de trois processus cellulaires (Ljungman, 2005) :

- le blocage de la fourche de réplication,
- le blocage de la transcription,
- la modification structurelle de la chromatine.

Les dommages cellulaires précédemment cités sont susceptibles de produire des perturbations lors de ces différents mécanismes. L'ampleur de ces effets cellulaires dépend de la dose de rayonnement reçue par les cellules, du type de rayonnement et du type cellulaire. Les événements cellulaires induits peuvent s'échelonner dans le temps. Ainsi on observe immédiatement après l'irradiation la présence de dommage à l'ADN, puis la signalisation de ces dommages dans les minutes qui suivent. La réparation des lésions survient dans l'heure qui suit l'exposition.

1.4.1 Progression du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire décrit la vie d'une cellule depuis son apparition à partir d'une cellule mère jusqu'à sa propre division. Ce cycle comporte quatre étapes successives : la phase G1 (G = gap, intervalle), la phase S, la phase G2 et la phase M. La phase G1 intervient lors de la préparation de la synthèse du génome. La phase S est une phase durant laquelle la cellule duplique son génome (réplication de l'ADN). La phase G2 (ou prémitotique) est une phase de préparation à la division cellulaire, durant laquelle des contrôles sur des erreurs potentielles survenues après la réplication sont effectués. La phase M ou mitotique est une phase où l'on assiste à la répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Cette phase est aussi appelée mitose. Un cinquième état cellulaire est aussi décrit : la phase G0. Il correspond aux cellules quiescentes qui ne sont pas en division cellulaire.

La réplication du génome est une étape primordiale pour le maintien de la stabilité génomique. Par conséquent, il existe des processus complexes pour contrôler la réplication de l'ADN. Afin de permettre la réparation avant la réplication ou la division cellulaire, des points de contrôles (checkpoint) ou point de régulation du cycle cellulaire ont été décrits et permettent de retarder la progression dans les phases du cycle cellulaire en cas de lésion à l'ADN. On distingue deux points de contrôles : ceux visant à prévenir les anomalies de réplication (transition G1-S) et ceux vérifiant l'absence d'anomalie sur les

chromosomes pendant la mitose (transition G2-M) (Zhou and Elledge, 2000).

Les kinases cyclines dépendantes (*Cycline-dependent kinase*, CDK) forment une famille de protéines kinases qui jouent un rôle dans le déclenchement et le contrôle des différentes phases du cycle cellulaire. Il existe onze gènes chez les mammifères codant pour les CDK (Malumbres and Barbacid, 2005). Les protéines CDK inactives sous forme de monomère, sont activées sous forme de complexe avec une sous unité régulatrice : une cycline. À chaque phase du cycle cellulaire correspond un ou plusieurs complexes Cdk-cycline. Quatre protéines CDK clés complexées à différentes cyclines contrôlent la progression du cycle cellulaire : CDK 1, CDK 2, CDK 4 et CDK 6. Les partenaires régulateurs de chaque CDK sont présentés en Figure 1.4.2.

On distingue deux classes de cyclines :

- Les cyclines de la phase G1 : s'accumulent au cours de la phase G1(cyclines D) et permettent aux cellules de dépasser le point de restriction G1/S (cyclines E)
- Les cyclines de la mitose : s'accumulent et se lient aux CDK au cours de la phase G2 (cyclines A) et permettent aux cellules de progresser en phase M et donc dépasser le point de restriction G2/M (cycline B).

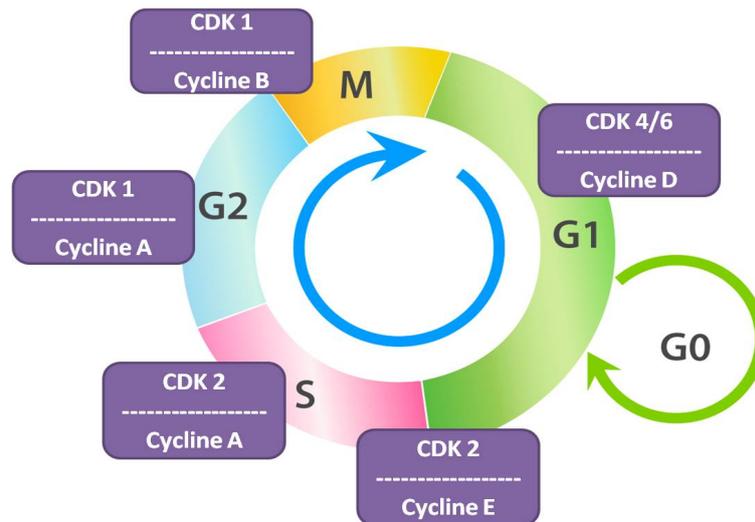


FIGURE 1.4.2: **Les points de régulation du cycle cellulaire.** Le cycle cellulaire se compose de quatre étapes successives : la phase G1 intervient lors de la préparation de la synthèse du génome, la phase S ou phase de duplication du génome, la phase G2 de préparation à la division cellulaire et la phase M pour la division cellulaire appelée mitose. La phase G0 correspond aux cellules quiescentes qui ne sont pas en division cellulaires. Les principaux points de régulation se situe en phase G1, S et G2. Les cyclines D liées aux CDK4 et CDK6 interviennent à la phase G1, la cycline E intervient aux phases G1 et S. Les cyclines A, liées soit au CDK2 soit au CDK1 interviennent aux phases S et G2 et les cyclines B, liées au CDK1 aux phases G2 et M.

Les complexes CDK/cyclines sont régulés de différentes manières. Les cyclines subissent des variations de leur taux protéique au cours du cycle, tandis que l'expression des CDK varie peu au cours du cycle cellulaire. Les CDK peuvent être régulées par des kinases et phosphatases activatrices et inhibitrices, ainsi que par des molécules inhibitrices appelées les CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*). Les phosphatases Cdc25 A, B et C sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire par la déphosphorylation activatrice des CDK.

Deux grandes familles d'inhibiteur des complexes CDK/cyclines ont été décrites. La première famille concerne les inhibiteurs KIP/CIP (CDK inhibiting protein) et regroupe des protéines comme CDKN1A, CDKN1B et CDKN1C qui inhibent la plupart des complexes CDK/cyclines (Nakayama, 1998). L'autre famille concerne les inhibiteurs

INK4 (*Inhibitor of CDK4*) constitués des protéines CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C et CDKN2D qui inhibent spécifiquement CDK4 et CDK6 (action en phase G1) ([Nakayama, 1998](#)), ([Roussel, 1999](#)).

1.4.1.1 Mécanismes moléculaires de l'arrêt en phase G1

L'un des points de contrôle se produit en phase G1 du cycle cellulaire et détermine si la cellule peut progresser en phase de réplication S ou s'arrêter en phase G1. Ce point de régulation diminue les risques de fixation des dommages durant la phase de réplication S. La progression du cycle cellulaire est stimulée par l'activation de deux protéines kinases régulatrices CDK4 et CDK2 en association respective avec les cyclines de type D et cyclines de type E . Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'arrêt de la progression du cycle cellulaire sont présentés en Figure 1.4.3.

Dans des conditions normales, le gène de la protéine Cdc25A est activé en phase G1 suite à une stimulation mitogénique. La phosphatase Cdc25A régule la progression en phase S par déphosphorylation des complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. En réponse à des dommages à l'ADN, il se produit une signalisation des dommages dépendante des protéines kinases ATM et ATR ([Abraham, 2001](#)). Elles activent respectivement par phosphorylation les protéines Chk1 (sérine 317/345) et Chk2 (thréonine 68). L'activation de ces kinases entraîne la phosphorylation de la protéine P53 (sérine 15 et 20) et l'inactivation de Cdc25A. La phosphorylation radio-induite de P53 empêche la fixation de mdm2 sur P53 favorisant sa stabilisation et son accumulation dans le noyau. Cette accumulation va induire la régulation de l'expression de nombreux gènes dont la surexpression de CDKN1A, membre de la famille des inhibiteurs KIP/ CIP. La protéine CDKN1A empêche la progression du cycle cellulaire en inhibant le complexe CDK2/cycline E. De plus, l'inactivation de la phosphatase Cdc25A séquestrée dans le cytoplasme par Chk2 entraîne la dégradation des cyclines D et E nécessaires pour initier la progression en phase S ([Iliakis et al., 2003](#)).

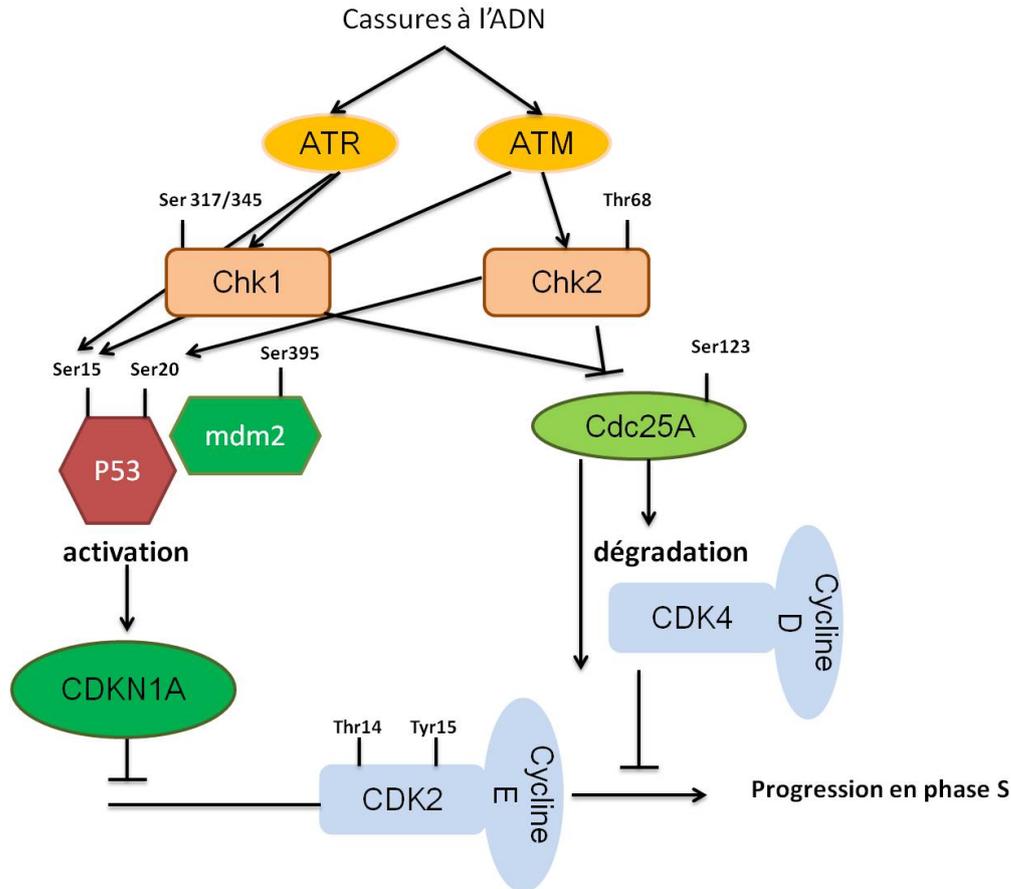


FIGURE 1.4.3: Organisation moléculaire du point de contrôle G1 du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Traduit de (Iliakis et al., 2003))

1.4.1.2 Mécanismes moléculaires de l'arrêt en phase G2

Un autre point de régulation de la progression du cycle cellulaire a lieu en phase G2 (Iliakis et al., 2003). L'irradiation des cellules peut produire un arrêt temporaire en phase G2. En présence de lésions à l'ADN, les protéines kinases CHK1 et CHK2 activées par ATM et ATR phosphorylent la phosphatase Cdc25C sur la sérine 216 et Cdc24A sur la sérine 317 et 345 comme l'illustre la Figure1.4.4, (Iliakis et al., 2003). Cette activation stimule l'union de Cdc25C avec la protéine SFN et cette union serait la clé de l'arrêt du cycle en phase G2 (Hermeking et al., 1997), (Peng et al., 1998). En effet, elle rendrait la

protéine Cdc25C moins stable, entraînerait sa séquestration dans le cytoplasme ainsi que sa dégradation par le protéasome empêchant alors la progression du cycle cellulaire en phase M. De plus, le complexe CDK1/Cycline B se retrouve phosphorylé sur la tyrosine 15 par l'enzyme Wee1 (protéine kinase à activité tyrosine) entraînant son inactivation et donc l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2. D'un autre côté, la protéine CDKN1A activée par P53 bloque la phosphorylation activatrice de la protéine kinase CAK (*Cdk Activating Kinase*) sur le complexe CDK1/cyclineB, responsable de la non progression du cycle cellulaire en phase de mitose en réponse à des dommages à l'ADN.

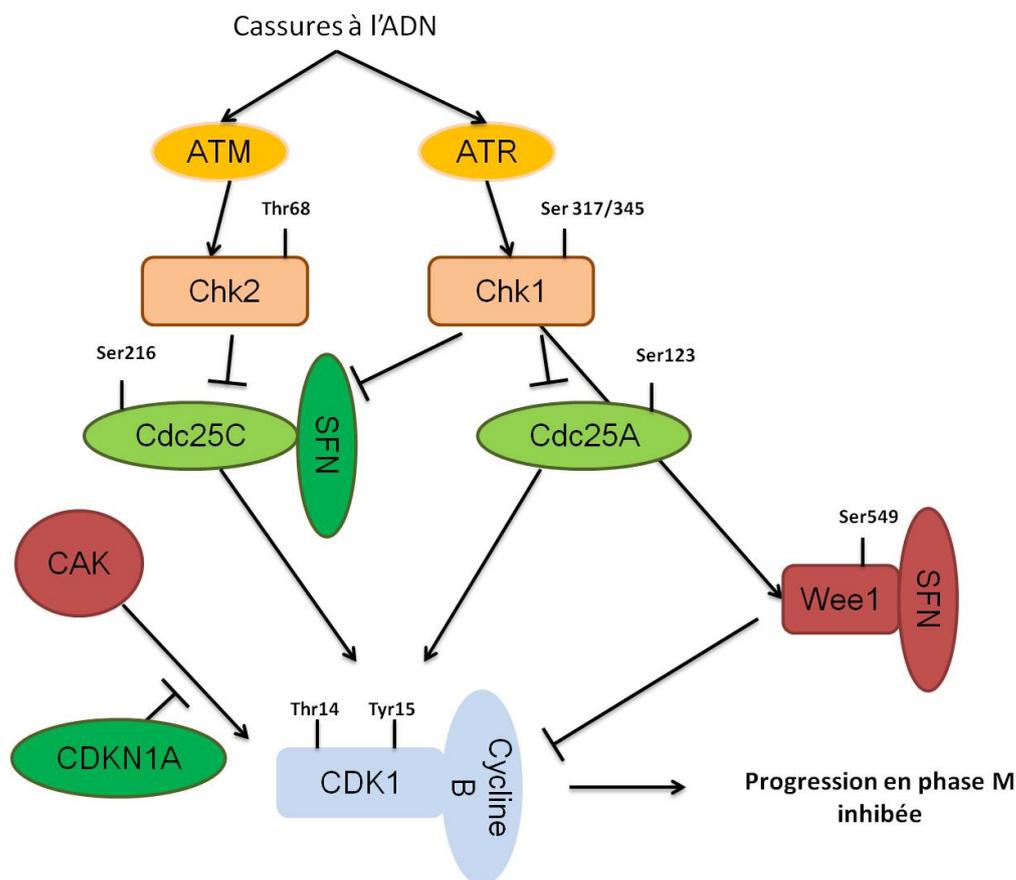


FIGURE 1.4.4: Organisation moléculaire du point de contrôle G2 du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Traduit de (Iliakis et al., 2003))

1.4.2 Les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN

Les systèmes de réparation sont très conservés chez les mammifères ([Christmann et al., 2003](#)). Ainsi, notre matériel génétique est relativement stable malgré toutes les erreurs possibles dans le génome et ceci grâce à la présence de systèmes de réparation efficaces et hautement spécifiques. La réparation des dommages à l'ADN et sa fidélité s'avèrent primordiales. La réparation des dommages est assurée par le recrutement de diverses protéines en fonction de l'altération présente sur l'ADN ([Ting and Lee, 2004](#)).

1.4.2.1 Mécanismes de réparation des cassures simple brin et bases endommagées de l'ADN

Il existe deux principaux systèmes de réparation des dommages aux bases et des cassures simple brin de l'ADN.

- **La réparation par excision de base (BER)** : ce système de réparation peut réparer les bases endommagées, les sites abasiques ainsi que les cassures simple-brin. On distingue deux voies de réparation : la voie "*short patch repair*" et la voie "*long patch repair*" ([Hoeijmakers, 2001](#)), ([Christmann et al., 2003](#)), ([Fortini and Dogliotti, 2007](#)). Lorsqu'il s'agit d'une base endommagée, la voie (*short patch repair*) est initiée et la base endommagée est reconnue par une glycosylase créant un site abasique qui sera incisé par une AP endonucléase (ou AP Lyase) ([Schärer and Jiricny, 2001](#)), ([Dizdaroglu, 2005](#)). Dans les cellules de mammifères, les petites lésions de la taille d'un nucléotide sont comblées par l'ADN polymérase β . Enfin, le complexe XRCC1-ligase III crée une liaison covalente entre l'extrémité 3'-OH libre et le 5'-phosphate adjacent (5'dRP : deoxyribosephosphate) ce qui permet de rétablir la continuité du brin d'ADN ([Christmann et al., 2003](#)), (Figure 1.4.5).

Immédiatement après la génération d'une cassure simple brin, la voie *long patch repair* est initiée et la brèche est détectée par la protéine poly ADP-ribose polymérase 1, (PARP-1). Les brèches formées sont ainsi comblées par l'ADN polymérase ϵ et δ ,

PCNA catalyse cette réaction de synthèse. Les nucléotides du monobrin contenant le site AP sont alors éliminés par l'endonucléase FEN-1 et la ligation est assurée par la ligase I (Christmann et al., 2003), Figure 1.4.5).

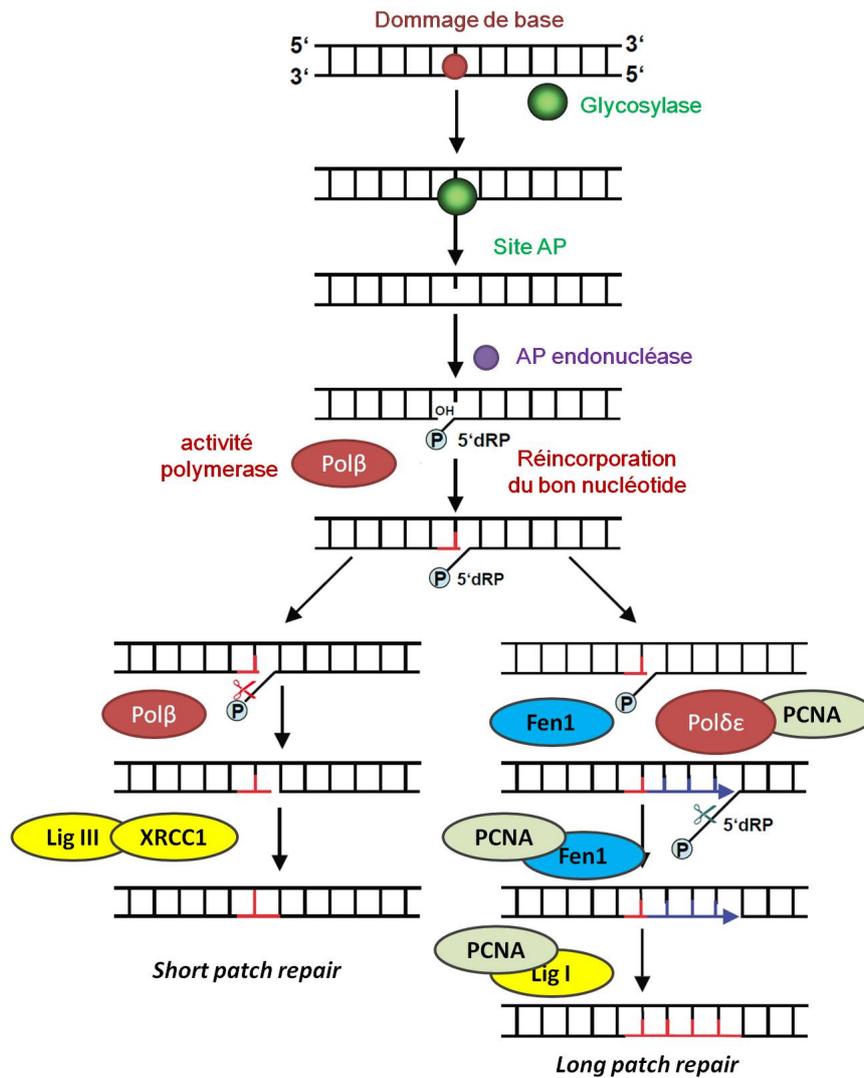


FIGURE 1.4.5: Mécanisme de réparation par excision de base (BER) (Christmann et al., 2003).

- La réparation par excision de nucléotides (NER) : ce système de réparation est capable de reconnaître de plus grosses liaisons que le BER. En effet, la répa-

ration par excision de nucléotides remplace une chaîne de bases endommagées. Ce mode de réparation comporte une voie couplée à la transcription et une voie dite globale pour les lésions hors transcription (Hoeijmakers, 2001), (Christmann et al., 2003). Ces deux voies se distinguent au niveau de l'étape initiale de la détection de la lésion car les deux voies utilisent essentiellement les mêmes gènes.

La voie de réparation dite globale est enclenchée pour réparer des lésions indépendamment de leur localisation. Les principales étapes mises en œuvre sont la reconnaissance du site de l'endommagement par les protéines XPC-HR23B, RPA-XPA ou DDB1-DDB2. Une fois la lésion détectée, le facteur de transcription TFIIH avec ses sous-unités XPB /XPD est recruté comme l'illustre la Figure 1.4.6. Grâce à l'activité ATPase et hélicase des sous-unités XPB et XPD le complexe multiprotéique TFIIH procède à l'ouverture de la double hélice au niveau de la lésion. Le facteur de réplication RPA et la protéine XPA sont recrutés. L'excision de l'oligonucléotide portant la lésion est assurée par les endonucléases XPG et XPF-ERCC1. L'étape de resynthèse peut alors débuter avec le recrutement de la machinerie de réplication. Le facteur PCNA est recruté. Enfin, la re-synthèse se fait par Pol δ ou Pol ϵ où chaque nucléotide incorporé suivra la règle de la complémentarité des bases. La ligation du brin néo-synthétisé est assurée par l'ADN ligase I. Le fragment ainsi restauré pourra alors être utilisé comme matrice pour les réactions de réplication et/ou de transcription (Christmann et al., 2003).

A la différence de la voie dite globale, la réparation couplée à la transcription est déclenchée par la présence de lésions dans le brin transcrit de gènes actifs entraînant un blocage de l'ARN polymérase II au niveau de la lésion. Les protéines CSA et CSB orientent l'ARN polymérase II en la déplaçant au niveau de la lésion. Ce processus fait ensuite intervenir les facteurs de transcription TFIIS et TFIIH, l'ARN polymérase est éliminée de l'ADN, le rendant ainsi accessible aux exonucléases XPF et XPG responsables de l'excision de l'ADN au niveau de l'oligonucléotide portant la lésion (Figure 1.4.6). La synthèse réparatrice et la ligation sont effectuées comme dans le cas de la réparation BER. Ce mécanisme est vu plus en détail dans la revue

de Christmann *et al* (Christmann *et al.*, 2003).

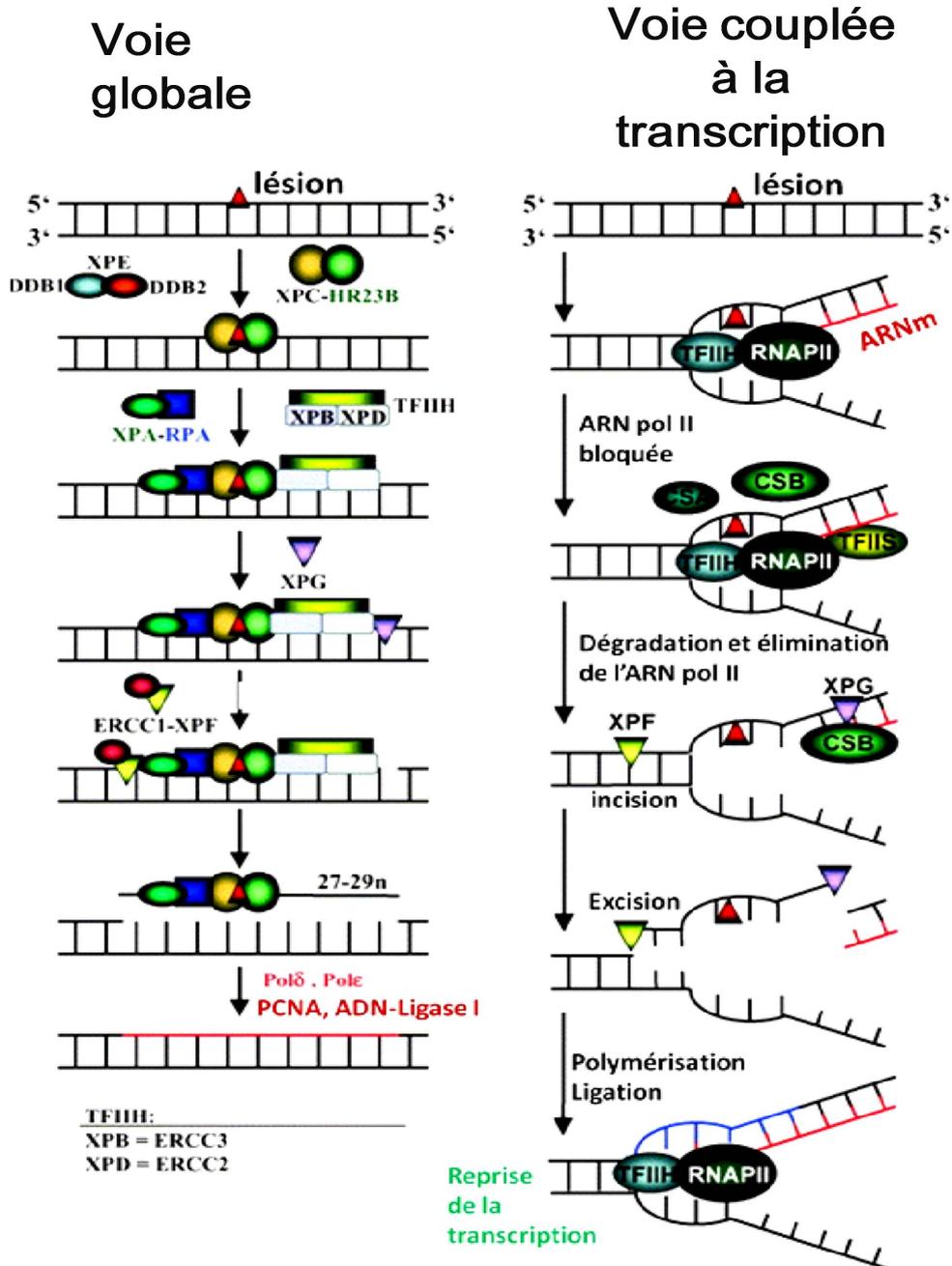


FIGURE 1.4.6: Mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER) (Christmann *et al.*, 2003). Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) peut avoir lieu lors de la réparation par voie globale ou celle couplée à la transcription.

1.4.2.2 Mécanismes de réparation des cassures double-brin

Il existe deux systèmes majeurs de réparation des cassures double brin, la réparation par recombinaison homologue ainsi que la jonction des extrémités homologues ([Christmann et al., 2003](#)), ([Karagiannis and El-Osta, 2004](#)). Une liste non exhaustive des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des cassures double brin est présentée dans le Tableau 1.4.1 ci-dessous.

Processus de réparation	Protéines
Reconnaissance	ATM, H2AX, NBS1, MRE11, RAD50, 53BP1, MDC1, BRCA1, SMC1, RNF8, RAP80, Abraxas et UBC13
Jonction des extrémités non homologues (NHEJ)	Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, Lig4, Artemis et XLF
Recombinaison homologue (RH)	RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD54, RAD54B et RPA

TABLEAU 1.4.1: **Protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des CDB.** (D'après ([Ohnishi et al., 2009](#)))

- **Recombinaison homologue (RH)** : ce système de réparation est dit fidèle car il se base sur la recherche d'homologie de séquence avec la séquence lésée ([Christmann et al., 2003](#)) (Figure 1.4.7). La séquence homologue sert alors de matrice pour réparer la cassure. Après la formation d'une cassure double brin dans la structure de l'ADN, la protéine kinase ATM active par phosphorylation le complexe M.R.N (Mre11- RAD50-NBS1) qui est alors recruté au niveau du site de l'ADN endommagé. L'activité exonucléase 5' → 3' du complexe M.R.N engendre la formation d'ADN simple brin avec des extrémités protubérantes en 3'.

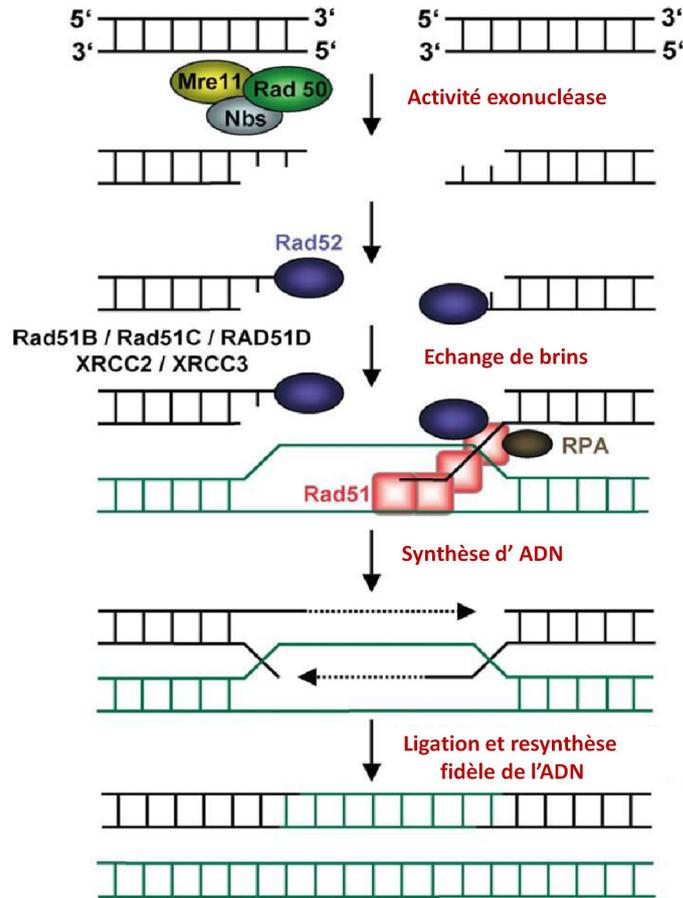


FIGURE 1.4.7: . **Réparation des cassures double brin par le mécanisme de recombinaison homologue (RH)**. La recombinaison homologue commence avec résection nucléolytique dans le sens 5' → 3' assurée par le complexe protéique MRE11-Rad50-NBS1, formant un 3' un fragment d'ADN simple brin, auquel se lie Rad52. Rad52 interagit avec Rad51, provoquant un échange de brin d'ADN avec le brin intact d'ADN homologue. L'assemblage de la nucléoprotéine Rad51 est facilitée par différentes protéines paralogues (comme Rad51B, RAD51C et RAD51D, XRCC2 et XRCC3). Après la synthèse de l'ADN, la ligature et la migration du brin, la structure initiale de l'ADN est résolue. D'après (Christmann et al., 2003).

Les protéine RPA et Rad52 viennent se fixer au niveau de ces extrémités protubérantes afin d'éviter leur dégradation par les exonucléases et ainsi permettre le recrutement des protéines Rad 51B, Rad 51C, Rad 51D, jouant un rôle clé dans la RH (Tableau 1.4.1). Ainsi après reconnaissance du brin d'ADN homologue par

la protéine Rad51, la copie double brin d'ADN intacte est utilisée comme matrice pour réparer les extrémités cassées (Ohnishi et al., 2009), (Thompson, 2012).

- **Jonction des extrémités non homologues (NHEJ)** : le NHEJ est un des mécanismes de réparation des cassures double brin dans les cellules humaines (Christmann et al., 2003), (Ohnishi et al., 2009), (Thompson, 2012). Au cours de la réparation NHEJ, les ruptures double-chaînes sont détectées par les protéines ku80 / ku70 qui se fixent au niveau de la cassure. Les protéines Ku recrutent alors la sous-unité catalytique de la protéine DNA-PKcs. Les deux extrémités de la cassure double brin sont transformées en bouts francs. Après résection des extrémités par la protéine Artemis, la cassure double brin est reliquée par la ligase IV, complexée avec XRCC4, comme l'illustre la Figure 1.4.8, (Christmann et al., 2003).

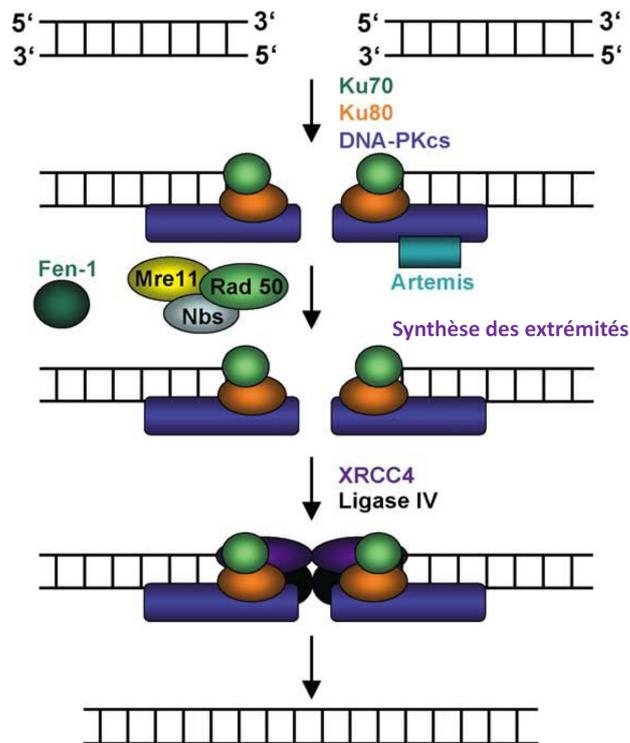


FIGURE 1.4.8: **Réparation des cassures double brin.** Le complexe MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 est recruté au niveau de la cassure double brin, avant la réparation par jonction des extrémités homologues. D'après (Christmann et al., 2003).

Ce mécanisme de réparation est en général moins fidèle que la RH car il peut être

associé à une perte de quelques nucléotides lors de la réparation de la cassure double brin. La liste des protéines impliquées dans ce mécanisme de réparation est présentée au Tableau 1.4.1.

1.4.3 Mort cellulaire radio-induite

Il est actuellement admis qu'en cas d'impossibilité de réparation des dommages, un processus de mort cellulaire peut être engagé. Les radiations ionisantes peuvent induire trois types de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et la sénescence. Ces phénomènes de mort cellulaire sont généralement observés lors d'expositions provoquant un grand nombre de dommages (doses élevées) ou / et une grande complexité de ces dommages (TEL élevé). La fréquence d'observation de la mort cellulaire radio-induite dépend également du type cellulaire étudié.

1.4.3.1 L'apoptose

Le processus d'apoptose a été mis en évidence en 1972 par John Kerr et ses collaborateurs ([Kerr et al., 1972](#)) désignant une forme particulière de mort cellulaire. L'apoptose est un processus actif, exigeant de l'énergie sous forme d'ATP ([Zheng et al., 1991](#)), ([Nicotera and Melino, 2004](#)). Le processus apoptotique est courant dans le développement embryonnaire dans lequel certains tissus deviennent désuets. Morphologiquement, une cellule apoptotique est caractérisée par une condensation de la chromatine suivi d'un bourgeonnement de la membrane plasmique. Biochimiquement, l'évolution ultérieure conduit à la mort mitochondriale, avec chute du potentiel transmembranaire, découplage de la chaîne respiratoire, production de radical superoxyde, fuite du calcium et du glutathion ([Favaudon, 2000](#)). La cellule est finalement réduite à l'état de "corps apoptotiques" phagocytés par les cellules voisines comme l'illustre la Figure 1.4.10, ([Majno and Joris, 1995](#)). La mort par apoptose peut être initiée par des radicaux libres, par l'hypoxie, par des agents cytotoxiques, par des métabolites lipidiques (céramide) et surtout par les cassures double brin de l'ADN ([Tubiana, 2008](#)).

La proportion de cellules mourant par apoptose après irradiation, est très variable selon le type cellulaire (Cui et al., 1999). L'ADN nucléaire et la membrane plasmique, constituent les principales cibles initiant les processus d'apoptose radio-induite (Favau-don, 2000), (Tubiana, 2008), (Roos and Kaina, 2013). L'apoptose radio-induite provenant de l'altération de la molécule d'ADN stimule l'activation d'ATM, induisant une stabilisation de la protéine P53. La protéine P53 induit l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Cui et al., 1999) et réprime l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-Xl. L'entrée en apoptose peut avoir lieu durant toutes les phases du cycle cellulaire et est sous contrôle d'un certain nombre de protéines. L'induction des protéines pro-apoptotiques induit l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale favorisant la libération du cytochrome c dans le cytosol. En revanche, La protéine anti-apoptotique Bcl-2 empêche l'homodimérisation de Bax, empêchant ainsi une perforation de la membrane mitochondriale et le relargage de cytochromes c dans le cytosol (Strasser et al., 1994), (Reed, 1994). Le cytochrome c entraîne le recrutement de la pro-caspase-9 par Apaf-1 (apoptosome). La libération de la caspase-9 entraîne l'activation de la caspase-3 effectrice de l'apoptose.

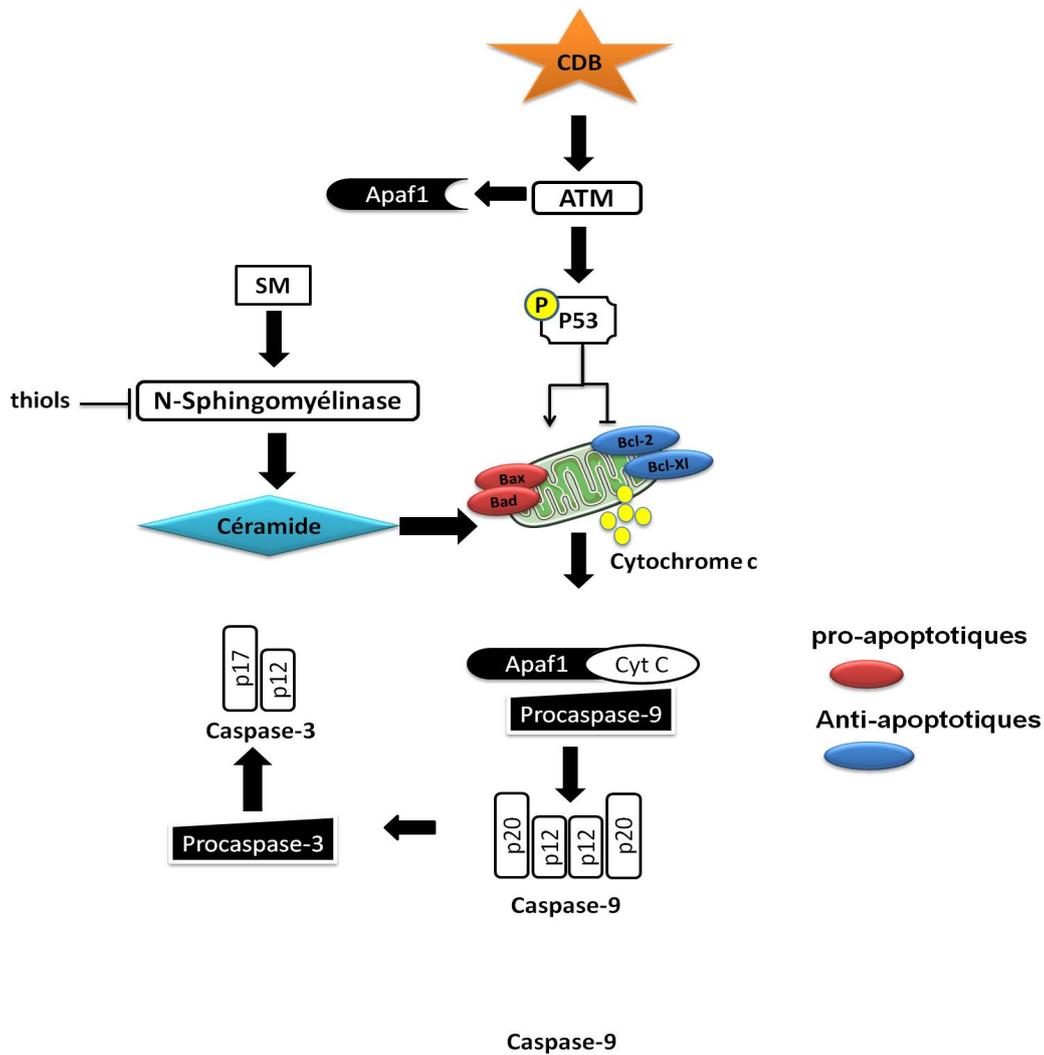


FIGURE 1.4.9: **Schéma simplifié de la voie intrinsèque de l'apoptose radio-induite.** La protéine p53 peut agir dans le noyau sur les régions promotrices de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques, Bax, NOXA, Bak et PUMA. Il est admis que la surexpression de ces protéines en réponse aux dommages à l'ADN peut favoriser la sortie du cytochrome c. Adapté de (Tubiana, 2008).

L'apoptose peut aussi être induite suite à l'altération des lipides membranaires. Des céramides (métabolites lipidiques) peuvent être libérées après dégradation de la sphingomyéline (SPM), principale constituant de la membrane plasmique par la sphingomyélinase (Favaudon, 2000). Les céramides, agissent comme des seconds messagers dans un grand nombre de voies de transduction du signal. En réponse aux radiations ioni-

santes, l'activation de la voie de signalisation SPM-céramide induirait la mort cellulaire par apoptose (Levade et al., 1996), (Figure 1.4.9). Cette voie de signalisation serait dépendante de l'activation du facteur de transcription P53 (Dbaiibo et al., 1998).

1.4.3.2 La nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est un processus dégénératif rapide et incontrôlé. La mort cellulaire par nécrose peut survenir à la suite de dommages provoqués par un agent physique ou chimique. D'un point de vue morphologique un gonflement de la cellule et de ses organites est observé. Enfin, une lyse cellulaire se produit avec pour conséquence la destruction irréversible de la membrane cellulaire par choc osmotique et la libération du contenu cellulaire dans le milieu extra-cellulaire (Majno and Joris, 1995), (Nicotera and Melino, 2004). Cette libération peut entraîner une réaction inflammatoire. Les caractéristiques morphologiques de la nécrose sont illustrées en Figure 1.4.10.

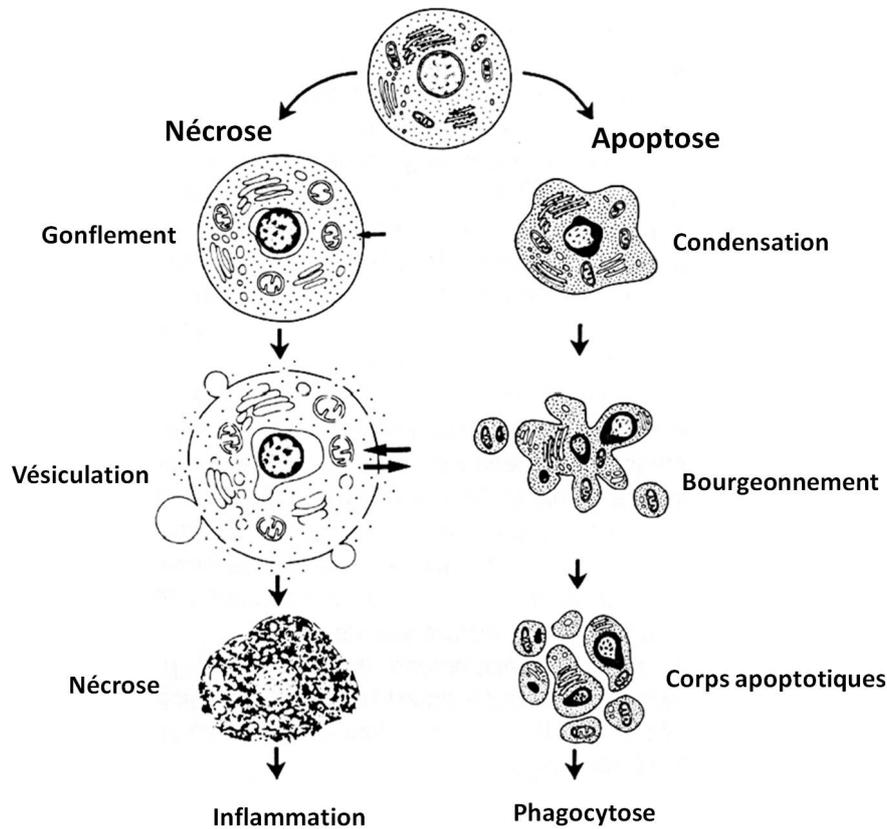


FIGURE 1.4.10: Évolution morphologique d'une cellule subissant la mort par apoptose et par nécrose. D'après (Majno and Joris, 1995)

1.4.3.3 Sénescence

La "sénescence répllicative" a été découverte en 1961 par Leonard Hayflick. Ses expérimentations *in vitro* lui ont permis de constater que les fibroblastes diploïdes arrêtaient irrévocablement de se répliquer après environ 50 divisions (Hayflick and Moorhead, 1961). La sénescence est caractérisée par un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. La sénescence peut être considérée comme un processus protecteur pour l'organisme en inhibant définitivement la prolifération des cellules dans lesquelles un processus d'instabilité génomique pourrait se produire (Mevorach et al., 2010), (Sabin and Anderson, 2011). On observe la sénescence en réponse à divers stimuli endogènes (stress oxydatif, oncogènes) ou exogènes (radiations ionisantes, UV, etc). En réponse aux dommages à l'ADN, les principaux intervenants moléculaires dans la sénescence sont les protéines

P53, Rb et CDKN1A ([von Zglinicki et al., 2005](#)), ([Becker and Haferkamp, 2013](#)).

CHAPITRE 1.5

LA PROBLÉMATIQUE DES FAIBLES DOSES

Il n’y a pas de consensus sur les doses correspondantes aux “faibles doses”. Cette notion est relative et dépend du sujet d’étude. Dans ce travail, le terme “faibles doses” a été défini pour décrire les doses n’induisant pas significativement les réponses cellulaires décrites au chapitre 1.4 et pour lesquelles l’épidémiologie n’a pas aujourd’hui mis clairement en évidence d’effet délétère pour la santé. Cela correspond à des doses inférieures à 100 mGy pour les cellules humaines et une irradiation par des photons.

1.5.1 Réponse moléculaire identifiée aux faibles doses

Nous avons vu au chapitre précédent que suite à la détection des dommages à l’ADN, des voies de transduction du signal se mettent en place afin de recruter différents acteurs moléculaires amenant à une réponse cellulaire. Certaines études tendent à démontrer que l’efficacité des systèmes de réparation mis en place aux fortes doses est différente aux faibles doses ([Rothkamm and Löbrich, 2003](#)), ([Grudzenski et al., 2010](#)). Ainsi, ils proposent l’hypothèse que le niveau de dommage doit avoir atteint un seuil pour initier le déclenchement des cascades de signalisation intracellulaire, pouvant aboutir à une réponse cellulaire telle que la réparation, l’arrêt du cycle ou encore l’apoptose. Il est

généralement admis que le taux de dommages aux cellules est proportionnel à la dose de rayonnement reçue par les cellules. Ainsi, le taux de cassures double brin est estimé entre 20 et 40 cassures par cellule pour une dose de 1 Gy de rayonnement γ . De ce fait, le nombre de cassures double brin pour une dose de 10 mGy est estimé entre 0.2 et 0.4 cassures par cellule. Selon ces constatations, si une réponse cellulaire et moléculaire aux faibles doses existe, il est envisageable qu'elle ne dépende pas ou peu des dommages à l'ADN.

1.5.2 Phénomènes biologiques identifiés aux faibles doses

Des phénomènes biologiques aux faibles doses, ont pu être mis en évidence. Ces phénomènes sont qualifiés de non ciblés, en d'autres termes ils surviennent dans les cellules non touchées directement par le rayonnement ionisant ([UNSCEAR, 2006b](#)).

1.5.2.1 Effet bystander

L'effet bystander ou effet de voisinage, induit par les rayonnements est un phénomène par lequel des dommages cellulaires caractéristiques des cellules irradiées sont exprimés dans des cellules voisines non irradiées ([Coates et al., 2004](#)), ([Morgan and Sowa, 2007](#)). Le mécanisme exact de l'effet bystander n'est pas entièrement élucidé à ce jour, mais plusieurs études démontrent l'existence d'une signalisation inter-cellulaire entre les cellules irradiées et les cellules voisines ([Azzam and Little, 2004](#)), ([Morgan and Sowa, 2007](#)). Les jonctions communicantes pourraient permettre l'échange inter-cellulaires de potentiels médiateurs (espèces réactives de l'oxygène, petits métabolites, ions, facteurs solubles) entre les cellules irradiées et non irradiées ([Yang et al., 1998](#)), ([Mesnil and Yamasaki, 2000](#)), ([Azzam et al., 2001](#)). Les conséquences de l'effet bystander sont l'apparition de mutations, de cassures double brin, la formation de micronoyaux, la mort par apoptose ([Seymour and Mothersill, 2000](#)), ([Furlong et al., 2013](#)) et d'expression de gènes au sein des cellules non exposées ([Chaudhry and Omaruddin, 2011](#)), ([Hei et al., 2008](#)).

1.5.2.2 Instabilité génomique

Le terme d'instabilité génomique se définit comme l'augmentation du taux d'acquisition d'altération dans le génome. L'instabilité génomique est un phénomène retrouvé après différents stress. L'instabilité radio-induite est observée après l'exposition, mais de manière tardive et se manifeste dans la descendance des cellules exposées (Figure 1.5.1). On considère qu'un échec dans les processus de réparation des dommages à l'ADN est susceptible d'entraîner des phénomènes de déstabilisation du génome dès les premières mitoses (Little, 2000). Cette instabilité génomique s'observe à travers l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques (Lorimore et al., 1998), (Lorimore et al., 2005), des micronoyaux, des dommages à l'ADN et des mutations de gènes (Huang et al., 2003).

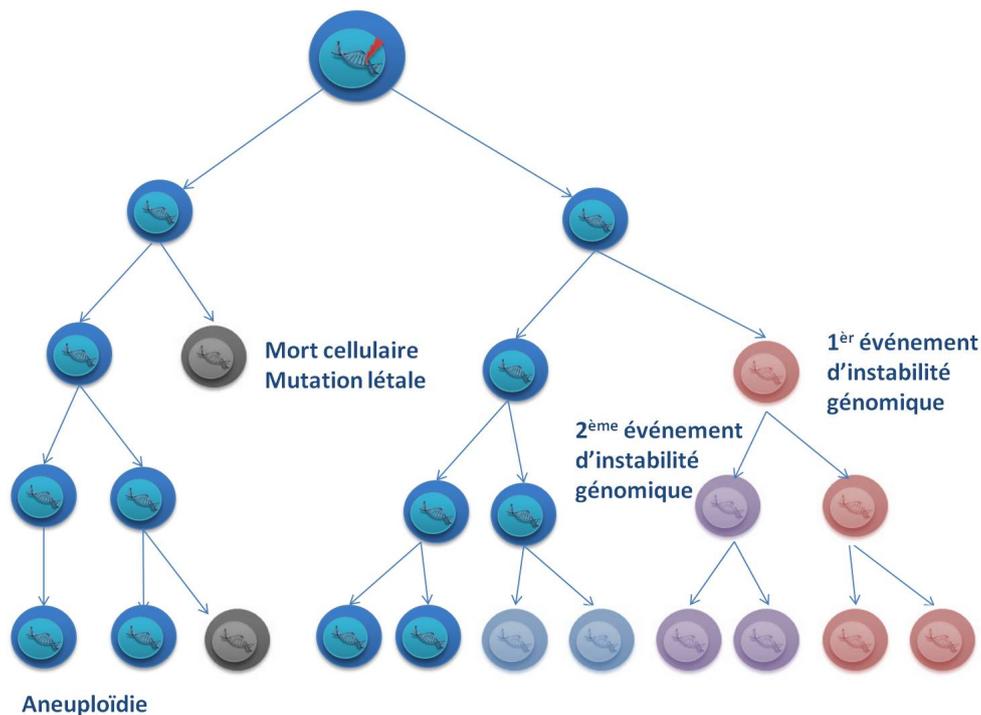


FIGURE 1.5.1: **Représentation schématique de l'instabilité génomique radio-induite.** Les cercles bleus foncé représentent les cellules de type sauvage normale. Les cercles gris représentent les cellules présentant des mutations létales. Enfin les cellules violettes et rouges représentent les événements d'instabilité génomique.

L'instabilité génomique, peut également se manifester dans la descendance des cellules touchées indirectement, par le phénomène bystander (Lorimore et al., 2003), (Morgan, 2003), (Coates et al., 2004), (Morgan and Sowa, 2007). Une récente étude, propose un seuil de 500 mGy pour l'induction des phénomènes d'instabilité génomique (Koterov, 2005). Cette étude est notamment supportée par des travaux récents, qui semblent valider ce seuil de dose, sur un modèle murin (Zyuzikov et al., 2011).

1.5.2.3 Réponse adaptative

En radiobiologie, la réponse adaptative décrit un phénomène au cours duquel des cellules exposées aux très faibles doses de rayonnements ionisants, deviennent plus aptes à faire face aux expositions ultérieures à des doses élevées (Cai and Liu, 1990), (Rigaud, 1993), (Wolff, 1998), (Feinendegen et al., 2004). La réponse adaptative radio-induite a été décrite pour la première fois en 1984 par une expérience basée sur l'induction d'aberration chromosomique dans des lymphocytes humains (Olivieri et al., 1984). Une pré-exposition de lymphocytes humains à de faible dose a pour conséquence une adaptation cellulaire entraînant une diminution de la fréquence des aberrations chromosomiques lors de l'administration ultérieure d'une dose forte (Sankaranarayanan et al., 1989), (Cai and Liu, 1990).

L'adaptation radio induite par de faibles doses a été attribuée à l'induction d'un mécanisme de réparation des cassures de l'ADN plus efficace lors de la deuxième exposition à des doses élevées, conduisant à moins de dommages résiduels. Cette hypothèse a été renforcée par une étude dans laquelle a été constatée que la mutation des gènes ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4 et ERCC5 codant pour des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (voie de réparation NER), pourrait empêcher la réponse adaptative (Hafer et al., 2007). La population humaine présente une hétérogénéité au niveau de la réponse adaptative, ce phénomène semble dépendant de la constitution génétique de la personne.

Il a été néanmoins établi une relation entre les phénomènes d'instabilité génomique, l'effet bystander et la réponse adaptative (Mothersill and Seymour, 2004), (Scott, 2004). Les signaux de voisinage induisent une réponse adaptative qui protège les cellules de l'effet mutagène des rayonnements ionisants (Iyer and Lehnert, 2002), (Zhang et al., 2009). Malgré la variabilité inhérente de ces trois phénomènes biologiques, ils seraient potentiellement reliés par des voies de signalisations communes. La compréhension actuelle de ces mécanismes complexes radio-induits aux faibles doses reste confuse, bien qu'un certain nombre de rapports ait été publié (Shadley and Wolff, 1987), (Shadley, 1994), (Seong et al., 1995), (Wolff, 1998), (Mothersill and Seymour, 2004).

CHAPITRE 1.6

ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME EN RÉPONSE AUX RADIATIONS IONISANTES

A l'issue du séquençage du génome humain¹ le nombre de gènes codant pour au moins une protéine a été estimé à 35 000 ([Lander et al., 2001](#)). Aujourd'hui, de nouvelles estimations réduisent ce chiffre à 30 000 (source NCBI). Les séquences des gènes peuvent être transcrites en ARN messagers (ARNm). Ceux-ci sont traduits en une séquence spécifique d'acides aminés (protéines) par la suite. Le transcriptome constitue l'ensemble des ARNm présents dans un type cellulaire donné à un moment donné et dans une condition biologique précise. Ce transcriptome est dynamique et reflète l'activité d'une cellule dans un environnement donné. Il évolue au cours des différents événements de la vie cellulaire (différenciation cellulaire, la mort cellulaire, la division cellulaire...), mais également en réponse à des stimuli comme une exposition aux radiations ionisantes ([Amundson et al., 1999b](#)).

1. La longueur du génome humain est de 3000 Mégabases

1.6.1 Mécanismes de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes

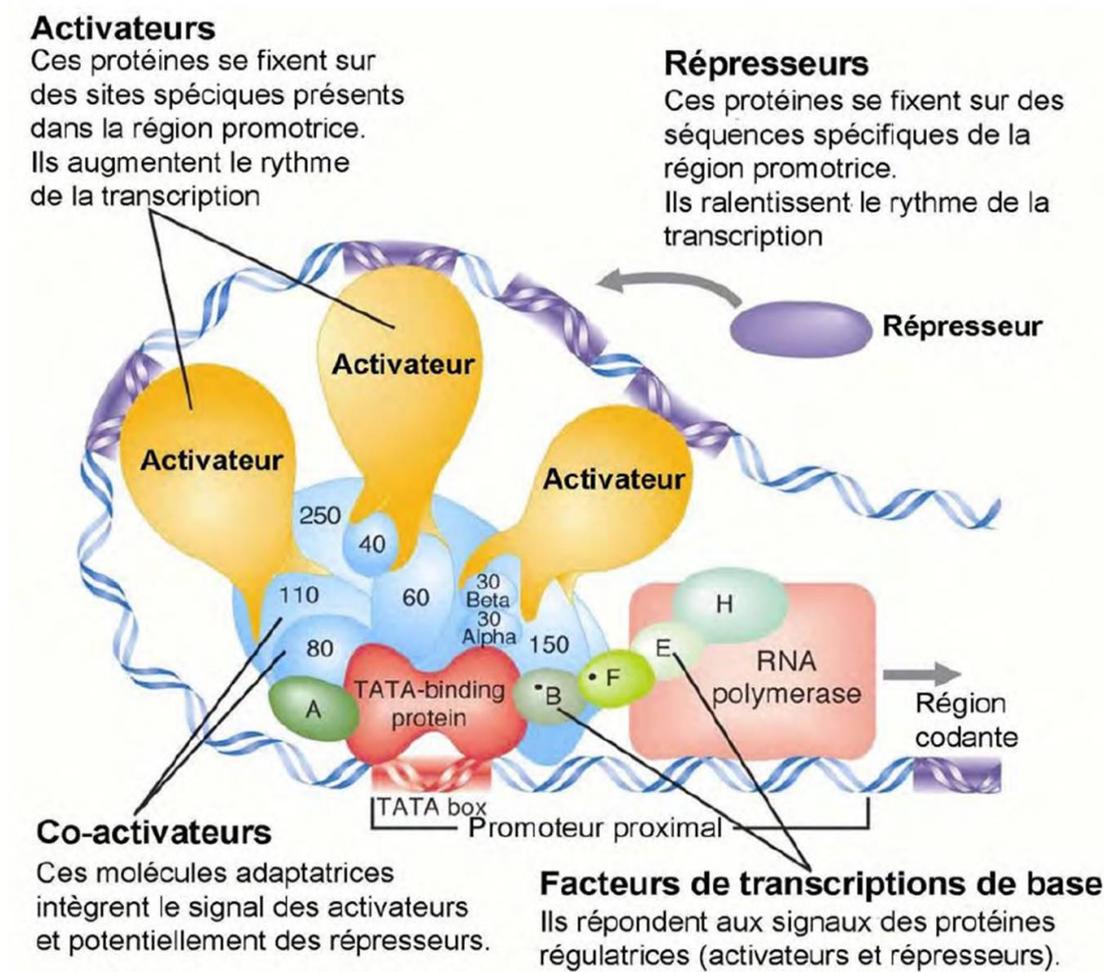
L'expression des gènes peut être régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle font intervenir des acteurs moléculaires impliqués dans la transcription des régions codantes de l'ADN en ARN. Les régulations post transcriptionnelles concernent les mécanismes de régulation de la demi-vie des ARNm.

1.6.1.1 Mécanismes de régulation transcriptionnelle

La régulation de la transcription chez les eucaryotes résulte des propriétés structurales de l'ADN et d'interaction avec des protéines de liaison appelées facteurs de transcription. On dénombre environ 2000 facteurs de transcription humains contrôlant l'expression des gènes (Messina et al., 2004). Ils peuvent être classés selon leur structure protéique tridimensionnelle (les protéines à doigt de zinc, hélice-tour-hélice, hélice-boucle-hélice) (Patikoglou and Burley, 1997). Ces différents motifs structuraux constituent la spécificité des facteurs de transcription pour les séquences consensus auxquels ils se lient (Figure 1.6.2). La fixation à ce motif spécifique entraîne la stimulation ou l'inhibition du complexe d'initiation de la transcription.

Les promoteurs proximaux sont des séquences d'ADN adjacents au site d'initiation de la transcription, ils participent à la régulation de l'expression des gènes. Chez les eucaryotes, ils sont généralement situés à quelques centaines de paires de bases du site d'initiation de la transcription. Ces promoteurs deviennent actifs lorsque des facteurs de transcription viennent s'y fixer. Dès lors, l'ARN polymérase II, qui transcrit l'ADN en ARNm peut se lier à ce complexe ADN/protéine pour constituer le complexe d'initiation de la transcription. Dans de nombreux organismes eucaryotes, le promoteur proximal contient des séquences conservées appelées boîte TATA, CAT et GC qui représentent des motifs constitutifs sur lesquels ce complexe protéique (facteur de transcription et

ARN polymérase) d'initiation de la transcription se forme (Figure 1.6.1).



Adapté d'après Dr Steven M. Carr (<http://www.mun.ca/biology/scarr/Directory.htm>)

FIGURE 1.6.1: **Complexe protéique de la régulation transcriptionnelle des gènes eucaryotes.** La transcription d'un gène donné est régulé par une combinaison de protéines tels les facteurs de transcription et l'ARN polymérase. L'organisation moléculaire des processus transcriptionnels a un impact sur le sort cytoplasmique d'un ARNm donné, et le niveau d'une éventuelle synthèse protéique.

Il existe également, des éléments plus distants du site d'initiation de la transcription : les enhancers et les silencer. Ils peuvent par l'intermédiaire de repliement complexe de l'ADN et de protéines activatrices et répresseurs interagir avec la machinerie proximale d'initiation de la transcription. L'analyse de ces séquences (promoteurs proximaux et enhancer/silencer) peut fournir des éléments nécessaires à l'identification des acteurs

moléculaires qui entrent en jeu dans la modification de l'expression des gènes.

Quand bien même les facteurs de transcription sont présents dans la cellule, la transcription ne se produit pas toujours. En effet, l'accès des séquences cibles de l'ADN par les facteurs de transcription peut s'avérer compliqué. L'état de condensation de la chromatine peut limiter l'accès des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase aux promoteurs (Li et al., 2007) et pour que la transcription du gène puisse avoir lieu, une décondensation peut être nécessaire (Komili and Silver, 2008). La structure de la chromatine peut être modifiée durant la différenciation cellulaire, la sénescence (Funayama and Ishikawa, 2007) ou durant le cycle cellulaire (Polo and Almouzni, 2005) et participe ainsi à la modulation des gènes du transcriptome (Agarwal and Rao, 1998).

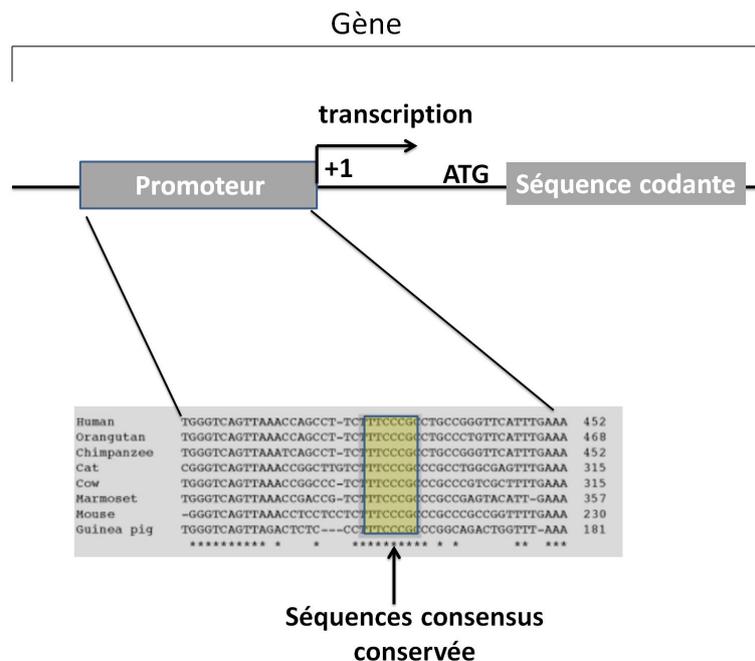


FIGURE 1.6.2: séquence consensus de promoteur génique

1.6.1.2 Mécanismes de régulation post-transcriptionnelles des ARNm

1.6.1.2.1 Dégradation exonucléolytique des ARNm

La régulation de la demie-vie des ARNm est un facteur pouvant intervenir dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm. Les ARNm ont des demi-vies très variables, de quelques minutes à quelques heures, voire quelques jours (ARNm codant la globine et l'ovalbumine) (Russell and Liebhaber, 1996). Chez les eucaryotes, la majorité des ARNm portent une coiffe composée de 7-méthylguanoses à leurs extrémités 5', ainsi qu'une queue poly(A) en 3' d'une longueur de 200 résidus d'adénosine qui les protègent de la dégradation en 5' → 3' ou en 3' → 5' respectivement (Day and Tuite, 1998), (Moore, 2005). Leur stabilité peut être modifiée en réponse à des signaux cellulaires. Par exemple, dans des conditions inflammatoires, la cytokine IL4 augmente la stabilité de l'ARNm de la protéine VCAM-1 causant alors une augmentation de l'expression (en quantité et en temps) de cette molécule d'adhérence (Croft et al., 1999). Les extrémités 5' ou 3' transcrites non traduites des ARNm sont porteuses de signaux intervenant dans cette régulation post-transcriptionnelles (Day and Tuite, 1998).

La principale voie de dégradation des ARNm est initiée par le raccourcissement de la queue poly (A) jusqu'à son retrait complet, suivie d'une dégradation exonucléolytique. Leur dégradation se fait donc par un complexe protéique appelé exosome, composé d'exonucléases. L'exosome a été intensivement étudiée depuis sa découverte en 1997 chez *S. cerevisiae* (Mitchell et al., 1997).

1.6.1.2.2 Dégradation par les microARN

Les microARN sont de courts ARN considérés comme non codants pour des protéines, ils comportent environ 22 nucléotides. Le premier microARN appelé lin-4 a été découvert en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Le génome humain contient plus de 1600 gènes à l'origine de la transcription des microARN selon la requête

effectuée sur la base de donnée miRBase en juin 2013². L'implication de ces derniers a récemment été décrite dans la réponse aux stress ([Leung and Sharp, 2010](#)), ([Ferguson, 2011](#)).

Les microARN sont transcrits au début et à partir d'un gène en microARN primaire (pri-miRNA) avec une structure en tige boucle. Ensuite, le pri-miRNA est clivé dans le noyau par la ribonucléase Drosha et donne naissance à un ARN double brin précurseur (pre-miRNA). Transporté dans le cytoplasme, le pre-miRNA est ensuite clivé par une enzyme de la famille Dicer (RNase III) qui se charge de l'hydrolyse de la structure boucle. Ainsi, se forme un microARN mature avec une structure double brin. Le microARN mature interagit avec la protéine Argonaute pour former un complexe RISC (RNA induced silencing complex). Le complexe RISC guide ensuite le microARN vers la région 3' non codante (3'UTR) de l'ARNm. Ce complexe RISC est responsable de l'activité "silencing" des microARN. En effet, cet appariement sur un site cible de l'ARNm (en anglais : microRNA responsive element ou MRE) conduit au clivage de l'ARNm cible et donc réprime la traduction de la protéine correspondante ([Leung and Sharp, 2010](#)), ([Hartmann et al., 2013](#)).

Le facteur de transcription P53 est capable de réguler la transcription des microARN en réponse aux dommages à l'ADN. Récemment, des rapports de plusieurs laboratoires parviennent à la même conclusion : les membres de la famille des miR-34 sont des cibles directes de p53 ([Bommer et al., 2007](#)), ([Chang et al., 2007](#)), ([He et al., 2007](#)), ([Raver-Shapira et al., 2007](#)). En effet, en réponse aux dommages à l'ADN, p53 semble capable d'induire la transcription des gènes responsables de la synthèse de miR-34a, miR-34b et miR-34c. La famille miR-34 est impliquée dans la régulation de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence ([Hermeking, 2007](#)). Le facteur Myc est aussi connu pour augmenter l'expression d'un groupe de six microARN : miR-17-5p, miR-18, miR-19, miR-20, miR-92 et miR-106 ([O'Donnell et al., 2005](#)). La capacité intrinsèque des

2. www.miRBase.org

micro ARN à agir comme des régulateurs négatifs de la transcription est susceptible d'influencer des voies de signalisation entraînant une altération des processus cellulaires y compris ceux en réponse aux radiations ionisantes ([Joly-tonetti and Lamartine, 2012](#)), ([Metheetraitut and Slack, 2013](#)).

De nombreuses études ont démontré que le niveau de transcription des microARN pouvait être modifié (augmentation ou diminution de la synthèse) en réponse à différentes doses de radiations ionisantes et dans des types cellulaires variés ([Templin et al., 2011](#)), ([Chaudhry et al., 2012](#)), ([Metheetraitut and Slack, 2013](#)). À titre d'exemple de récents travaux ont démontré que le microARN let-7 a une expression modulée en réponse à l'irradiation dans divers types cellulaires ([Chaudhry et al., 2010](#)), ([Chaudhry et al., 2012](#)). Le micro ARN let-7 influence la survie cellulaire en régulant négativement l'expression des gènes Cdc25a, K-RAS, MYC ([Büssing et al., 2008](#)), ([Chaudhry et al., 2012](#)).

Chaudry et ses collaborateurs ([Chaudhry et al., 2012](#)) ont révélés une augmentation de l'expression du microARN let-7, miR-21 , miR-15a et miR-143 en réponse à une dose de 100 mGy de radiations ionisantes. Cette étude a aussi révélé que les microARN miR-17-3p, miR-17-5p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-18a, miR-19a et miR-19b étaient aussi induits en réponse à une irradiation à faible dose (100 mGy) et impliqués dans la régulation du gène c-MYC ([Chaudhry et al., 2012](#)).

Une récente étude a révélé des modifications dans l'expression des microARN dans les cellules sanguines en provenance de patients traités par radiothérapie ([Templin et al., 2011](#)). Cette dernière étude a montré qu'un ensemble de microARN était induit en réponse à l'irradiation et que parmi les gènes réprimés, certains étaient la cible des microARN induits ([Templin et al., 2011](#)). Ces études montrent le potentiel des micro ARN dans la compréhension de l'altération globale de l'expression des gènes en réponse à l'irradiation.

1.6.2 Historique de mesure du transcriptome

Mesurer l'expression d'un gène consiste à mesurer l'abondance de l'ARNm produit à partir de ce gène à un instant donné. Plusieurs techniques d'analyse du transcriptome se sont développées pour permettre d'analyser l'activité transcriptionnelle des gènes d'un organisme. Elles peuvent se classer selon trois approches fondées sur :

- la migration électrophorétique
- l'hybridation
- le séquençage

Les techniques fondées sur l'hybridation sont apparues dans les années 70. Le principe d'hybridation stipule que deux fragments d'acide nucléique complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon spécifique et réversible. Le principe fondateur de ces techniques repose sur la détection de séquences d'ADN par hybridation d'un brin complémentaire marqué et donc observable. La technique de "southern Blot" développée en 1975 par E.M Southern a ensuite été adaptée à l'étude des ARNm (northern), parallélisée et miniaturisée pour aboutir à la technologie des biopuces dans les années 90. Ces technologies de criblage à haut débit se sont révélées être des outils particulièrement performants pour déterminer l'expression de plusieurs milliers de gènes en simultanée ([DeRisi, 1997](#)).

Dans ce travail nous avons exclusivement évalué le transcriptome en utilisant des puces à oligonucléotide. Une puce à oligonucléotide est constituée de plusieurs centaines ou milliers de sondes nucléotidiques déposées ou synthétisées sur un support solide de quelques centimètres carrés, chaque sonde étant spécifique d'un ARNm. Le taux d'hybridation est quantifié pour chaque sonde de la puce. Il est proportionnel à l'abondance relative de l'espèce d'ARNm concerné dans l'échantillon de départ et donne donc une mesure du niveau d'expression du gène correspondant. Cette technologie repose sur la combinaison de plusieurs domaines, ce qui nécessite le regroupement de compétences multidisciplinaires pour une utilisation pertinente. Parmi ces domaines en question on

distingue la :

- **Biologie** : pose le problème biologique sous forme de question.
- **Chimie** : Les procédés d'hybridations spécifiques relèvent du domaine de la chimie.
- **Microtechnologie** : est un domaine utilisé pour la miniaturisation des dépôts d'oligonucléotides sur les lames de verres et leur lecture.
- **Bio-informatique** : développe des méthodologies statistiques adaptées pour l'étude de l'immense quantité de données générées par ces approches.

Les publications traitant de l'analyse des données issues des puces à ADN/oligonucléotides ont augmenté considérablement depuis la fin des années 90 et ceci dans différents domaines (Figure 1.6.3).

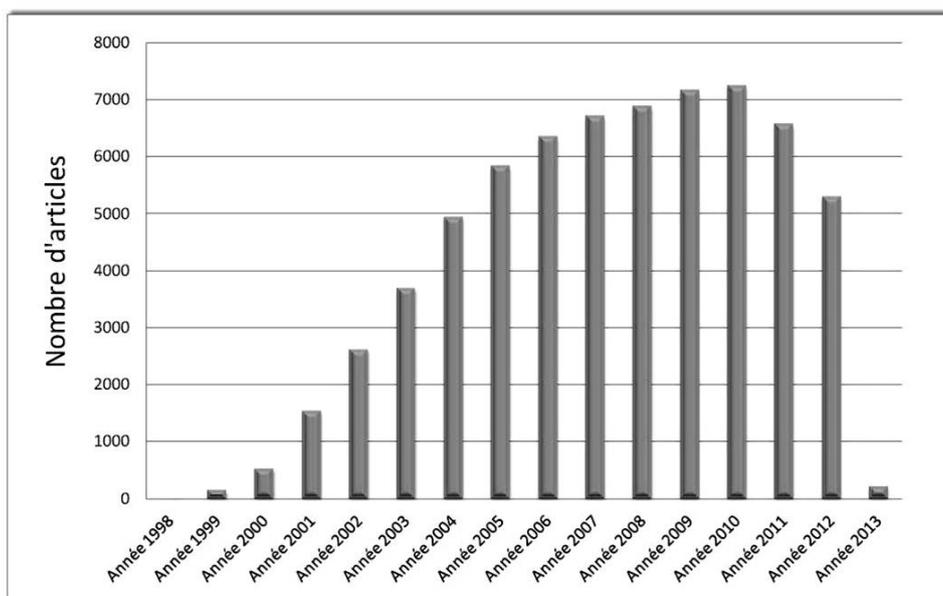


FIGURE 1.6.3: **L'analyse des données de biopuce dans la littérature scientifique de 1998 à nos jours (source : PubMed)**. Croissance du nombre d'articles référencés dans PubMed sous le terme "Microarray Analysis" (requête réalisée en mars 2013).

En effet, les technologies exploitant l'information contenue dans le transcriptome ont été utilisées avec succès dans la classification de tumeurs (Golub et al., 1999), (Nguyen

and Rocke, 2002) et sont parfois utilisées en routine dans le diagnostic de certaines maladies (Devauchelle et al., 2004), (Nzeusseu Toukap et al., 2007). D'ailleurs, étudier le transcriptome se révèle particulièrement intéressant car il est possible de le considérer comme un trait phénotypique à part entière.

1.6.3 Effets des radiations ionisantes sur la transcription des gènes

Avant l'arrivée des approches à haut-débit, l'induction de la transcription de gènes a été décrite en 1980 chez *Escherichia coli*, en réponse à la Mitomycine C et aux radiations UV (Kenyon and Walker, 1980) et en 1990 en réponse aux radiations ionisantes (Woloschak et al., 1990). Depuis, de nombreuses publications ont vu le jour, concernant les modifications d'expressions géniques induites par des radiations de différentes natures sur des cellules de mammifères.

Les approches “-omiques” récemment développées pour permettre l'analyse globale du niveau d'expression des gènes en réponse à un stimulus, se révèlent être des outils prometteurs, pour progresser dans la compréhension des effets moléculaires des rayonnements ionisants. La majorité des études se sont concentrées sur l'étude des modifications du transcriptome à des doses relativement élevées. Toutes ces études de transcriptome mettent en évidence un ensemble de gènes communs radio-induits caractéristiques de la réponse à l'irradiation (Amundson et al., 2000), (Amundson et al., 2001), (Mori et al., 2004), (Amundson et al., 2005), (Mori et al., 2005), (Chaudhry, 2008), (Gruel et al., 2008). Ces gènes radio-induits sont pour la plupart régulés par le facteur de transcription P53 et codent pour des protéines impliquées dans l'apoptose, l'arrêt du cycle ou la réparation des dommages. La liste de ces gènes est illustrée dans le diagramme de Venn en Figure 1.6.4. Les niveaux de régulation de l'expression de ces gènes et de leurs protéines sont très divers et complexes et dépendent du type cellulaire, de la dose d'irradiation, du temps d'exposition.

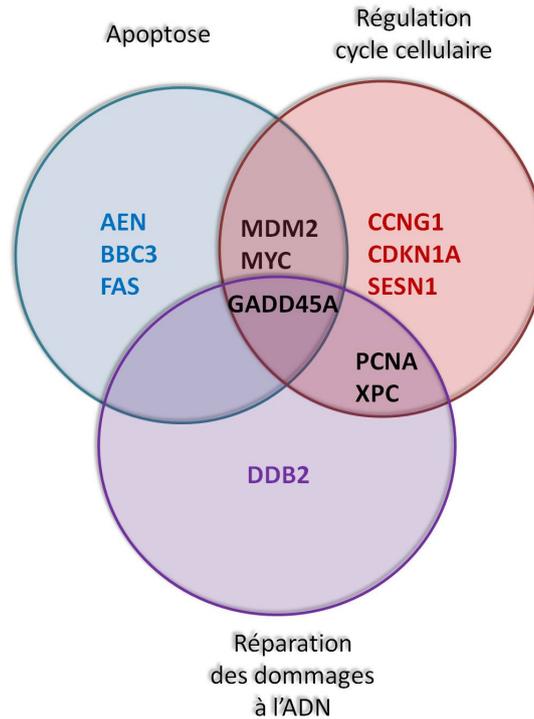


FIGURE 1.6.4: Gènes participant au contrôle de la réponse cellulaire à l'irradiation et fréquemment décrits dans la littérature.

Quand ce projet de thèse a débuté, en 2009, quelques études démontrant des altérations de l'expression génique, suite à une exposition cellulaire aux faibles doses étaient disponibles sans toutefois en élucider les origines et les conséquences de ces modulations (Amundson et al., 1999a), (Amundson et al., 2003), (Coleman et al., 2005), (Franco et al., 2005), (Fujimori et al., 2005), (Gruel et al., 2008), (Sokolov et al., 2006), (Warters et al., 2009).

Depuis, le nombre de publication a légèrement augmenté, mettant à disposition plus d'éléments pour aider à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans la réponse aux faibles doses (Wyrobek et al., 2011), (Ray et al., 2012), (Knops et al., 2012), (Manning et al., 2013), (Tableau 1.6.1). Les fibroblastes et les cellules du sang périphérique irradiés *in vivo* ou *in vitro* représentent l'un des types cellulaires les

plus étudiés dans la réponse à l'irradiation. Toutes ces études menées aux faibles doses ont montré une altération de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme et la signalisation intercellulaire (Tableau 1.6.1).

Les études comparatives mettent en évidence une différence quantitative et qualitative entre les profils d'expression des gènes modulés à faible et fortes doses de radiations ionisantes (Ding et al., 2005), (Ray et al., 2012). Ces études semblent confirmer une réponse concernant les processus impliqués dans le métabolisme pour les faibles doses et une réponse axée sur la réparation des dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et la mort cellulaire, pour les doses fortes (Ding et al., 2005), (Ray et al., 2012).

1.6.3. Effets des radiations ionisantes sur la transcription des gènes

Référence	Modèle cellulaire	Dose	Temps	Particule	Technique
Amundson et al 1999	lignée cellulaire myéloïde humaine	2cGy 5cGy 10cGy 25cGy 50cGy	1, 2, 3 et 4 heures	Rayon gamma	Puce à ADN
Coleman et al 2005	lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine	1ère dose: 5cGy 2ème dose: 2 Gy	6h après 5cGy	Rayon gamma	Puce à ADN
Ding et al 2005	fibroblastes	2cGy 4Gy	1h, 2h, 4h et 24h	Rayon X	Puce à ADN
Franco et al 2005	kératinocytes humain	1cGy 2Gy	3h, 72h	Rayon gamma	Puce à ADN
Fujimori et al 2005	fibroblastes	1cGy	1h, 2h	Rayon X	Puce à ADN
Albanese et al 2007	Sang humain périphérique d'individu exposés (Chernobyl) (n=19)	0,18 mSv à 49 mSv	11 à 13 ans		Puce à ADN
Berglund 2008	Biopsie de peau	10cGy	24 h	Rayon X	Puce à ADN
Fachin et al 2009	Sang humain périphérique de travailleurs exposés (n=14)	0,69 mSv à 39 mSv	9,32 +/- 5,97 ans		Puce à ADN
Morandi et al 2009	Echantillons de sang de travailleurs exposés (n=28) Echantillons sanguin de travailleurs non exposés (n=28)	19 mSv +/- 38mSv		Rayon X et gamma	Puce à ADN
Warters et al 2009	kératinocytes et fibroblastes	10cGy 5 Gy	4h	Rayon gamma	Puce à ADN + PCR quantitative
Wyrobek et al 2011	Lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine	1 cGy 2,5 cGy 5 cGy 7,5 cGy			Puce à ADN
Albrecht et al 2012	tissu cutané (abdominoplastie)	0,05 Gy 5 Gy	0, 2, 8, 30 heures	Rayon X	Puce à ADN
Knops et al 2012	lymphocytes	0,02 Gy 0,1 Gy 0,5 Gy 1 Gy 2 Gy 4 Gy	24, 48h 6h, 24h et 48h	Rayon gamma	Puce à ADN
Ray et al 2012	Kératinocytes et fibroblastes	100 mGy et 1 Gy	0h, 3h, 8h et 24h	Rayon X	Puce à ADN
Manning et al 2013	Sang humain périphérique	5 mGy 10 mGy 20 mGy 50 mGy 75 mGy 100 mGy 0,5 Gy 1 Gy 2 Gy 4 Gy	2h - 24h	Rayon X	RT-PCR
Solokov et al 2013	Lignée cellulaire de fibroblaste (poumon humain)		2h 2h 24h	Rayon gamma Rayon gamma 127I-IuDR	Puce à ADN PCR quantitative en temps réel

TABLEAU 1.6.1: Les revues scientifiques abordant l'aspect modulation d'expression aux faibles doses de radiations ionisantes dans les cellules humaines.

Parallèlement à cela, des données d'expression de gènes provenant d'exposition accidentelle ou professionnelle sont disponibles notamment sur des lymphocytes provenant de prélèvements de travailleurs du nucléaire (Fachin et al., 2009), de cellules de peau de personnes irradiées (Berglund et al., 2008) ou de cellules mononuclées provenant d'individus sains exposés aux conséquences de l'accident de Tchernobyl (Albanese et al., 2007). Toutes ces études ont mis en évidence des gènes dont l'expression était modifiée potentiellement suite à une exposition *in-vivo* aux radiations ionisantes : gènes codant

pour des cytokines et des récepteurs impliqués dans les phénomènes de mort cellulaire (Albanese et al., 2007), gènes de réparation ADN et régulation du cycle cellulaire (Fachin et al., 2009) et enfin gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Berghlund et al., 2008).

1.6.3.1 Les facteurs de transcription activés en réponse aux radiations ionisantes

Toutes les modifications d'expression génique répertoriées à ce jour, sont susceptibles d'être causées par l'activateur de régulateurs de transcription comme les facteurs de transcription. Nous avons vu lors des précédents chapitres que l'activation des facteurs de transcription pouvait être à l'origine des modifications du transcriptome (Criswell et al., 2003), (Mori and Desaintes, 2004) et contribuait aux processus de réponse cellulaire comme la réparation des dommages ou l'arrêt du cycle cellulaire. Divers facteurs de transcription ont été identifiés comme activés suite à une exposition cellulaire aux rayonnements ionisants de cellules normales ou tumorales (Criswell et al., 2003). Ces différents facteurs sont présentés dans le Tableau 1.6.2.

Facteurs de transcription	Types cellulaires utilisés	Gamme de doses (Gy)	Cinétique d'induction (h)	Références
p53	Cellules de différents cancers lymphocytiques et épithéliaux	0.2–20	2–4	(Lu and Lane, 1993) (Zhan et al., 1993)
NF-kB (p65/p50)	Cellules de différents cancers lymphocytiques et épithéliaux	0.5–20	0.5–4	(Brach et al., 1991) (Brach et al., 1993)
SP1	Cellules de mélanomes et carcinome (tête et cou)	0.1–10	2–10	(Sahjidak et al., 1994) (Yang et al., 2000)
EGR-1	Cellules normales et cellules de cancers lymphocytiques et épithéliaux	4–20	0.3–4	(Datta et al., 1993) (Venkatasubbarao, 1996)
AP-1	Kératinocytes et cellules de cancers lymphocytiques et épithéliaux	2–20	1–5	(Hallahan et al., 1993) (Sahjidak et al., 1994)
Oct-1/ NF-Y	Cellules de mélanomes et carcinome (tête et cou) et cellules de cancers lymphocytiques et épithéliaux	5–20	4–8	(Meighan-Mantha et al., 1999)
Gata-3	Kératinocytes	0.01 Gy	3–72	(Bonin et al., 2009)

TABLEAU 1.6.2: **Facteurs de transcription activés en réponse aux radiations ionisante.** De nombreuses études ont pu mettre en évidence l'activation de facteurs de transcriptions, dans différentes conditions expérimentales en réponse aux radiations ionisantes (adapté de (Criswell et al., 2003) et mis à jour).

Activation du facteur de transcription P53. La protéine p53 est produite à de faibles niveaux dans les cellules non stressées (Prives and Hall, 1999), mais se retrouve rapidement stabilisée par différents types de stress cellulaires (Lu and Lane, 1993). La phosphorylation par ATM de MDM2 est susceptible d'être une étape clé dans la stabilisation de P53 (Ashcroft and Vousden, 1999), (Cheng and Chen, 2010). En réponse à une exposition de cellules de mammifères aux radiations ionisantes, l'activation du facteur de transcription P53 a été décrite (Enoch and Norbury, 1995), (Suzuki et al., 2001) et les principales études décrivent son activation pour des doses allant de 0.1 à 20 Gy (Zhan et al., 1993), (Suzuki et al., 2001). Activée dans le noyau cette protéine se lie sous une forme tétramérique à un élément de réponse présent sur les promoteurs de gènes cibles au niveau d'un enhancer ou d'un promoteur proximal. Le nombre de gènes poten-

tiellement transactivés par P53 est évalué à environ 400 (El-Deiry, 1998), (Qian et al., 2002). Les protéines codées par les gènes cibles de P53 sont impliquées pour la plupart dans la réparation de l'ADN (PCNA, DDB2 et XPC), la progression du cycle cellulaire (CDKN1A, GADD45a) et l'apoptose (BAX, BBC3, TFNRSF10b) (Amundson et al., 2000, 2001), (Beckerman and Prives, 2010). Le facteur de transcription P53 possède d'autres cibles, Jen et Cheung présentent de nouvelles cibles moléculaires du facteur de transcription P53 en réponse aux radiations ionisantes (Jen and Cheung, 2005). L'implication du facteur de transcription P53 aux faibles doses reste à élucider, il semblerait d'après une étude que l'activation du facteur P53 ne soit plus détectable par Western Blot en dessous de 100 mGy (Suzuki et al., 2001).

Activation du facteur de transcription NF- κ B . NF- κ B est un facteur de transcription qui existe sous sa forme latente en association avec sa protéine inhibitrice I κ B. De nombreuses voies de signalisation sont connues pour causer la dégradation de cette protéine inhibitrice entraînant le relargage de la forme libre de NF- κ B. La forme active de NF- κ B peut ainsi migrer dans le noyau et réguler au niveau de la transcription l'expression des gènes cibles. Les gènes cibles de NF- κ B sont connus pour jouer un rôle dans divers processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération, l'adhésion cellulaire, la migration, les processus inflammatoires et la réponse immunitaire adaptative. NF- κ B est l'un des facteurs de transcription activés en réponse aux UV et radiations ionisantes (Brach et al., 1991), (Brach et al., 1993). La dose minimale de radiations ionisantes nécessaire à l'activation de NF- κ B varie d'un type cellulaire à l'autre. Dans la lignée cellulaire de lymphoblastes humains, la dose 0.5 Gy est suffisante pour entraîner l'activation du facteur de transcription alors qu'une dose de 20 Gy dans les fibroblastes humains diploïdes n'est pas suffisante.

La fixation du **complexe de transcription AP-1** sur les promoteurs des gènes cibles est induite par des dommages à l'ADN . Jun et Fos sont les composants de ce complexe protéique. L'activation d'AP1 a été reportée pour des doses fortes comprises

entre 2 et 20 Gy (Hallahan et al., 1993), (Sahijdak et al., 1994).

Le gène EGR1 et le **facteur de transcription EGR1** sont activés en réponse aux radiations ionisantes. L'activation du facteur de transcription EGR1 a été mise en évidence dans des cellules de mélanome humaine à 5 et 20 Gy dès 30 minutes post-irradiation (Venkatasubbarao, 1996). Une autre étude a mis en évidence l'activation du promoteur EGR1 en réponse à une dose de 4 Gy de radiation ionisantes dans des cellules de gliome (Meyer et al., 2002). Il a été également observé une modulation de l'expression du gène EGR1 par divers équipes (Hallahan et al., 1991), (Datta et al., 1992), (Datta et al., 1993). Ainsi Datta *et al* ont mesuré une induction du gène EGR1 en réponse à une exposition à 20 Gy de rayonnements ionisants de cellules humaines normales et cancéreuses (Datta et al., 1993). D'après Criswell *et al*, la dose minimale de rayonnement ionisant nécessaire pour cette induction semble être de 4 Gy (Criswell et al., 2003).

Des études ont démontré l'activation **du facteur de transcription POU2F1 (Oct-1)** en réponse à des dommages à l'ADN. L'augmentation de l'expression du niveau de la protéine POU2F1 quelques heures après l'irradiation a été observée. Cependant, les gènes cibles de cette activation dépendante des rayonnements ionisants ne sont pas caractérisés. Le facteur POU2F1 est stabilisé et son activité est modifiée par la protéine DNA-PK en réponse aux cassures doubles brin (Schild-Poulter et al., 2007).

Le **facteur de transcription NFY** se fixe sur un élément de réponse CCAAT situé sur le promoteur de gènes cibles. NFY a été décrit comme activé en réponse à l'irradiation de cellules endothéliales (Bertagna and Jahroudi, 2001).

Quelques études ont montré une augmentation de l'activité du **facteur de transcription SP1** en réponse à des doses d'irradiation comprises entre 0.1 et 10 Gy. Le facteur SP1 est un facteur de transcription ubiquitaire exprimé dans les cellules de mammifères et ayant une forte affinité pour les séquences riches en GC. Il régule des gènes dont les

protéines semblent impliquées dans divers processus cellulaires, y compris la régulation du cycle cellulaire, le modelage de la chromatine.

Le facteur de transcription GATA3 fait partie de la famille des facteurs de transcription GATA. Ce facteur joue un rôle crucial dans le développement des lymphocytes T mais également dans les processus biologiques des cellules endothéliales. Une étude récente a mis en évidence un enrichissement en séquences consensus GATA correspondant aux sites de liaison GATA1 et GATA3 par analyse bioinformatique des séquences promotrices spécifiques de gènes modulés en réponse à de faibles doses de radiations ionisantes (Bonin et al., 2009). L'activation du facteur de transcription GATA-3 a été confirmée par des expérimentations *in-vitro*. C'est la première fois qu'un facteur de transcription est décrit en état d'activation en réponse à de très faibles doses (10 mGy) de radiations ionisantes (Bonin et al., 2009).

Deuxième partie

Matériel et méthode

« Attendre d'en savoir assez
pour agir en toute lumière, c'est
se condamner à l'inaction. »"

*(Citations de Jean
Rostand, Inquiétudes d'un
biologiste, 1967)*

CHAPITRE 2.1

TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

2.1.1 Collecte des échantillons biologiques et irradiation *ex-vivo*

Les échantillons de sang périphériques ont été prélevés sur cinq volontaires de sexe masculin. Cette collecte de sang a été effectuée par l'établissement Français du Sang (EFS), conformément à la loi française n°2004-800 concernant la bioéthique. Une numération de la formule sanguine a été effectuée sur chaque échantillon de sang avec un système hématologie ADVIA (Bayer HealthCare).

Un anticoagulant, l'héparine, a été ajouté à une concentration de 34 unités par millilitre de sang. Pour l'adaptation des cellules, les échantillons sanguins ont été dilués au 1 :10 dans milieu nutritif IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), puis incubés pendant une nuit dans un incubateur à 37° en atmosphère humide et 5% de CO₂. Les échantillons de sang sont ensuite exposés *ex-vivo* à une source de Cobalt-60 émettant des rayonnements gamma à un débit dose 0.05 Gy.min⁻¹. Les irradiations ont été effectuées à l'irradiateur ICO4000 situé à l'IRSN de Fontenay aux Roses. Les doses auxquelles ont été exposées les cellules sont 5, 10, 25, 50, 100 et 500 mGy. Ensuite, les échantillons irradiés ainsi que ceux de la condition contrôle (0 mGy) sont incubés à 37 degrés pendant 150, 300, 450 et 600 minutes dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

2.1.2 Purification lymphocytaire

Le RosetteSep™ CD4⁺ (Stem Cells Technologies) permet d'isoler les cellules T CD4⁺ par sélection négative. Les lymphocytes T CD4⁺ sont purifiés conformément aux instructions du fabricant (Stem Cells Technologies). La sélection négative repose sur l'utilisation d'un complexe d'anticorps tétramérique spécifique des lymphocytes T CD8⁺, des cellules "natural killer", des lymphocytes B et des érythrocytes. Le complexe d'anticorps est ajouté au sang total à une concentration de 50 µl/ml de sang. Le mélange est ensuite incubé à température ambiante pendant 20 minutes. Durant cette incubation les anticorps se fixent aux cellules indésirables qui vont se fixer aux globules rouges formant un complexe appelé *immunorosette*. Après centrifugation en gradient de densité (1.077g.l⁻¹ Ficoll-paque PLUS), pendant 20 minutes à 1200×g, les cellules T CD4⁺ purifiées sont présentes sous forme d'une population fortement enrichie à l'interface entre le plasma et le milieu de densité de flottaison. L'anneau contenant les lymphocytes T CD4⁺ est collecté (Figure 2.1.1).

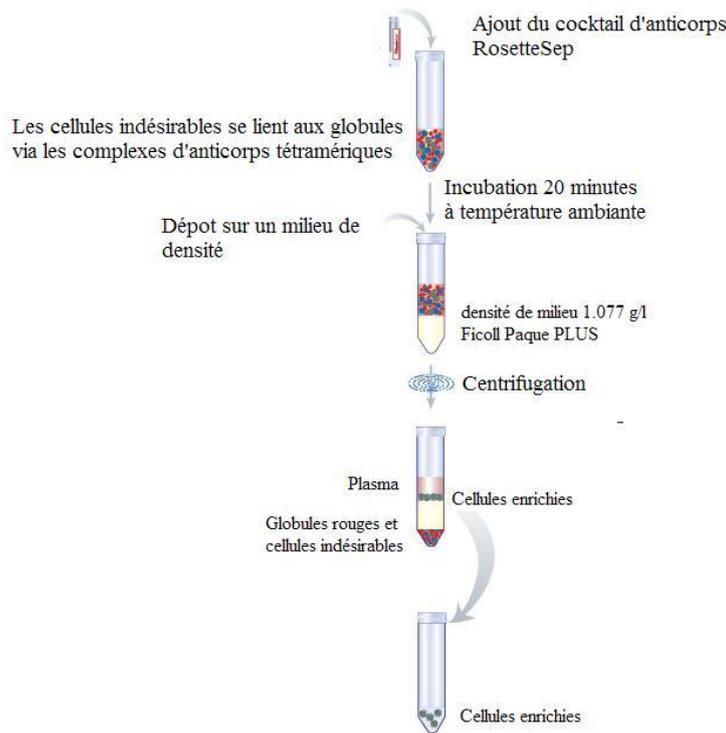


FIGURE 2.1.1: Procédure pour la sélection négative des lymphocytes T CD4⁺

Cette sélection négative a pour avantage de permettre une récupération de lymphocytes T CD4⁺ exemptés de tout contact avec d'éventuels anticorps. La vérification des taux d'enrichissement en lymphocytes T CD4⁺ est réalisée par cytométrie en flux (cytomètre FACSsort Becton Dickinson). Un triple marquage anti-CD4-R-Phycoerythrin (R-PE), anti-CD3-Tricolor (Trico) et anti-CD8-Fluorescein (FITC) est réalisé à partir d'un aliquot de chaque échantillon de cellules triées.

2.1.3 Extraction des ARN

L'extraction des ARN cellulaires est réalisée par la méthode Phénol (Qiazol)/Chloroforme combinée à une purification sur colonne d'affinité (Kit miRNeasy Qiagen). L'extraction des ARN totaux provenant des lymphocytes T CD4⁺ est réalisée en suivant les instructions du fabricant. Les ARN extraits sont élués dans de l'eau sans RNAses.

La concentration d'ARN est estimée par dosage spectrophotométrique Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies). La valeur de la densité optique à 260 nm permet le dosage des acides nucléiques et celle à 280 nm celui des protéines présentes dans l'échantillon analysé. Il est admis que le rapport de la DO 260/280, pour une extraction d'acide nucléique d'une bonne qualité doit être supérieur à 1.8, pour des ARN en suspension dans l'eau. Une mesure de la Densité Optique à 230 nm est également réalisée pour détecter une éventuelle trace d'isothiocyanate de guanidium, un inhibiteur d'enzymes. Un contrôle qualitatif des ARN totaux est réalisé par migration électrophorétique des échantillons d'ARN extraits sur des puces RNA nano LabChip (LabTech) avec le Bio-Analyser 2100 (Agilent Technologies).

La valeur numérique du RIN (RNA Integrity Number) calculé à partir du profil électrophorétique de chaque échantillon permet d'estimer le taux d'ARNm dégradé. Un échantillon d'ARN est considéré comme de bonne qualité lorsque son RIN est supérieur à 7. Les ARN totaux présentant des concentrations optimales et des scores de RIN optimaux sont conservés à -80°C et utilisés pour la suite des expérimentations.

CHAPITRE 2.2

ANALYSE SUR PUCE À OLIGONUCLÉOTIDES

Une des sources de biais expérimental important liée aux biopuces concerne “l’effet de lot”. Ainsi, un ensemble d’échantillons ayant été traité dans une même session d’hybridation par exemple, peuvent présenter des similitudes de signaux. Cet effet peut entraîner des biais dans l’interprétation des données si les échantillons d’une même condition sont traités dans un même lot. La méthodologie utilisée pour s’en affranchir a été le tirage aléatoire à chaque étape du protocole (amplification, marquage, hybridation) des échantillons traités simultanément.

2.2.1 Amplification et marquage des ARN

Des ARN exogènes appelés “ARN spikes “ sont ajoutés à des concentrations connues dans chaque échantillon. Il s’agit d’une série d’ARN synthétiques n’ayant aucune similarité de séquence avec le génome humain. La présence sur les puces de spots de sondes correspondant à ces spikes permettent l’analyse de leurs signaux d’intensité d’hybridation respectifs, mis en relation avec leur concentration de départ. Chaque “spike-in” est déposé 10 fois sur chaque puce. Ces dépôts multiples ont pour objectif de contrôler la qualité des hybridations.

Une amplification linéaire des ARNm a été réalisée selon le protocole “Low Input Quick Amp Labelling” (Agilent Biotechnologies). La Figure 2.2.1 illustre la procédure d’amplification et de marquage.

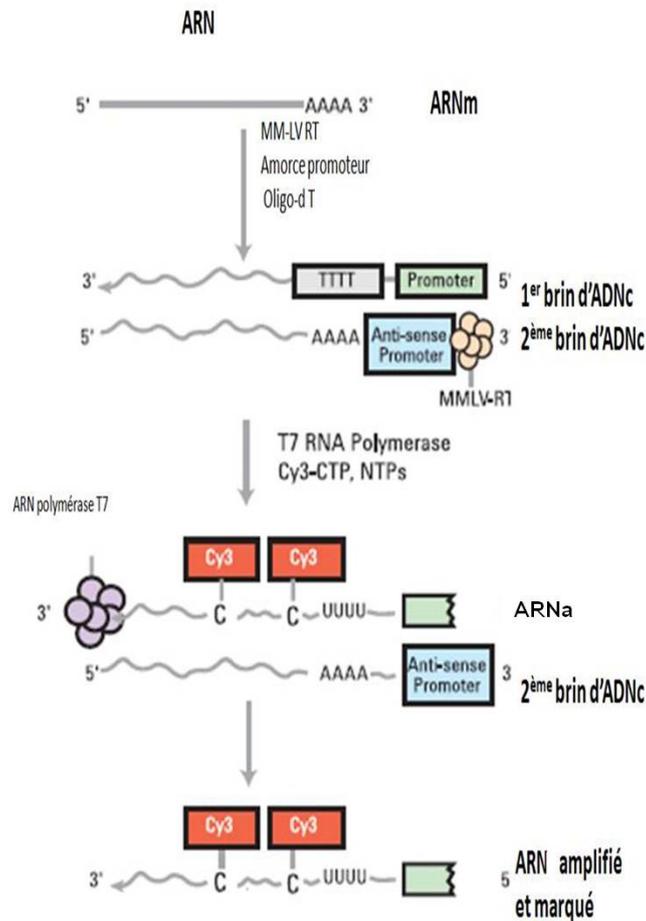


FIGURE 2.2.1: Procédure d’amplification et de marquage des ARN messagers.

L’amplification se déroule en deux étapes. La première étape est la production d’ADN complémentaires en réalisant une transcription inverse (RT) utilisant des amorces spécifiques des ARNm (oligo-dT) et en y incorporant un site promoteur pour une T7 ARN polymérase. Le premier brin d’ADN est alors utilisé comme matrice pour synthétiser le second brin. La deuxième étape est une transcription *in-vitro* à partir de la matrice double brin. Elle permet la néo-synthèse d’ARN complémentaire (ARNa) par l’ARN

polymérase du phage T7. L'utilisation du fluorochrome cyanine 3 associée à la cytosine (Cya3-CTP) permet le marquage des ARNa lors de l'étape d'amplification.

2.2.2 Purification des ARN amplifiés

La purification des ARN amplifiés et marqués à la cyanine 3 (ARNa-Cy3) est réalisée sur mini colonnes QIAGEN RNeasy mini spin columns, selon les instructions du fabricant (QIAGEN). Les ARNa purifiés sont élués dans de l'eau sans RNase. La concentration des ARNa et l'incorporation de la cyanine 3 est déterminée par spectrophotométrie (NanoDrop ND-1000). Le calcul de l'activité spécifique en cyanine 3 permet de quantifier l'incorporation de la cyanine 3 dans les ARNa grâce à la mesure de l'absorbance de l'échantillon à 550 nm. L'efficacité du marquage est vérifiée en se référant à la valeur minimale de 9 pmol de cyanine 3/ μ g d'ARN donnée par le fabricant. La qualité est contrôlée par migration électrophorétique des échantillons des ARN extraits sur des puces RNA nano LabChip (Agilent Technologies) avec le Bio-Analyser 2100 (Agilent Technologies).

2.2.3 Hybridation des échantillons

L'hybridation des ARNa-cy3 sur les sondes oligonucléotides de la puce est réalisée par rotation mécanique à 60 °C pendant 17 heures, conformément aux instructions du fabricant (Agilent Technologies). Une quantité de 1.65 μ g d' ARNa-cya3 est nécessaire pour l'étape d'hybridation. Chaque puce pangénomique est composée de 44000 dépôts d'oligonucléotides de 60 mers visant à mesurer l'expression de 27,958 ARNm représentatifs du génome humain. Un lavage des lames est réalisé après l'hybridation.

2.2.4 Visualisation des images et extraction des signaux de fluorescence

Les images de fluorescences sont obtenues à l'aide d'un scanner de fluorescence (Agilent G2565CA) à haute résolution (5 μ m). Ce scanner est muni d'un laser excitant la cyanine 3 à 532 nm, et d'un microscope confocal couplé à un photomultiplicateur permettant de capter les photons émis par le fluorochrome. La Figure 2.2.2 illustre une puce à oligonucléotide hybridée. Une visualisation directe de première intention de l'image d'hybridation est réalisée et peut permettre le repérage d'éventuelles traces de poussières entrainant l'exploitation difficile de la puce. La figure 2.2.2 représente une hybridation optimale de puce. Chaque zone hybridée (spot) correspond à l'hybridation d'un ARNa en particulier avec des coordonnées précises (ligne, colonne).

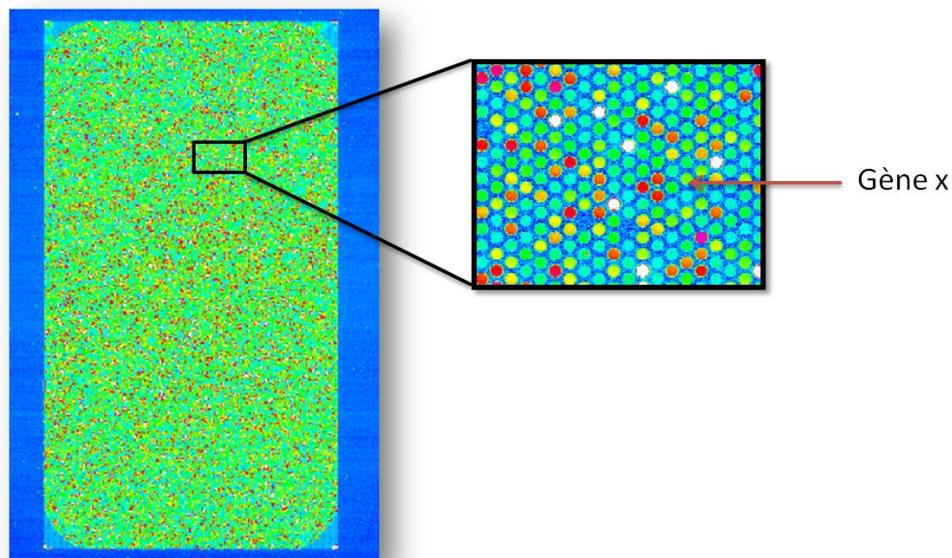


FIGURE 2.2.2: Visualisation des images en log-intensité des lames hybridées en fausses couleurs.

Le logiciel Feature extraction (Agilent Technologies) est utilisé pour extraire les intensités de chaque spot, à partir des images issues de la lecture des puces hybridées. Pour cela, le logiciel fait correspondre une grille de dépôt théorique avec l'image. Cela permet d'établir une correspondance entre la position du spot, les informations concernant l'oligonucléotide correspondant ainsi que les mesures liées à la fluorescence résultante de l'hybridation. Feature extraction procède à l'annotation des signaux d'hybridations en fonction de leur significativité comparée au bruit de fond de leur homogénéité et de leur saturation. L'ensemble des données brutes d'intensités extrait de chaque hybridation est regroupé dans un fichier de résultat généré par le logiciel Feature Extraction, accompagné d'un rapport concernant les contrôles qualités internes à chaque hybridation.

2.2.5 Soumission dans la base de donnée GEO (Gene Expression Omnibus)

La banque de donnée GEO (Gene Expression Omnibus) a été initiée dans les années 2000. Cette base de données publiques est hébergée par le site NCBI¹ et est dédiée à la mise en ligne des données issues des expériences de transcriptome faisant l'objet d'articles publiés (Edgar et al., 2002). Les données d'expériences à haut débit sont soumises puis référencées en décrivant la source biologique de l'expérience, le protocole expérimental suivi ainsi que les résultats des données d'expression. En janvier 2013, la base de données GEO contenait 11 017 plateformes différentes ainsi que 35 629 séries d'expérience regroupant un total de 871 434 expériences. Les données d'expression de cette thèse ont été soumises avec le numéro d'accession GSE43151².

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

2. données mis à disponibilité en 2013

CHAPITRE 2.3

ANALYSE DES DONNÉES D'EXPRESSION

2.3.1 Présentation du langage R

Les technologies à haut débit ont la particularité de générer un volume de données important. L'analyse de ces données complexes nécessite un ensemble de méthodologies adaptées pour en extraire l'information biologique répondant aux questions posées. L'exploitation des données d'expression a été réalisée à l'aide du langage de programmation R¹. Logiciel libre depuis 1995, R est un environnement de calcul statistique et de gestion graphique.

Ce logiciel permet l'exécution de commandes sous forme de programmes (scripts). Cette fonctionnalité permet aux développeurs de créer des bibliothèques additionnelles de fonctions. Les bibliothèques peuvent être utilisées et téléchargées sous forme de "packages". L'ensemble des "packages" utilisés dans le cadre de l'analyse de puces est téléchargé sur la suite Bioconductor²(Gentleman et al., 2004). Le "package" *Agi4x44PreProcess* contient un ensemble de fonctions dédiées à l'analyse des données issues des biopuces de société Agilent. Dans cette étude le "package" d'annotation utilisé a été "hgug4112a.db".

1. <http://www.r-project.org/>. R a été installé en version 2.13

2. http://www.bioconductor.org/packages/release/BiocViews.html#___Software

Le script utilisé pour exploiter les données est présenté en annexe A.

2.3.2 Normalisation des données

La normalisation est une étape primordiale lors de l'analyse des données de puces. Elle va permettre de se prémunir des biais expérimentaux susceptibles de générer des différences dans la distribution des intensités mesurées entre les puces. Par conséquent, ces biais pourraient en absence de normalisation avoir un impact sur l'interprétation du signal biologique étudié. Une normalisation inter-puce par quantile a été réalisée. La normalisation par la méthode des quantiles est un standard pour normaliser entre elles les puces issues d'une hybridation mono-couleur (Bolstad, 2001). Chaque quantile de la distribution des intensités de fluorescence de chaque puce est normalisé par rapport à la distribution des intensités moyennes calculées sur l'ensemble des puces (Figure 2.3.1).

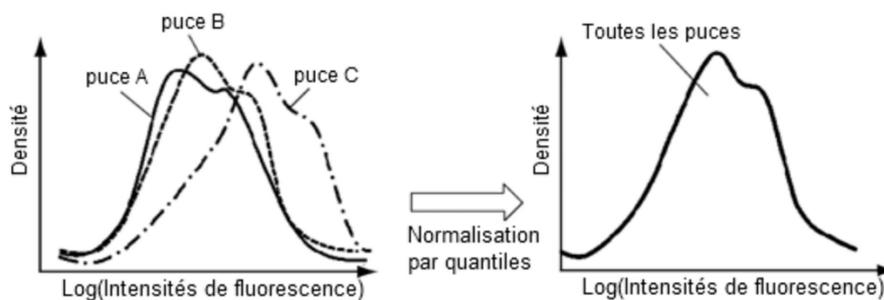


FIGURE 2.3.1: Effet de la normalisation par quantiles sur les distributions des intensités de fluorescence.

2.3.3 Filtrage

Ensuite une étape de filtrage est réalisée sur les données normalisées à l'aide du langage de programmation R (Team, 2009). L'étape de filtrage a pour objectif l'élimination des spots contrôles et les spots non conformes qui seraient trop proches du bruit de fond

ou ayant une fluorescence non uniforme sur la base des annotations réalisées par Feature Extraction. Dans cette étude, nous avons choisi d'éliminer de l'analyse les spots non détectés dans 75% des réplicats. Finalement, un total de 16 696 sondes a été sélectionné après l'étape de filtrage.

Un coefficient de variation (CV) correspondant au rapport de l'écart-type σ sur la moyenne du signal mesuré (intensité de fluorescence), est calculé pour 999 sondes répliquées 9 fois (Equation 2.3.1), il est exprimé en pourcentage :

$$CV_{s,p} = \frac{\sqrt{\sum^r \frac{(I_{s,p,r} - \bar{I}_{s,p})^2}{9}}}{\bar{I}_{s,p}} \quad (2.3.1)$$

s : numéro de la sonde répliquée de 1 à 999 pour la puce *p*

p : numéro de la puce de 1 à 121

r : numéro de réplicat de 1 à 9 pour la sonde *s* de la puce *p*

I : intensité d'hybridation

\bar{I} : intensité moyenne calculée sur les 9 réplicats de la sonde *s* de la puce *p*

2.3.4 Analyse de l'expression différentielle des gènes

Le but de cette analyse de l'expression différentielle des gènes est de déterminer les gènes différentiellement exprimés entre une condition irradiée et non irradiée. Deux paramètres sont associés à chaque sonde hybridée la valeur des ratio d'intensité³ (voir équation 2.3.2) et la P.valeur donnant la significativité statistique. En pratique, l'analyse de l'expression différentielle des gènes se déroule en quatre étapes principales :

- **Étape 1** : le calcul du log ratio $D_{S, C_i, T}$ (équation 2.3.2) pour chaque sonde, chaque

3. souvent sous forme logarithmique, dite « log-ratio », représentant le différentiel d'expression

dose et chaque temps est effectué, afin d'évaluer le niveau de modulation :

$$D_{S,C_i,T} = \text{Log}_2\left(\frac{\sum_{j=1}^l I_{j,S,C_i,T}}{l}\right) - \text{Log}_2\left(\frac{\sum_{m=1}^k I_{m,S,C_o,T}}{k}\right) \quad (2.3.2)$$

S : numéro de la sonde de 1 à 16696

C_i : condition irradiée : 5 mGy à 500 mGy

C_o : condition non irradiée : 0 mGy

T : temps post irradiation : 150 à 600 minutes

l : nombre de réplicats pour la condition irradiée *C_i* et le temps *T*

k : nombre de réplicats pour la condition non irradiée *C_o* et le temps *T*.

I : intensité d'hybridation pour le réplicat de 1 à *l* ou 1 à *k* de la condition *C_i* ou *C_o* respectivement et du temps *T*.

- **Étape 2** : une statistique *t* modérée pour analyser la significativité de la modulation comme avec hypothèse $H_0 : D_{S,C_i,T} = 0$
- **Étape 3** : une correction de la *P.valeur* est appliquée en raison de la problématique des tests multiples.

Dans notre étude, le package *limma* a été utilisé pour calculer ces différentiels d'expression d'intérêts pour chaque gène analysé à partir d'une matrice de contraste et évaluer la significativité statistique des modulations d'expression (Smyth, 2005, 2004).

2.3.4.1 Problématique des tests multiples

Une seule puce teste des dizaines de milliers de transcrits simultanément. Ainsi, autant de tests statistiques doivent être réalisés pour déterminer la significativité des modulations observées. Cette situation de test multiple induit mécaniquement un risque plus élevé de *faux positifs* lors de l'utilisation de seuil sur la *P.valeur* classique.

Les *faux positifs* correspondent aux gènes considérés à tort comme étant différentiellement exprimés. Par exemple, si l'on tolère 5 % d'erreur (P.valeur < 0.05) dans l'évaluation statistique de 10 000 hypothèses. $H_0 : \text{Log Intensité I} - \text{Log Intensité NI} = 0$. On aura mécaniquement un risque de conclure à une modulation significative pour 500 tests (5% de 10 000 tests) uniquement en raison du taux d'erreur toléré. Pour ce prémunir de ce risque de faux positifs, la combinaison de deux méthodes ont été utilisées dans ce travail.

2.3.4.1.1 Correction de la *P.valeur*

La mesure de risque la plus couramment utilisée en Biologie dans la problématique des tests multiples est le False Discovery Rate (FDR). La correction utilisée dans ce travail est celle de Benjamini & Hochber (BH) ([Benjamini, Y. and Hochber, 1995](#)). Le FDR permet l'estimation du taux de faux positifs parmi les hypothèses rejetées. Dans ce cas, la P.valeur corrigée ne correspond plus au taux d'erreur tolérée sur l'ensemble des tests effectués mais au taux de faux positifs tolérés parmi les gènes sélectionnés comme différentiellement exprimés. Ainsi, contrôler le FDR revient à contrôler le nombre de faux positifs.

2.3.4.1.2 Filtre sur l'amplitude de la modulation

On procède à la fixation d'un seuil minimum arbitraire, à partir duquel le gène est considéré comme différentiellement exprimé entre la condition irradiée et non irradiée. La valeur du seuil arbitraire dans cette étude a été fixée à une variation d'au moins 1.5 fois entre les deux conditions ($|\log ratio| \geq 0.585$). Ce seuil signifie qu'un gène donné doit avoir une amplitude de variation d'au moins 1.5 fois pour être considéré comme différentiellement modulé.

2.3.5 corrélation de Spearman

Les coefficients de corrélation de Spearman ont été utilisés comme mesure de la similarité des données entre les conditions expérimentales. Ce coefficient permet de mettre en évidence une similarité de « forme » entre deux profils d'expression, sans pour autant tenir compte des différences d'amplitude. Le calcul des scores de corrélation a été réalisé sous R.

2.3.6 Regroupement de profils similaires

La méthode de classification hiérarchique ont été utilisées dans ce travail pour identifier les gènes présentant un profil d'expression similaire. Cette approche consiste à prendre en compte l'ensemble des gènes de manière à les séparer en groupes distincts en fonction de la similarité de leur profil sans que la connaissance de classes existantes ne vienne interférer dans le résultat.

Dans ce rapport, toutes les classifications hiérarchiques ont été réalisés avec la méthode des distances euclidiennes à l'aide du “package” *gplot*. Elle consiste à mesurer la distance entre deux gènes $X = (x_1, x_2, x_3 \dots x_n)$ et $Y = (y_1, y_2, y_3 \dots y_n)$ dans un espace à n dimension (correspondant au nombre de conditions). La formule peut s'écrire ainsi :

$$d = \sqrt{\sum_{j=1}^n (x_j - y_j)^2}$$

Dans cette méthode de classification, chaque profil commence dans son propre “cluster” ou groupe. Une matrice de distance euclidienne est alors calculée entre tous ces “clusters” initiaux. Les deux “clusters” présentant la plus faible distance sont alors fusionnés. La matrice de distance est alors mis à jour en prenant en compte cette fusion par la méthode de regroupement du “voisin le plus éloigné” (complete linkage). Cette procédure est recommencée de manière itérative jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un unique “cluster” résultat de la fusion de tous les profils (Saei and Omid, 2011). La Figure 2.3.2 illustre

schématiquement une classification hiérarchique basée sur les distances euclidiennes.

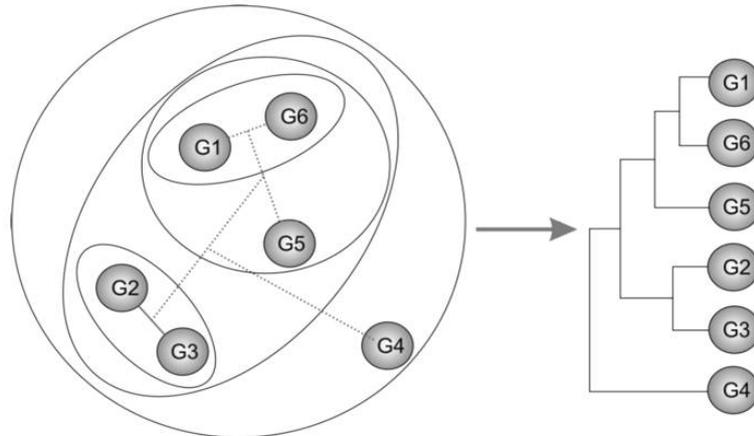


FIGURE 2.3.2: Schéma d'une classification hiérarchique basée sur les distances euclidienne (Saei and Omid, 2011).

Le résultat de cette classification peut se visualiser graphiquement. A travers la combinaison d'un dendrogramme codant la distance calculée entre les profils et leur hiérarchisation et d'une représentation "carte thermique" codant les niveaux de modulations constituant chaque profil et éventuellement la significativité statistique correspondante (Eisen et al., 1998). La fonction *heatmap2* du "package" *gplot* a permis de réaliser les représentations graphiques en carte thermique, associées à la classification hiérarchique des données.

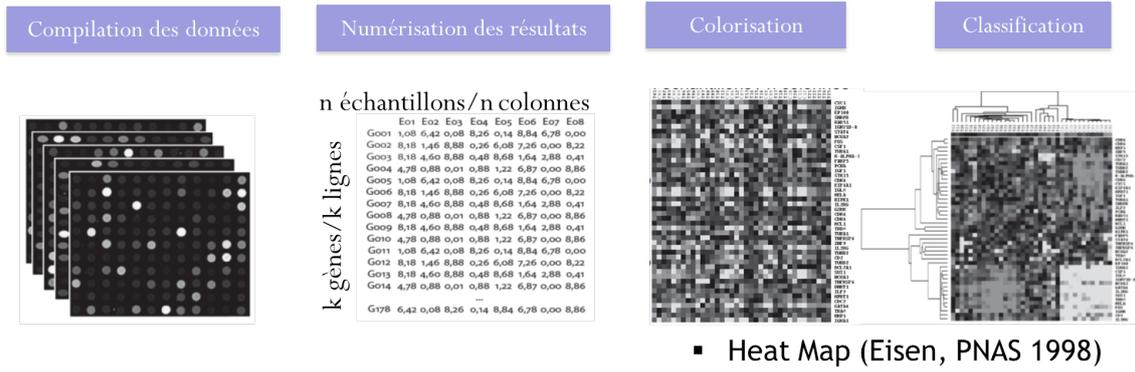


FIGURE 2.3.3: Principe de la classification hiérarchique. La classification hiérarchique peut être associée à une colorisation des valeurs d'expression issues des données brutes d'intensité.

CHAPITRE 2.4

INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE DES DONNÉES DE PUCE À OLIGONUCLÉOTIDE

L'une des plus grandes difficultés de l'analyse des données de modification du transcriptome est d'exploiter convenablement les listes de gènes candidats. Le plus souvent ces listes de gènes sont assez conséquentes. Diverses bases de données et logiciels d'analyse de liste de gènes ont été développés ces dernières années afin d'identifier les fonctions biologiques et autres annotations plus ou moins spécifiques de la liste soumise. Ces annotations des données aident pour formuler des hypothèses ou faire une interprétation biologique des résultats.

2.4.1 Bases de données permettant d'annoter les gènes

2.4.1.1 La base de données KEGG

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)¹ est une base de donnée qui informatise les connaissances en génétique, biochimie, biologie moléculaire et cellulaire en les organisant en voie biochimique et voie d'interaction moléculaire (Ogata et al., 1999). Dans notre étude nous avons utilisé le composant principal de KEGG qui est la base

1. <http://www.genome.jp/kegg/>

de donnée “*Pathway*” qui rassemble la plupart des voies métaboliques connues à ce jour. Les voies métaboliques sont proposées sous forme d’image annotée. La liste complète des voies cataloguées par KEGG est disponible en ligne.

2.4.2 Outils analytiques analysant les annotations

2.4.2.1 Logiciel web ToppGene

La Suite ToppGene² est un portail en ligne pour l’étude fonctionnelle de liste de gènes d’intérêt, la hiérarchisation de gènes candidats en utilisant soit des annotations fonctionnelles ou l’analyse de réseau, ou les deux, mais aussi d’identification et la priorisation de nouveaux gènes candidats de maladie (Chen et al., 2009) (Figure 2.4.1). Le site internet de la suite ToppGene, est gratuit et ouvert à tous les utilisateurs. Dans cette étude nous avons principalement utilisé ToppFun pour l’annotation fonctionnelle des listes de gènes, les calculs d’enrichissement de séquences consensus dans les promoteurs et d’enrichissement des motifs de liaison des microARN.

La distribution hypergéométrique est utilisée pour déterminer si oui ou non une annotation fonctionnelle, une séquence consensus de régulateurs d’expression est sur-représentée dans une liste d’intérêt. Une distribution hypergéométrique fait référence aux probabilités associées avec le nombre de succès dans une expérience hypergéométrique. Une expérience hypergéométrique présente les caractéristiques suivantes : M éléments sont des succès dans une taille de population N .

A titre d’exemple, prenons une liste composée de 10 gènes et supposons que 5 gènes annotés sur les 10 sont des succès pour une fonction. A présent, si on choisit par tirage aléatoire un sous-ensemble de 10 gènes dans l’ensemble du génome, quelle sera la probabilité d’obtenir le même succès ? Une fois cette probabilité déterminée, l’objectif est de

2. (<http://toppgene.cchmc.org/>)

savoir si ces deux probabilités sont significativement différentes. Le test de distribution hypergéométrique est utilisé comme méthode standard pour déterminer la significativité statistique (P valeur) de l'enrichissement d'une annotation dans notre liste de gène.

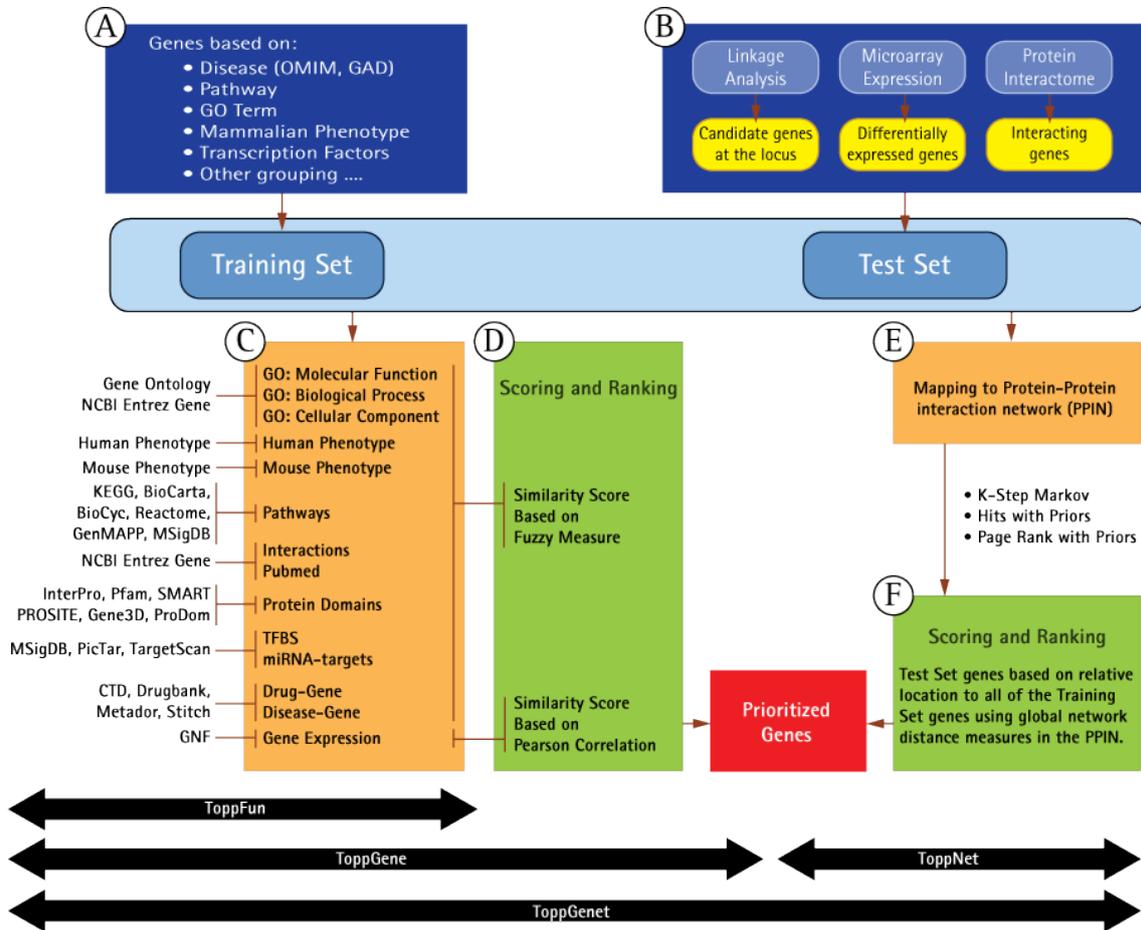


FIGURE 2.4.1: Représentation schématique de la méthodologie de travail des différentes applications de la suite ToppGene.

Troisième partie

Résultat-Discussion

« Mais l'homme ne se borne pas
à voir il pense et veut connaître
la signification des phénomènes
dont l'observation lui a révélé
l'existence. » "

*(Introduction à la médecine
expérimentale, 1966)*

CHAPITRE 3.1

STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Cette étude a été réalisée *ex-vivo* à partir de sang total périphérique humain. Les cellules sanguines peuvent être obtenues simplement grâce à un mode de prélèvement non invasif. Des échantillons différents provenant de plusieurs donneurs peuvent être recueillis facilement afin de prendre en compte la variabilité inter-individuelle dans l'étude de la réponse cellulaire. L'irradiation de ce type d'échantillon est relativement simple. Ces cellules et plus particulièrement les lymphocytes sont en temps normal à l'état quiescent. Ceci permet l'étude de la réponse à un stress génotoxique dans une population cellulaire homogène en terme de cycle cellulaire : au stade G0. Les irradiations sont effectuées sur le sang total afin de maintenir un environnement cellulaire au complet. Les doses étudiées, sont comprises entre 5 mGy et 500 mGy :

- **la dose de 500 mGy** correspond aux premiers effets cellulaires détectable c'est à dire le début du syndrome hématopoïétique
- **la dose de 100 mGy** correspond à la dose à partir de laquelle l'épidémiologie démontre un risque accru de cancer radio induit
- **les doses de 25 mGy et 50 mGy** correspondent à l'ordre de grandeur de la limite de dose maximale autorisée par an en France pour les travailleurs du nucléaire
- **les doses de 5 et 10 mGy** représentent l'ordre de grandeur des doses absorbées lors de scanner pour la réalisation de diagnostics médicaux.

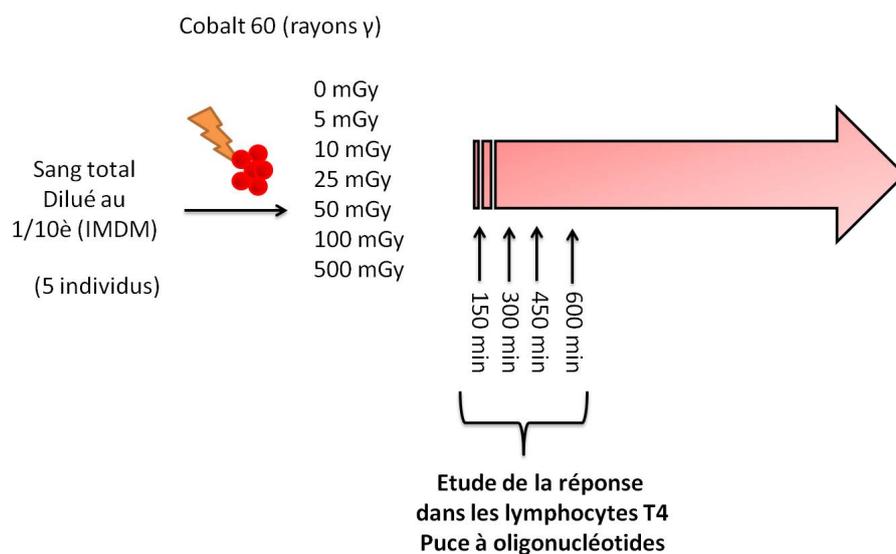


FIGURE 3.1.1: Schéma du protocole expérimental.

L'étude de la réponse à l'irradiation s'est faite dans les dix premières heures après l'exposition aux rayons gamma (source de cobalt 60). Nous supposons que si une réponse moléculaire existe, nous devrions pouvoir l'identifier dans les dix premières heures suivant l'irradiation. Ce choix a été également fait afin minimiser les effets potentiels d'une incubation *ex vivo* prolongée des échantillons de sang. Le choix des lymphocyte T CD4⁺ a été motivé par plusieurs raisons. Déjà, il semble raisonnable de supposer que la réponse moléculaire aux faibles doses doit être étudiée sur un type cellulaire homogène. En effet, la réponse transcriptomique à l'irradiation semble pouvoir dépendre du type cellulaire (Amundson et al., 2001). De plus, une étude réalisée au laboratoire de dosimétrie biologique a pu démontrer que le sous type lymphocytaire T CD4⁺ avait une réponse particulièrement importante en terme de modifications d'expression génique suite à une exposition à une dose de 50 mGy de radiations ionisantes (Gruel et al., 2008). Afin de minimiser le risque d'interférence entre une signalisation induite par la fixation d'un anticorps anti-CD4 sur son épitope et une potentielle réponse des cellules à l'irradiation, un tri négatif a été réalisé après exposition du sang (Mori et al., 2005). Enfin, l'étude de la réponse moléculaire a été réalisée sur cinq individus et exclusivement à l'aide des puces à oligonucléotides. La Figure 3.1.1 illustre schématiquement le protocole expérimental.

CHAPITRE 3.2

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES À L'ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME

Baser des interprétations et formuler des hypothèses sur des données biologiques issues d'échantillon de qualité optimale se révèlent cruciales (Lay et al., 2006). L'expression globale des gènes s'avère très sensible aux variations des conditions expérimentales (température, mélange cellulaire, ...) (Fan et al., 2002), (Mori et al., 2005) ce qui peut potentiellement entraîner des biais dans l'interprétation des résultats. Nous avons cherché à identifier et minimiser les différents biais expérimentaux. Pour cela, les contrôles de la qualité des échantillons constituent la première phase de l'analyse des données d'expression dans cette thèse. Une attention particulière a donc été portée sur toutes les étapes du protocole expérimental (qualité des enrichissements cellulaires, qualité des ARN totaux et amplifiés, qualité des hybridations...).

3.2.1 Numération de la formule sanguine des échantillons

Dans un premier temps, une numération de la formule sanguine sur les cinq individus a été réalisée. Connaître la proportion des cellules sanguines de chaque échantillon biologique permet de s'affranchir d'éventuel échantillon présentant une anomalie comme par exemple une lymphopénie.

Proportion	Individu 1	Individu 2	Individu 3	Individu 4	Individu 5	Normes
Neutrophiles	47.50%	70.20%	48.40%	68.06%	53%	45 - 74%
Lymphocytes	39.50%	19%	33.40%	23.30%	37.60%	16 - 45%
Monocytes	6.20%	6.20%	5.80%	4.70%	4.70%	4 - 10%
Eosinophiles	3.10%	2.40%	9.30%	1.10%	1.90%	0 - 7%
Basophiles	0.70%	0.40%	0.60%	0.50%	0.40%	0 - 2%

FIGURE 3.2.1: **Proportion mesurée des différents types cellulaires pour chaque individu.**

Les numérations de la formule sanguine sur les cinq individus utilisés dans ce travail n'ont présenté aucune anomalie lymphocytaire après comparaison avec les valeurs moyennes attendues (Figure 3.2.1).

3.2.2 Taux d'enrichissement cellulaires

L'analyse du transcriptome étant basée sur les lymphocytes T CD4⁺, leur isolement a été une étape particulièrement importante dans cette étude. Dans notre cas, une sélection négative des lymphocytes T CD4⁺ a été privilégiée. La variation de composition cellulaire des échantillons et leur contamination par des types cellulaires non désirés est un paramètre à contrôler. Pour cela nous avons vérifié les taux d'enrichissement cellulaire en lymphocyte T CD4⁺ à la suite de la sélection négative. Cette mesure a été réalisée en cytométrie en flux (voir Matériel et méthode). La Figure 3.2.1 est représentative de la composition cellulaire obtenue pour la majorité des échantillons avant et après la sélection négative des lymphocytes T CD4⁺.

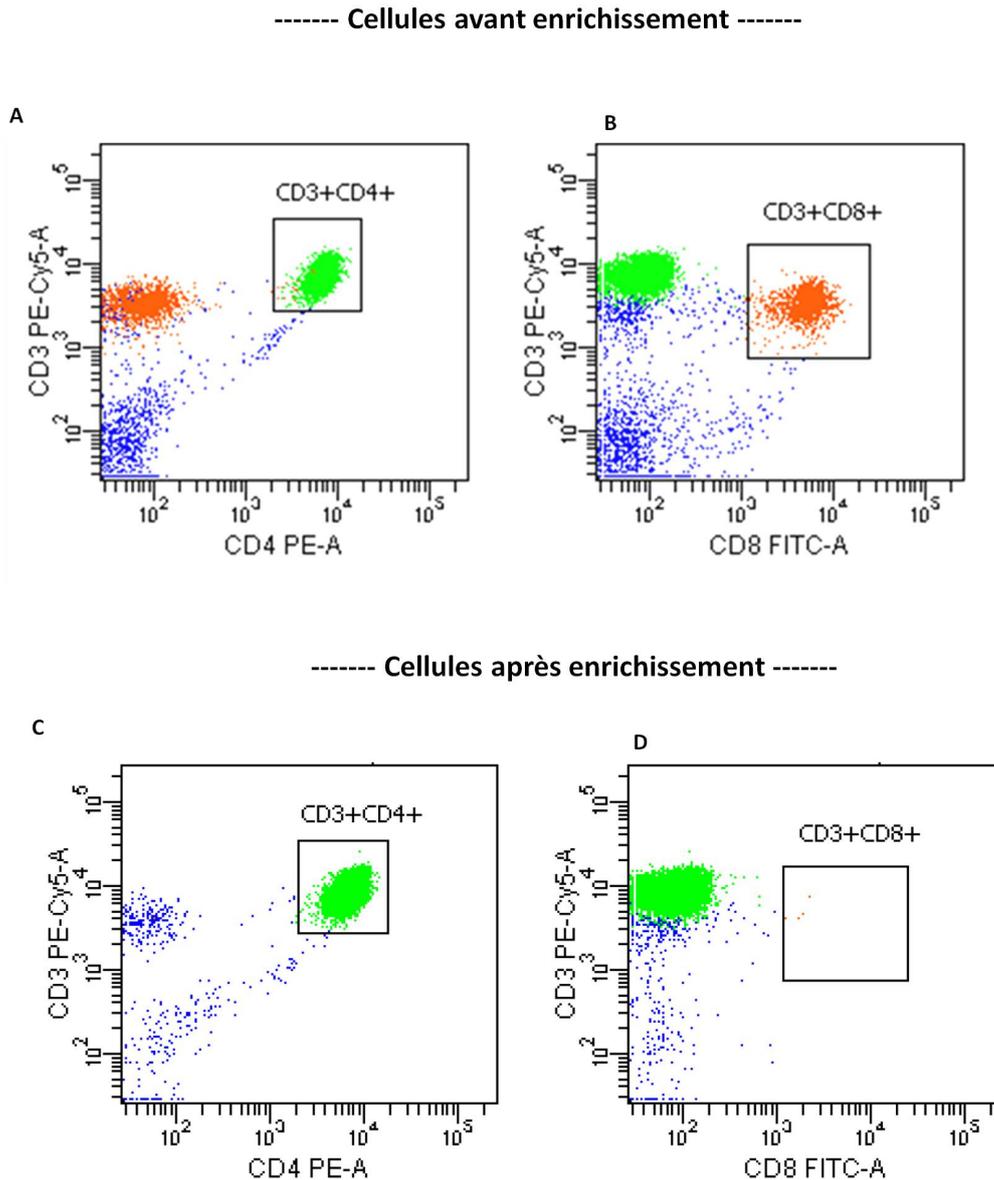


FIGURE 3.2.2: **Résultat du passage des cellules triées et non triées en cytométrie en flux.** **A** proportion des cellules à phénotype [CD3+ CD4+] avant l'enrichissement, **B** proportion des cellules à phénotype [CD3+ CD8+] avant l'enrichissement. **C** proportion des cellules à phénotype [CD3+ CD4+] après l'enrichissement, **D** proportion des cellules à phénotype [CD3+ CD8+] après l'enrichissement.

Le seuil d'enrichissement minimal pour les cellules à phénotype [CD3⁺/CD4⁺] a été fixé à 80%. Deux échantillons en dessous de cette valeur ont été écartés. Les valeurs moyennes d'enrichissement obtenues sont reportées dans le Tableau 3.2.1. Ces valeurs

valident le bon déroulement de la procédure de sélection négative et permet de s'assurer que la composition cellulaire est similaire pour l'ensemble des conditions étudiées.

Dose	Temps	Nombre de réplicats biologiques	Enrichissement moyen en lymphocytes T4
500mGy	T150	n=5	92.08% ± 4.94
	T300	n=5	93.28% ± 5.81
	T450	n=5	92.68% ± 5.83
	T600	n=5	95.06% ± 2.37
100mGy	T150	n=5	89.43% ± 9.00
	T300	n=5	93.54% ± 3.69
	T450	n=5	92.46% ± 6.67
	T600	n=5	92.38% ± 3.03
50mGy	T150	n=5	91.93% ± 5.57
	T300	n=5	92.77% ± 5.41
	T450	n=5	94.05% ± 4.37
	T600	n=5	94.45% ± 2.74
25mGy	T150	n=5	90.23% ± 6.48
	T300	n=4*	91.63% ± 8.92
	T450	n=5	91.08% ± 10.28
	T600	n=5	93.92% ± 3.59
10mGy	T150	n=5	93.02% ± 4.35
	T300	n=5	94.99% ± 2.11
	T450	n=5	95.01% ± 2.33
	T600	n=5	94.91% ± 1.73
5mGy	T150	n=4*	90.11% ± 4.35
	T300	n=5	94.64% ± 2.11
	T450	n=5	95.01% ± 2.33
	T600	n=5	94.91% ± 1.73
0mGy	T150	n=5	91.7% ± 3.56
	T300	n=5	95.58% ± 3.57
	T450	n=5	89.44% ± 5.87
	T600	n=5	94.9% ± 2.27

TABLEAU 3.2.1: Valeurs d'enrichissement en lymphocytes TCD4+. (* : échantillons écartés)

3.2.3 Contrôle qualitatif et quantitatif des échantillons

La quantité et la qualité des ARN totaux extraits des lysats cellulaires enrichis en lymphocytes T CD4⁺ ont été vérifiées. Les résultats pour les 138 extractions réalisées sont en moyenne (\pm écart type) de 903 ng (\pm 428) d'ARN totaux. Rappelons que tout le travail dans cette thèse a été effectué sur des cellules triées, la quantité d'ARN extraite est donc assez faible ($< 1 \mu\text{g}$ en moyenne). Concernant les valeurs de RIN, elles se révèlent être supérieures à 7 pour l'ensemble des ARN extraits. Nous n'avons constaté

aucune dégradation des échantillons d'ARN. Un profil type de migration des ARN est présenté dans la Figure 3.2.3A. Ce profil est représentatif des profils des 138 extractions d'ARN. Trois échantillons sur 138 ont été écartés de l'analyse car ils ne possédaient pas une quantité suffisante d'ARN pour réaliser une amplification.

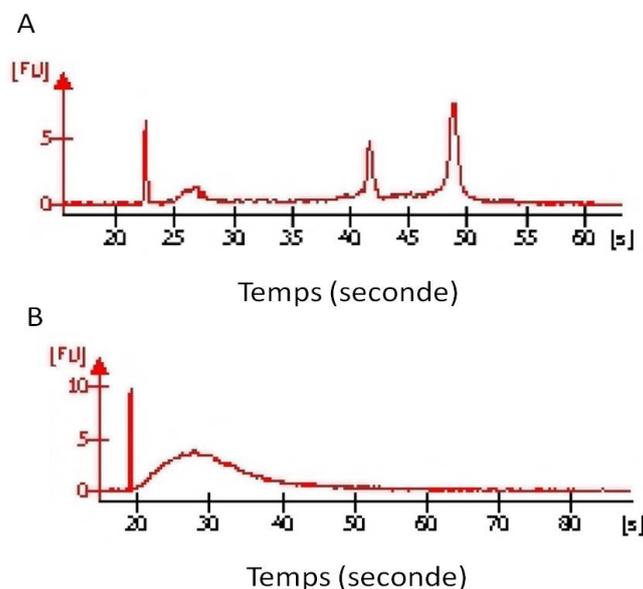


FIGURE 3.2.3: **Profils type de migration d'ARN pour un individu à un temps et à une dose (5 mGy, 150 min post irradiation)**. Ils ont été obtenus par migration électrophorétique avec un intercalant fluorescent (RNA 6000 Nano , BioAnalyser , Agilent). A) ARN totaux et B) ARNm amplifiés

Les résultats pour les 135 amplifications réalisées sont en moyenne de $4.4 \mu\text{g} (\pm 1.09)$ d'ARN amplifié (ARNa). Ce résultat est très satisfaisant sur l'ensemble des conditions car la quantité minimale d'ARN amplifiés et marqués, selon les instructions du fabricant, doit être de $1.65 \mu\text{g}$ pour l'hybridation sur biopuce. Les échantillons d'ARNa présentent en moyenne une activité spécifique pour la Cyanine3 de $13.1 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ d'ARNa (± 2.31) pour les 135 échantillons amplifiés. Cette activité varie quelque peu entre les échantillons, il y aura donc potentiellement une variation dans l'intensité globale des puces après hybridation. Ce point technique, entre autres, rend indispensable la normalisation des données lors de l'analyse (Bolstad, 2001). La forme du profil électrophorétique présentée en Figure 3.2.3B indique que l'intégrité des ARN amplifiés est conservée et ceci

pour tous les échantillons amplifiés. Les rendements détaillés des extractions des ARN totaux et ARNa sont présentés dans l'annexe B .

3.2.4 Contrôles de la qualité des hybridations

3.2.4.1 Linéarité du signal des ARN exogènes

Un contrôle de la qualité des hybridations a été réalisé sur les 135 puces afin d'évaluer la linéarité du signal fluorescent avec la concentration des ARNa-Cy3. Pour cela, une analyse par régression linéaire est réalisée pour chaque puce à partir des intensités d'hybridation des ARN exogènes (ou spike-in) et de leurs concentrations de départ.

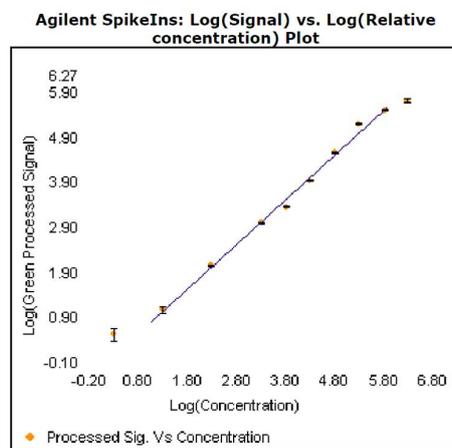


FIGURE 3.2.4: **Corrélation entre les concentrations connues des ARN exogènes et les intensités d'hybridation**

La Figure 3.2.4 illustre le résultat d'une régression linéaire obtenue pour une hybridation. La valeur moyenne des coefficients de régression obtenue pour l'ensemble des hybridations dans nos conditions est de 0.99.

3.2.4.2 Uniformité du signal d'hybridation avant normalisation

Nous nous attendons à observer une hybridation homogène pour chaque puce hybridée et une distribution similaire des intensités d'hybridation entre toutes les puces. La Figure 3.2.5 illustre une puce avec une répartition homogène des différents niveaux d'intensité

d'hybridation a) et une puce avec une colocalisation anormale des signaux extrêmes et donc à écarter b).

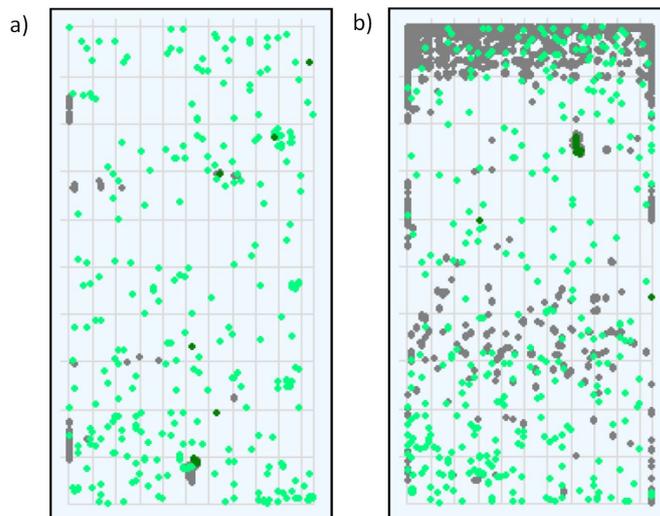


FIGURE 3.2.5: **Distribution spatiale des signaux d'hybridation.** La biopuce a) illustre une répartition acceptable des signaux et la biopuce b) un cas avec une distribution non homogène des signaux (effet de zone). Les intensités les plus fortes sont représentées en gris et les intensités plus faibles en vert.

Dans un deuxième temps, une comparaison de la distribution des intensités entre toutes les puces hybridées a été réalisée, dans le but d'écarter les puces présentant une distribution trop déviante (Figure 3.2.6).

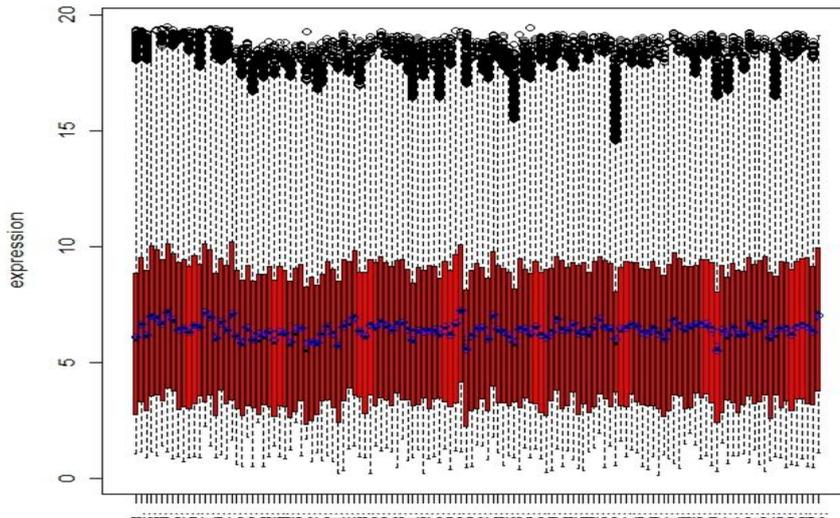


FIGURE 3.2.6: **Intensités brutes de l'ensemble des hybridations.** Visualisation graphique en boîte à moustache des intensités brutes des hybridations. Chaque boîte correspond à une hybridation parmi les 121.

A cette étape, 14 puces sur les 135 ont été écartées de l'analyse.

3.2.4.3 Analyse des signaux d'hybridation après normalisation

Les données brutes d'intensité sont normalisées par la méthode des quantiles (Bolstad, 2001). La dernière étape des contrôles consiste à analyser la reproductibilité des hybridations pour des oligonucléotides identiques déposés plusieurs fois sur chaque puce. Le résultat présenté à la Figure 3.2.7 atteste de la bonne qualité des 121 hybridations. En effet, la valeur des coefficients de variation pour l'ensemble des oligonucléotides est inférieure à 5%. Aucune puce n'a été écartée de l'analyse après ce contrôle qualité.

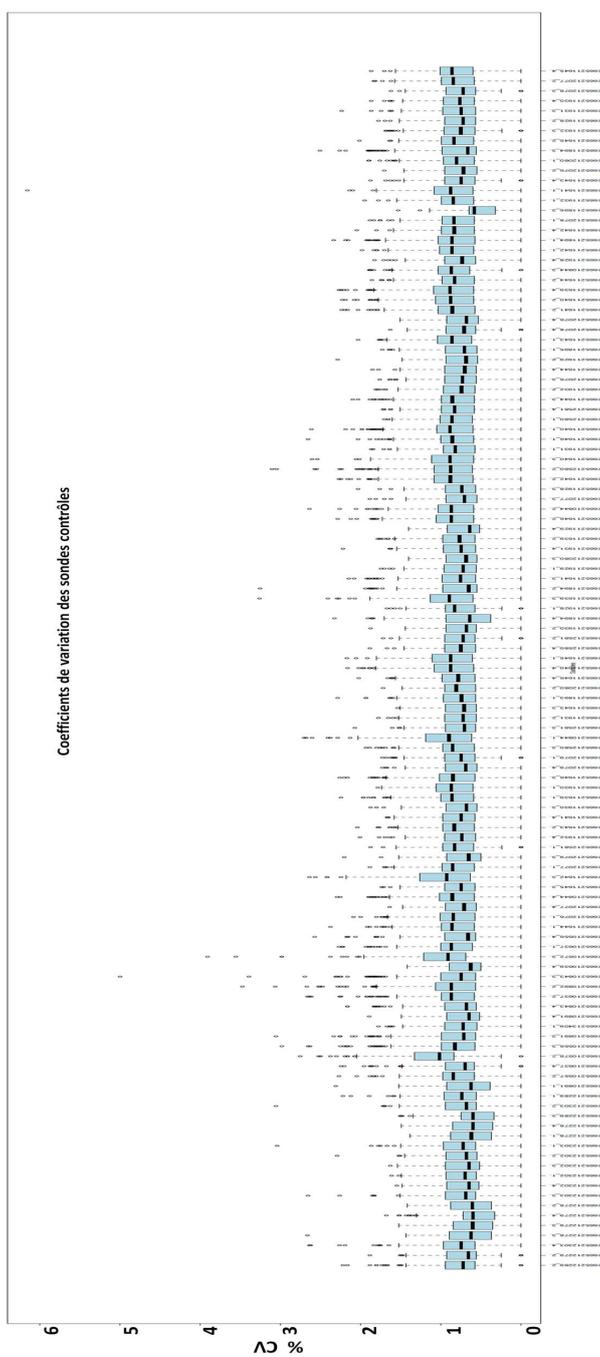


FIGURE 3.2.7: **Coefficients de variations des sondes contrôles répliquées.** Représentation graphique en boîte à moustache des coefficients de variation (CV) des intensités des signaux d'hybridation des sondes répliquées. Une boîte représente une condition expérimentale.

3.2.5 Classification hiérarchique des conditions expérimentales

Une analyse a été faite de manière à hiérarchiser les paramètres expérimentaux pouvant impacter les niveaux d'expression des 16696 gènes obtenus après filtrage des signaux aberrants. Cette méthode a pour objectif de regrouper les conditions présentant les profils d'expression les plus similaires pour l'ensemble des 16696 gènes retenus. Le résultat de cette classification illustré en Figure 3.2.8 a permis de mettre en évidence une tendance au regroupement des échantillons provenant du même individu. L'explication la plus plausible des regroupements observés résulte du fait que la composition de chaque échantillon d'ARN hybridé marque l'empreinte génétique de chaque individu. A ce niveau d'analyse, nous remarquons que les doses d'irradiation auxquelles les échantillons ont été exposées (5 à 500 mGy) ne semble pas avoir d'impact particulier sur la classification des échantillons à l'échelle globale des 16696 ARNm différents dont l'expression est testée.

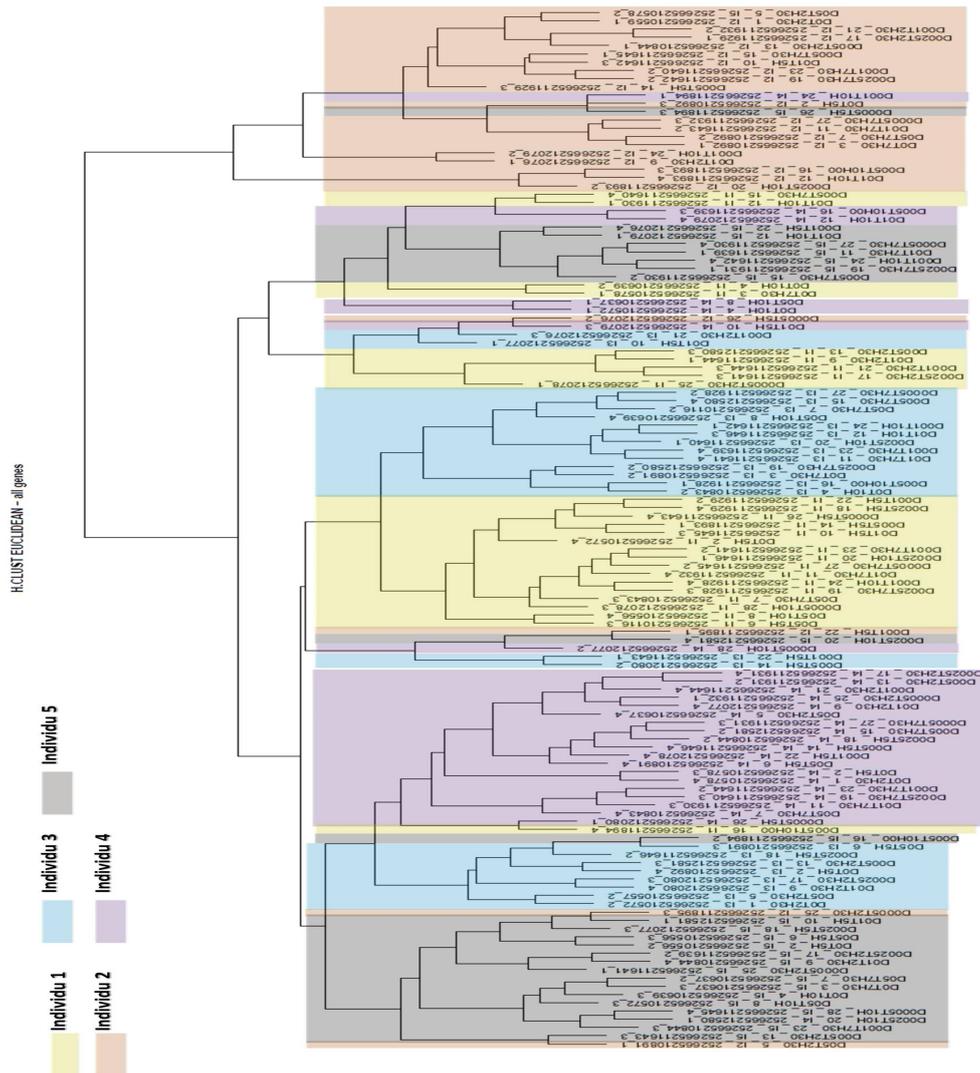


FIGURE 3.2.8: Classification hiérarchique à partir des 16696 intensités de fluorescence obtenues pour toutes les conditions. Ce regroupement est généré, à l'aide de la fonction Hierclus de « R », à partir des données normalisées et filtrées. Chaque couleur correspond à un individu.

3.2.6 Discussion des résultats

Dans la première partie de cette étude nous avons mis l'accent sur l'aspect qualitatif des échantillons à partir desquels nous réaliserons l'analyse de la réponse transcriptomique induite par de faibles doses de radiations ionisantes. Dans le domaine des biopuces,

cette étape est particulièrement cruciale pour l'obtention de mesures exploitables pour leur interprétation biologique (Lay et al., 2006). Ce travail d'analyse préliminaire a permis d'écarter les potentiels artéfacts expérimentaux pouvant biaiser le signal biologique. Ces contrôles minutieux accompagnés d'une bonne traçabilité des échantillons tout au long de ces étapes a permis, d'obtenir 121 hybridations répondant aux critères optimaux sur les 140 initiaux¹. soit une conservation de 86 % des échantillons initiaux (Figure 3.2.9). L'ensemble des données est disponible dans la base de données GEO avec le numéro d'accèsion GSE43151.

1. Ici (7 doses*4 temps) → 28 échantillons* 5 réplicats biologiques → 140 échantillons

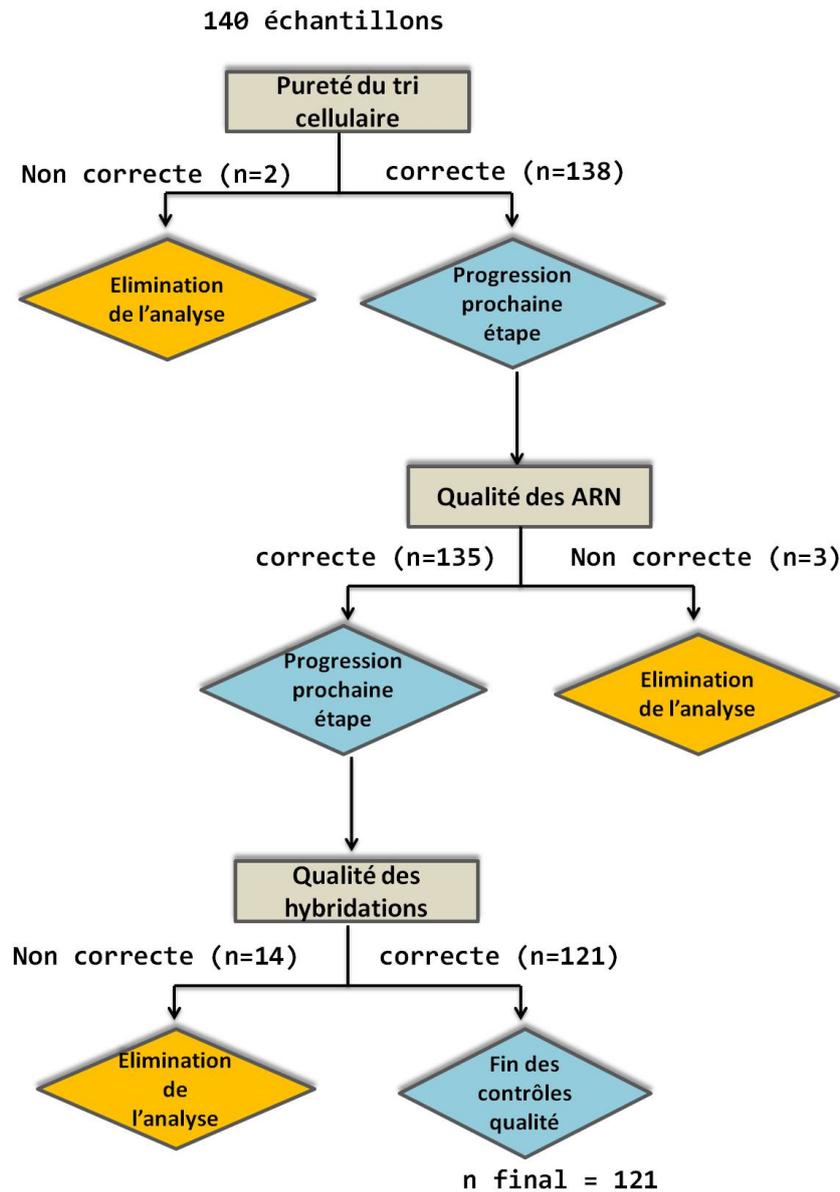


FIGURE 3.2.9: **Organigramme des principaux contrôles qualités.** Représentation des principales étapes de contrôle qualitatif et quantitatif ayant entraîné une sélection des échantillons possédant des conditions optimales pour l'analyse du transcriptome en réponse à l'irradiation. La quantité (n) retenue des échantillons à la fin de chaque contrôle est indiquée après chaque étape du processus.

CHAPITRE 3.3

VUE D'ENSEMBLE DE LA RÉPONSE AUX FAIBLES

DOSES

3.3.1 Quantification de l'expression des gènes modulés

Dresser une vue d'ensemble des modulations permet de déterminer les tendances majeures des réponses transcriptionnelles des cellules soumises aux faibles doses de rayonnements ionisants. La sélection des gènes ayant leur expression modulée significativement est réalisée par un test statistique t modéré corrigé par la méthode de BH pour les tests multiples, ($H_0 : \log_2(\text{ratio})=0, p \leq 0.05$) ainsi qu'un filtre sur l'amplitude de la modulation d'expression à 1.5 fois. Cette sélection est réalisée pour chacune des 24 conditions étudiées. La quantité des gènes modulés oscille entre 184 et 918 (Tableau 3.3.1). Le nombre total de gènes modulés dans au moins une des 24 conditions est de 2745.

Conditions	Quantité de gènes modulés significativement *	Gènes modulés à un temps		Fusion des gènes modulés
		Induits	Réprimés	
5 mGy / 150 min	775	773	455	2745
5 mGy / 300 min	737			
5 mGy / 450 min	360			
5 mGy / 600 min	184			
10 mGy / 150 min	389	733	361	
10 mGy / 300 min	426			
10 mGy / 450 min	535			
10 mGy / 600 min	638			
25 mGy / 150 min	489	768	323	
25 mGy / 300 min	552			
25 mGy / 450 min	466			
25 mGy / 600 min	564			
50 mGy / 150 min	566	793	323	
50 mGy / 300 min	322			
50 mGy / 450 min	520			
50 mGy / 600 min	320			
100 mGy / 150 min	718	931	333	
100 mGy / 300 min	275			
100 mGy / 450 min	519			
100 mGy / 600 min	599			
500 mGy / 150 min	918	864	577	
500 mGy / 300 min	436			
500 mGy / 450 min	245			
500 mGy / 600 min	761			

* modulation d'expression > 1.5
et Pvaleur < 5%

TABEAU 3.3.1: Présentation des 24 listes de gènes. La première colonne présente les 24 conditions. La deuxième colonne représente la quantité de gènes modulés (induits et réprimés) dans chaque condition. La troisième colonne fait l'état du nombre de gènes induits (rouge) et réprimés (noir) à au moins un des temps. Enfin la dernière colonne correspond au nombre total de gènes modulés dans au moins une des 24 conditions.

3.3.1.1 Quantification du nombre de gènes modulés pour chaque dose

La fusion des quatre listes (T150, T300, T450 et T600) de temps pour chaque dose a été effectuée comme le montre la Figure 3.3.1. Les résultats de cette fusion sont présentés dans la Figure 3.3.2. Pour chaque dose le nombre de gènes modulés dans les dix premières heures qui suivent l'irradiation oscille entre 1091 à 25 mGy et 1441 à 500 mGy.

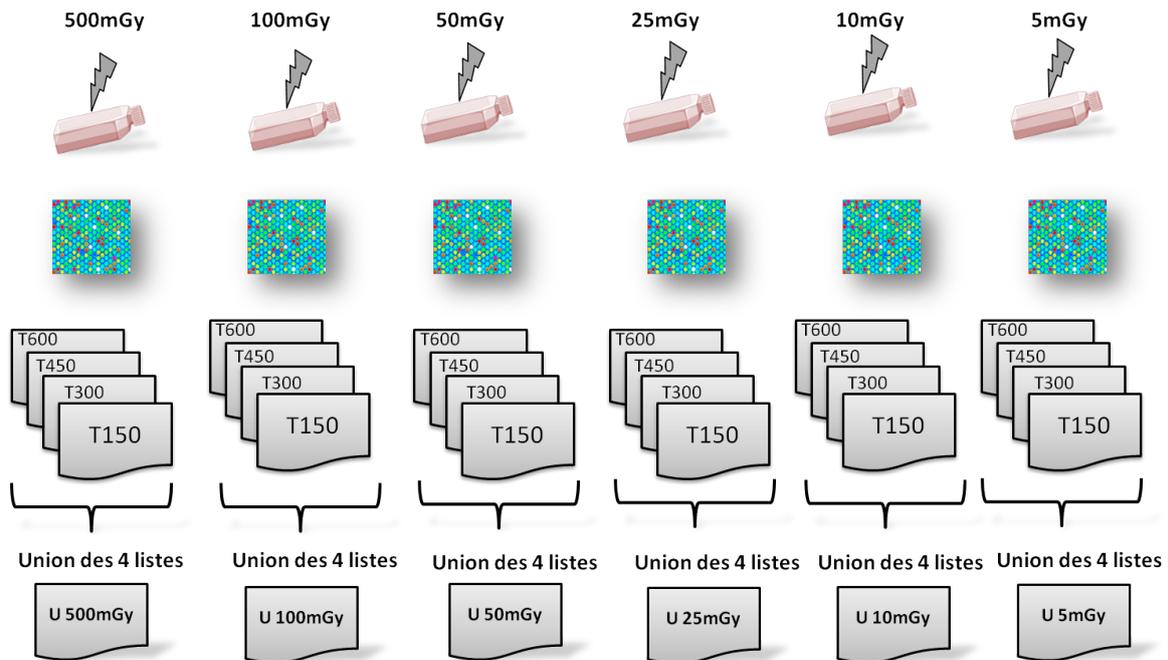


FIGURE 3.3.1: **Réalisation des listes d'union de gènes.** A chaque dose d , on retient par sélection tous les gènes modulés à au moins un des quatre temps, dans une liste d'union U .

La dose la plus faible (5mGy) n'est pas celle présentant le moins de gènes modulés. Ce sont les doses comprises entre 10 et 50 mGy qui montrent la plus faible quantité de modulations (Figure 3.3.2). En revanche, c'est pour la dose la plus forte (500 mGy) que nous avons observé le plus de gènes modulés.

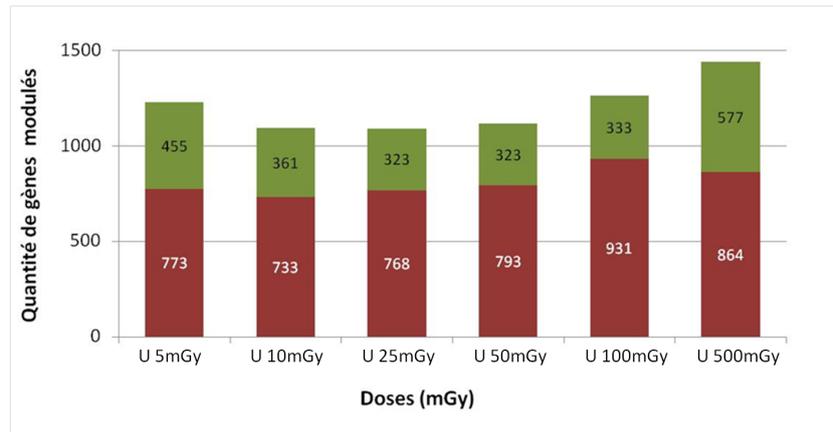


FIGURE 3.3.2: **Quantification des gènes modulés en réponse aux radiations ionisantes.** Cette quantification est basée sur l'union des listes de temps.

Jen et Cheung en 2003, ont comparé le nombre de modulation d'expression génique mesuré à une forte dose (3 Gy) et une très forte dose (10 Gy) dans une lignée lymphoblastique pendant les 24 premières heures suivant l'irradiation (Jen and Cheung, 2003). Une augmentation du nombre de gènes modulés avec la dose a été mise en évidence. Plus récemment, Knops *et al* en utilisant des doses faibles (20 mGy), moyenne (500, 1000 mGy) et fortes (2000, 4000 mGy) dans un modèle d'irradiation *ex-vivo* de sang total, ont observé également la même tendance (Knops *et al.*, 2012). Dans notre étude, cette augmentation semble également mise en évidence entre les doses faibles (25, 50 et 100) et la dose moyenne de 500 mGy. Il est intéressant de souligner qu'à des doses très faibles (<25 mGy) ce comportement ne semble pas être observé.

3.3.1.2 Quantification des gènes modulés pour chaque temps

L'observation graphique du nombre de gènes modulés par temps pour chaque dose (Figure 3.3.3) permet de mettre en évidence une variation temporelle du nombre des modulations. En effet, à 5 mGy, une diminution de la quantité de gènes modulés s'observe au fur et à mesure que le temps après irradiation augmente. Le phénomène inverse est constaté à 10 mGy. A la dose 25 mGy et 50 mGy une quantité de gènes modulés (induits ou réprimés) relativement stable est observée durant les dix premières heures après l'irradiation.

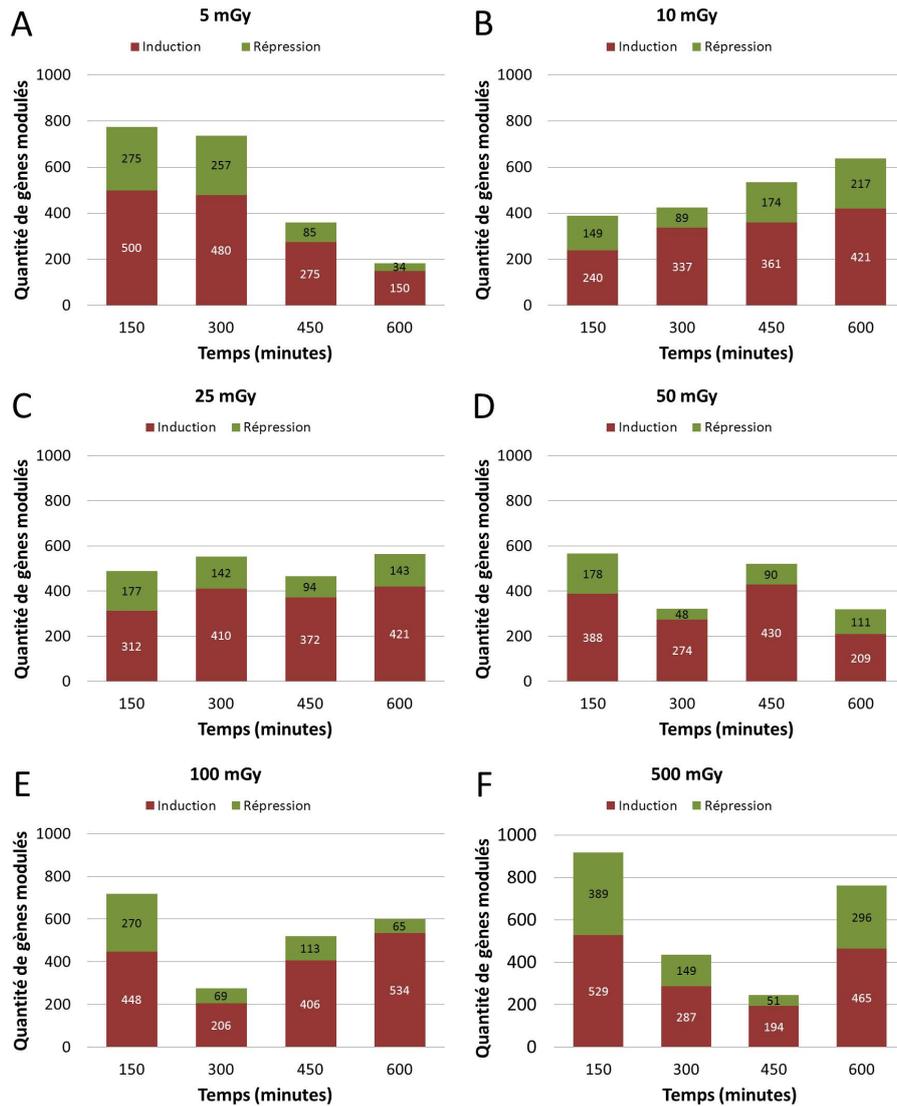


FIGURE 3.3.3: Nombre de gènes modulés significativement en réponse aux rayonnements ionisants. La quantité de gènes modulés à 5 mGy (A), 10 mGy (B), 25 mGy (C), 50 mGy (D), 100 mGy (E), 500 mGy (F) sont représentés sous forme d'histogramme. Un code couleur est utilisé, illustrant en rouge les inductions géniques et en vert les répressions géniques.

Pour la réponse transcriptionnelle à 100 et 500 mGy un phénomène en trois phases est observé (Figure 3.3.3). La première phase a lieu au temps 150 minutes, avec une quantité de gènes modulés importante. La deuxième phase est observée au temps 300 ou 450 minutes, elle est marquée par une forte diminution du nombre des gènes modulés suivi de la dernière phase avec une ré-augmentation à 450 ou 600 minutes après l'irradiation.

Aucun effet temporel de la sorte n'a été décrit dans la littérature en terme de quantité de gènes modulés. Knops *et al* ont étudiés des temps d'irradiation plus tardifs (6 h , 24 h, et 48 h) et de manière générale, ils observent une augmentation du nombre de gènes modulés à partir de 6 h pour des doses de 500 mGy et 4 000 mGy (Knops *et al.*, 2012).

3.3.1.3 Matrice d'intersection des gènes modulés

L'étude comparative des listes de gènes modulés permet de connaître la proportion de gènes en commun entre deux conditions (Figure 3.3.4). Cette analyse permet de savoir si nous sommes confrontés à une réponse spécifique de chaque dose avec un faible chevauchement dans la nature des gènes entre deux doses ou bien à une réponse commune avec un degré de similitude important entre les listes de gènes. Pour étudier cela nous avons construit une matrice d'intersection des listes de gènes modulés (Figure 3.3.4).

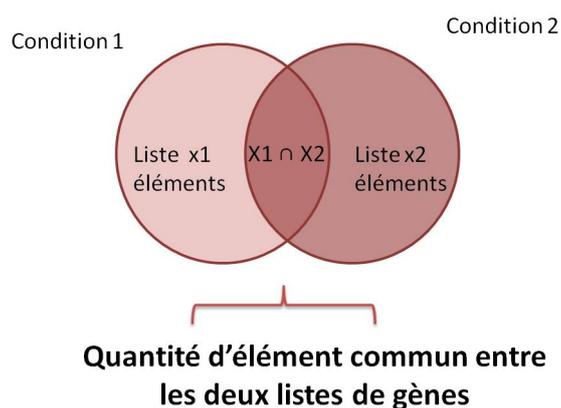


FIGURE 3.3.4: Principe de base de l'étude comparative des gènes en commun entre deux doses.

Les pourcentages représentent la proportion de gènes en commun sur l'ensemble des gènes comparés entre deux doses. A titre d'exemple, si l'on compare les gènes induits à 100 mGy (liste composée de 931 gènes) avec les gènes induits à 500 mGy (liste composée de 864 gènes) nous retrouvons une quantité de gènes en commun représentant 31.31% des gènes issus de la fusion des deux listes. La figure 3.3.5, nous montre une quantité

3.3.1. Quantification de l'expression des gènes modulés

de gènes induits en commun entre deux doses comprise entre 31% et 64%. La dose de 500 mGy partage le moins de gènes en commun avec les autres doses. Ceci indique une relative spécificité de la réponse à cette dose. En revanche le degrés de similitude augmente entre les réponses observées aux doses comprises entre 5 mGy et 50 mGy. La figure 3.3.6, illustre un phénomène semblable pour les répressions géniques.

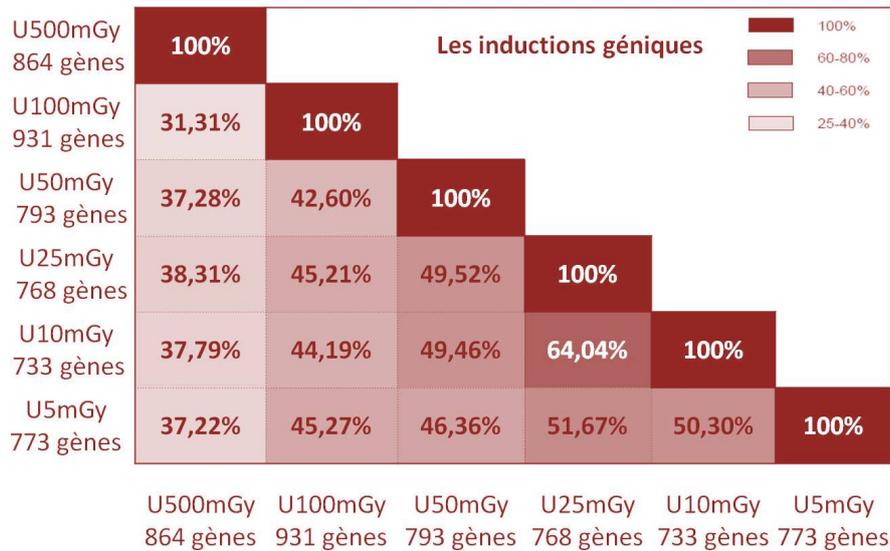


FIGURE 3.3.5: **Matrice d'intersection des inductions géniques.** Représentation matricielle du pourcentage de gènes en commun entre deux doses d .

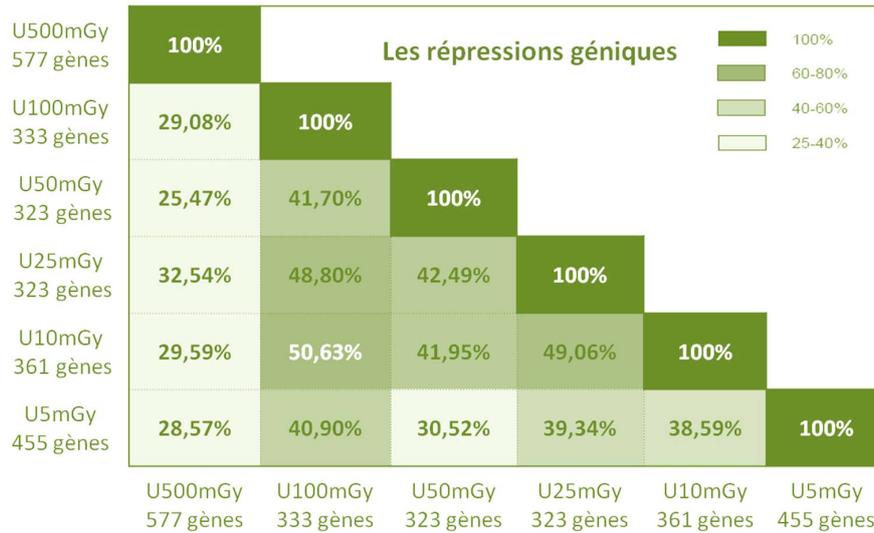


FIGURE 3.3.6: **Matrice d'intersection des répressions géniques.** Représentation matricielle du pourcentage de gènes en commun entre deux doses d .

3.3.1.4 Analyse des scores de corrélation

L'analyse des similitudes entre les doses a aussi été réalisée avec une autre approche mathématique en employant les scores de corrélation. Pour chaque temps après irradiation, chacune des doses a été associée à son ensemble spécifique de 2745 valeurs d'expression correspondant à la liste globale des gènes choisis comme modulés à au moins une dose et un temps après l'irradiation (Tableau 3.3.1). Cette association a été définie comme «profil de dose» pour un temps post-irradiation donné. Les scores de corrélation de Spearman ont ensuite été calculés pour chaque combinaison de deux profils de doses en utilisant le logiciel R.

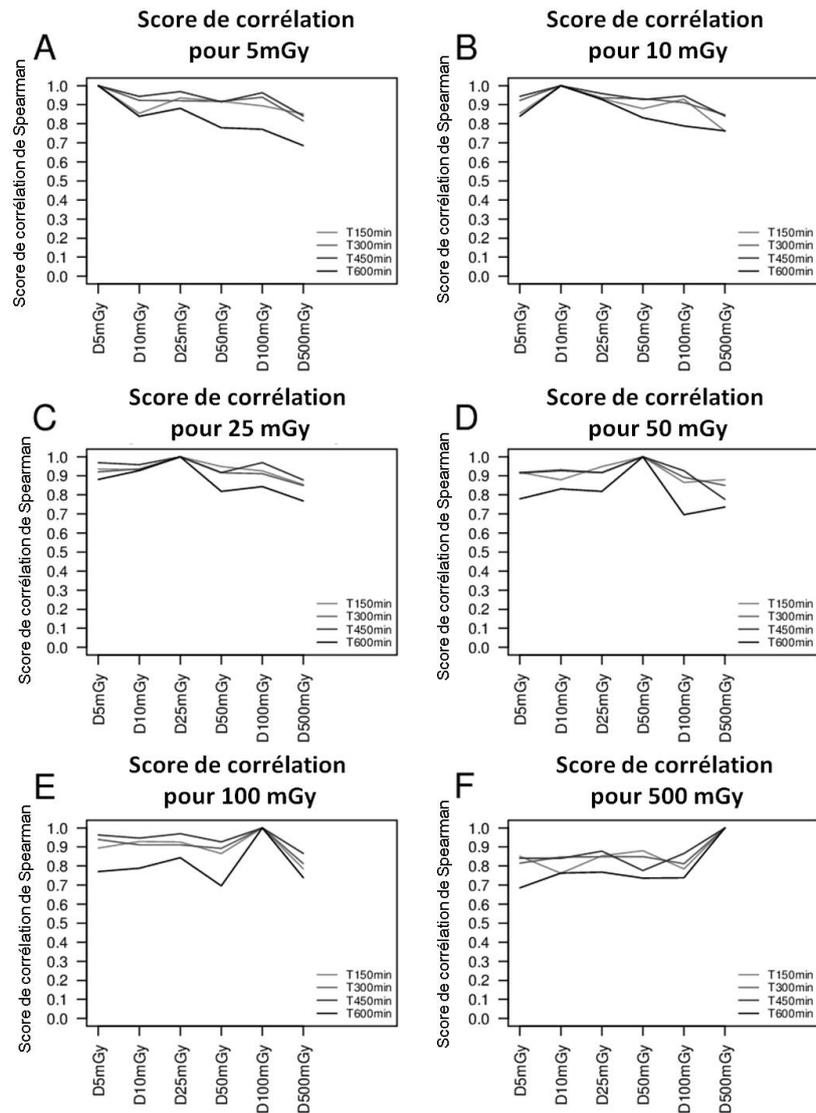


FIGURE 3.3.7: **Scores de corrélation de Spearman.** Les graphiques A, B, C, D, E et F représentent les scores de corrélation de Spearman lorsque les profils de chacune des doses (5, 10, 25, 50, 100 et 500 mGy respectivement) avec les autres doses. Les différents niveaux de gris de la courbe codent les temps après irradiation.

Les scores de corrélation entre les doses les plus faibles (5, 10 et 25 mGy) sont plus importants que lorsque ces faibles doses sont comparées aux doses les plus élevées (50, 100 et 500 mGy). En outre, les scores de corrélation les plus faibles ont été généralement observés lors des comparaisons avec 500 mGy (Fig 3.3.7). Toutes ces tendances sont particulièrement marquées pour le dernier temps après irradiation (600 min). Cette

analyse des scores de corrélation montre la même tendance que celle obtenue avec les matrices d'intersection. L'utilisation de ces deux approches analytiques différentes permet de renforcer l'hypothèse d'une réponse différentielle entre 500 mGy et les autres doses testées.

CHAPITRE 3.4

ÉTUDE DES PROFILS DE MODULATION EN FONCTION DE LA DOSE D'IRRADIATION

L'objectif de ce chapitre est de classifier les différents profils de modulation génique obtenus en réponse à l'irradiation. Pour cela, la liste de 2745 gènes significativement modulés au moins dans une des 24 conditions expérimentales testées a été utilisée.

3.4.1 Identification de profils d'expression d'intérêt

Une représentation graphique des profils d'expression des 2745 gènes a été dressée sous forme de carte thermique associée à une classification hiérarchique des gènes en fonction de la similarité des profils (annexe C). Nous avons également ajouté à cette représentation la notion de significativité de chaque modulation à l'aide d'un système de symboles (U pour induits et D pour réprimés) codant si une modulation donnée avait comme caractéristiques : $|\log \text{ratio}| > 0.585$ et P. valeur FDR < 0.05 . Nous avons basé notre sélection sur deux critères : la forme du profil et l'observation de modulations significatives pour plusieurs temps de la même dose.

La stratégie adoptée a permis l'identification de groupes de gènes présentant deux types de profils remarquables :

- **Le premier type de profil** identifié concerne des gènes présentant un effet dose prononcé : plus la dose augmente et plus la modulation est importante. Ainsi, cinq zones contenant des groupes de gènes avec un tel profil (zones 1 à 5 de l'annexe C1) ont été identifiées. Au total, 68 gènes présentant ce type de profil ont pu être sélectionnés.
- **Le deuxième type de profil** identifié concerne des gènes présentant une modulation d'expression plus ou moins constante dans une majorité des conditions testées. Le niveau de modulation des gènes reste le même quelle que soit la dose. Cinq zones ont été identifiées avec un tel profil (zones 6 à 10 de l'annexe C2). Au total, 302 gènes présentant ce type de profil ont pu être sélectionnés.

Cette sélection a permis l'identification d'un total de 370 gènes sur l'ensemble des 2745 profils initiaux. Il est intéressant de souligner que la quantité de gènes ayant un niveau de modulation indépendant de la dose est quatre fois plus grand que le nombre de gènes dont la modulation varie avec la dose.

3.4.2 Classification des gènes appartenant aux profils de type I

Une nouvelle classification hiérarchique, basée cette fois sur les gènes appartenant aux profils de type I (68 gènes) a été effectuée. Cette classification met en évidence trois groupes distincts de gènes. Chaque groupe présente un seuil de dose différent à partir duquel des modulations significatives sont mesurées. Sa représentation graphique est proposée en Figure 3.4.1, une représentation avec une meilleure visibilité est disponible en annexe C1.

Dans cette classification, les groupes 1, 2, 3 rassemblent respectivement un total de 43, 18 et 7 gènes à partir duquel des modulations significatives sont mesurées : les gènes du groupe 1 présentent une induction significative principalement à partir 500 mGy, ceux du groupe 2 présentent une légère induction à partir de 100 mGy et ceux du groupe 3 voient

3.4.2. Classification des gènes appartenant aux profils de type I

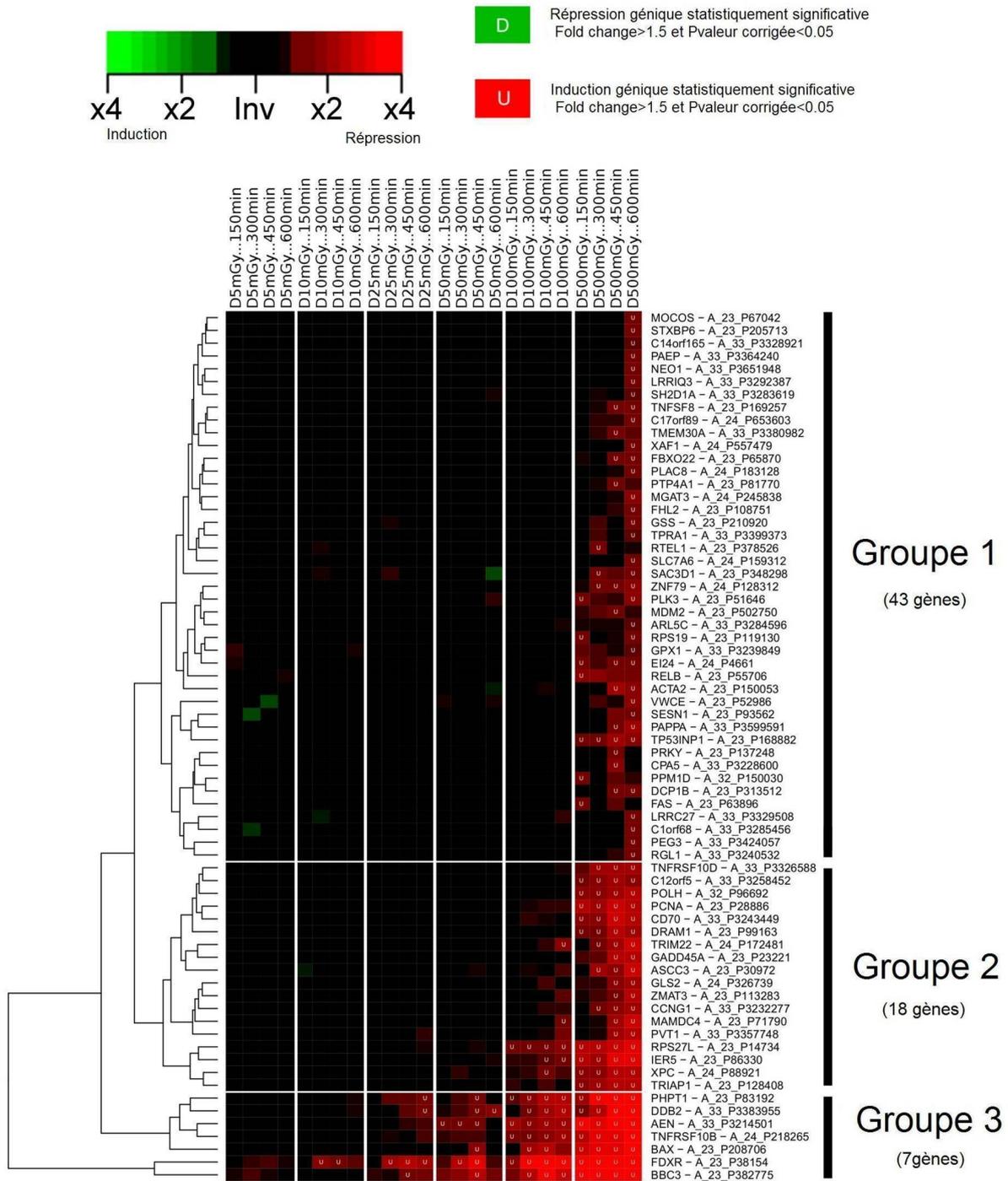


FIGURE 3.4.1: Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type I. Les profils d'expression des gènes des groupes 1, 2 et 3 présentent un effet dépendant de la dose d'irradiation. La valeur du logarithme en base 2 du rapport d'expression (condition vs référence) de chaque gène dans chaque condition est indiquée par un code de couleurs.

leur expression augmenter à partir de 50 mGy. Les profils moyens des gènes provenant respectivement des groupes 1, 2 et 3 ont été dressés et sont présentés en Figure 3.4.2. Les profils d'expression de chaque gène prenant en compte la variabilité inter-individuelle est présenté en annexe D.

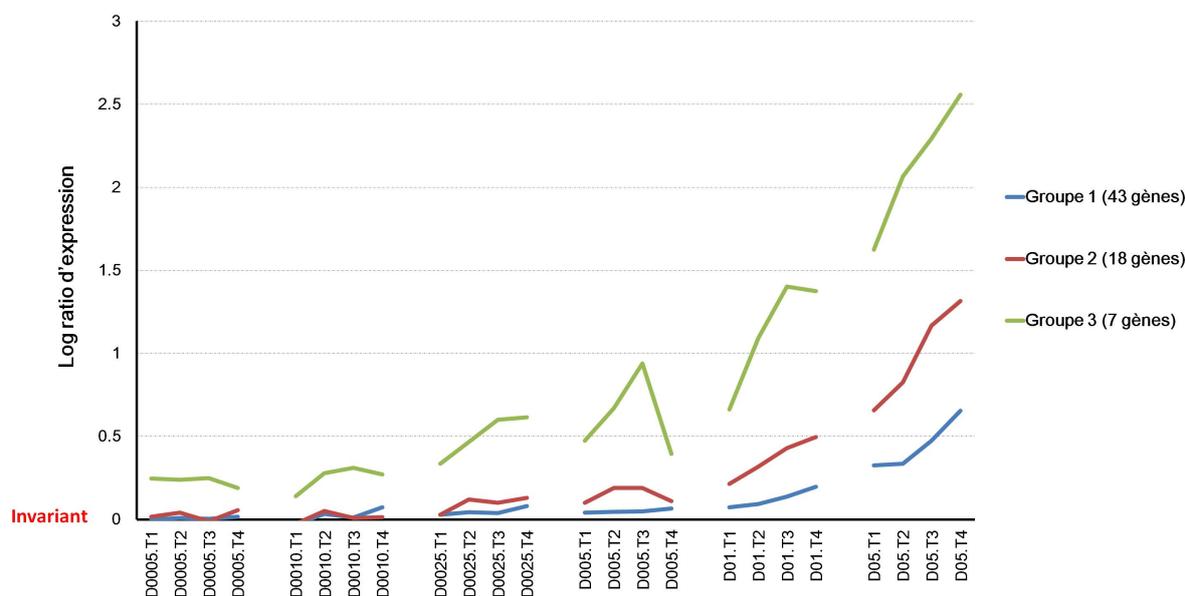


FIGURE 3.4.2: **Profils moyens des gènes provenant des groupes 1, 2 et 3.** Variation moyenne des gènes issus du groupe 1 (bleu), groupe 2 (rouge), et groupe 3 (vert) en fonction du temps et de la dose d'irradiation.

3.4.3 Classification des gènes appartenant aux profils de type II

La classification des gènes appartenant au profil de type II a permis de mettre en évidence quatre autres groupes de gènes présentant chacun un profil particulier. Ces groupes 4, 5, 6 et 7 rassemblent respectivement 199, 35 et 21 et 47 gènes Figure 3.4.3, Figure 3.4.4 et Figure 3.4.5. Une représentation avec une meilleure visibilité est disponible en annexe C2.

3.4.3. Classification des gènes appartenant aux profils de type II

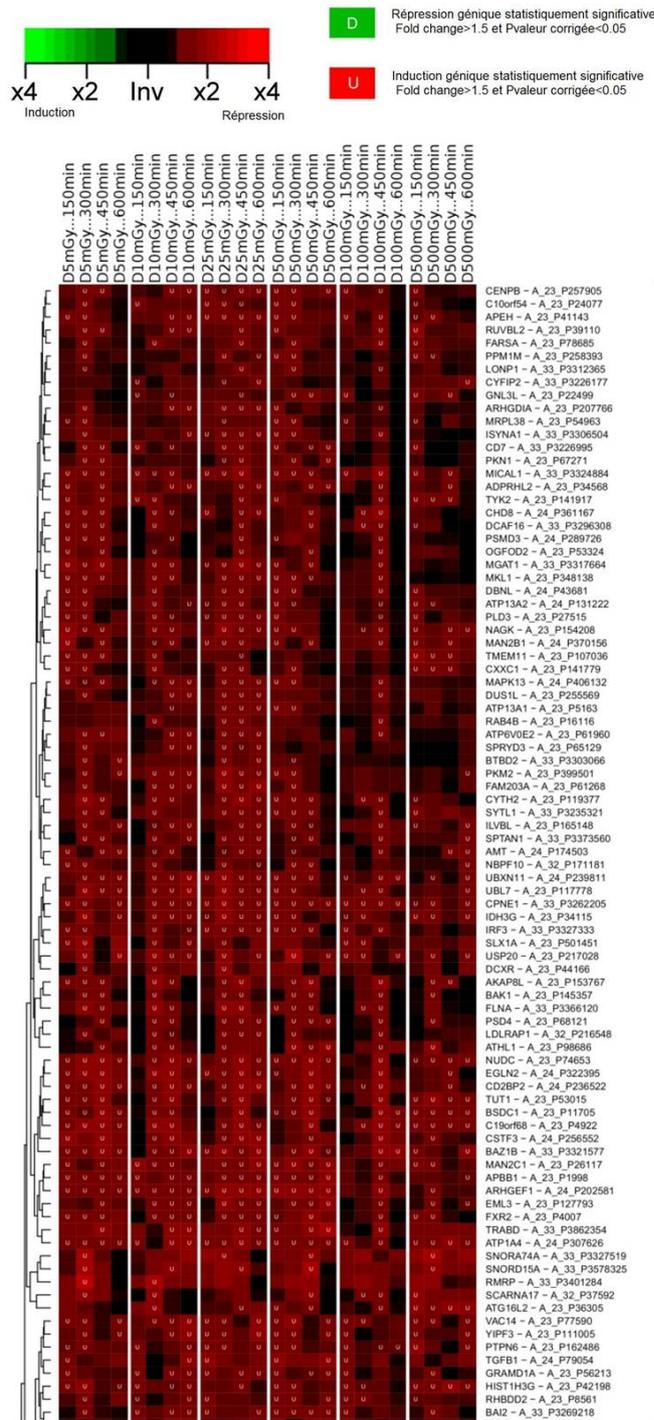


FIGURE 3.4.3: Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II. Les profils d'expression des gènes des groupes 4, 5, et 7 présentent un effet indépendant de la dose d'irradiation. La valeur du logarithme en base 2 du rapport d'expression (condition vs référence) de chaque gène dans chaque condition est indiquée par un code de couleurs.

3.4.3. Classification des gènes appartenant aux profils de type II

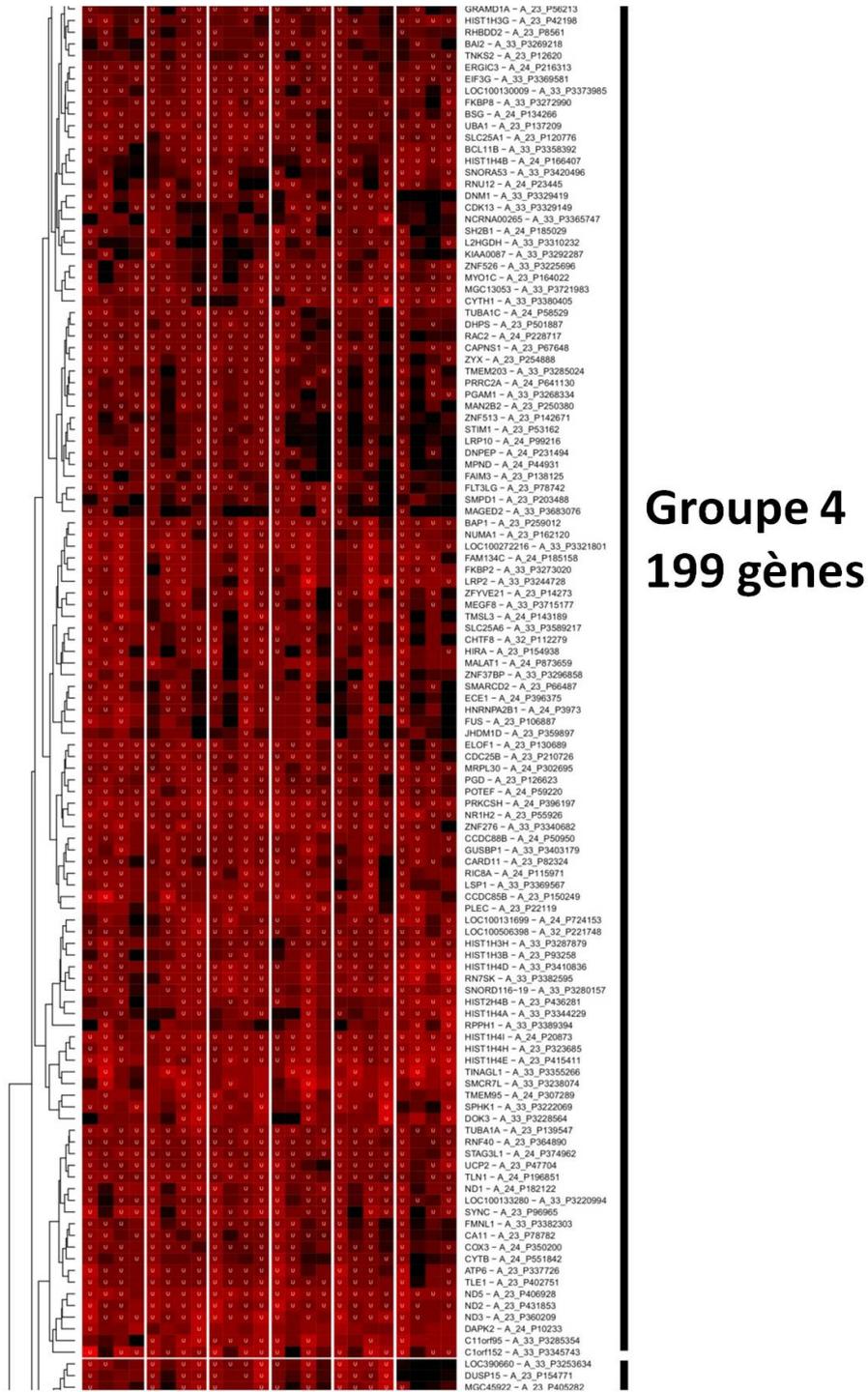


FIGURE 3.4.4: Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II (suite).

3.4.3. Classification des gènes appartenant aux profils de type II

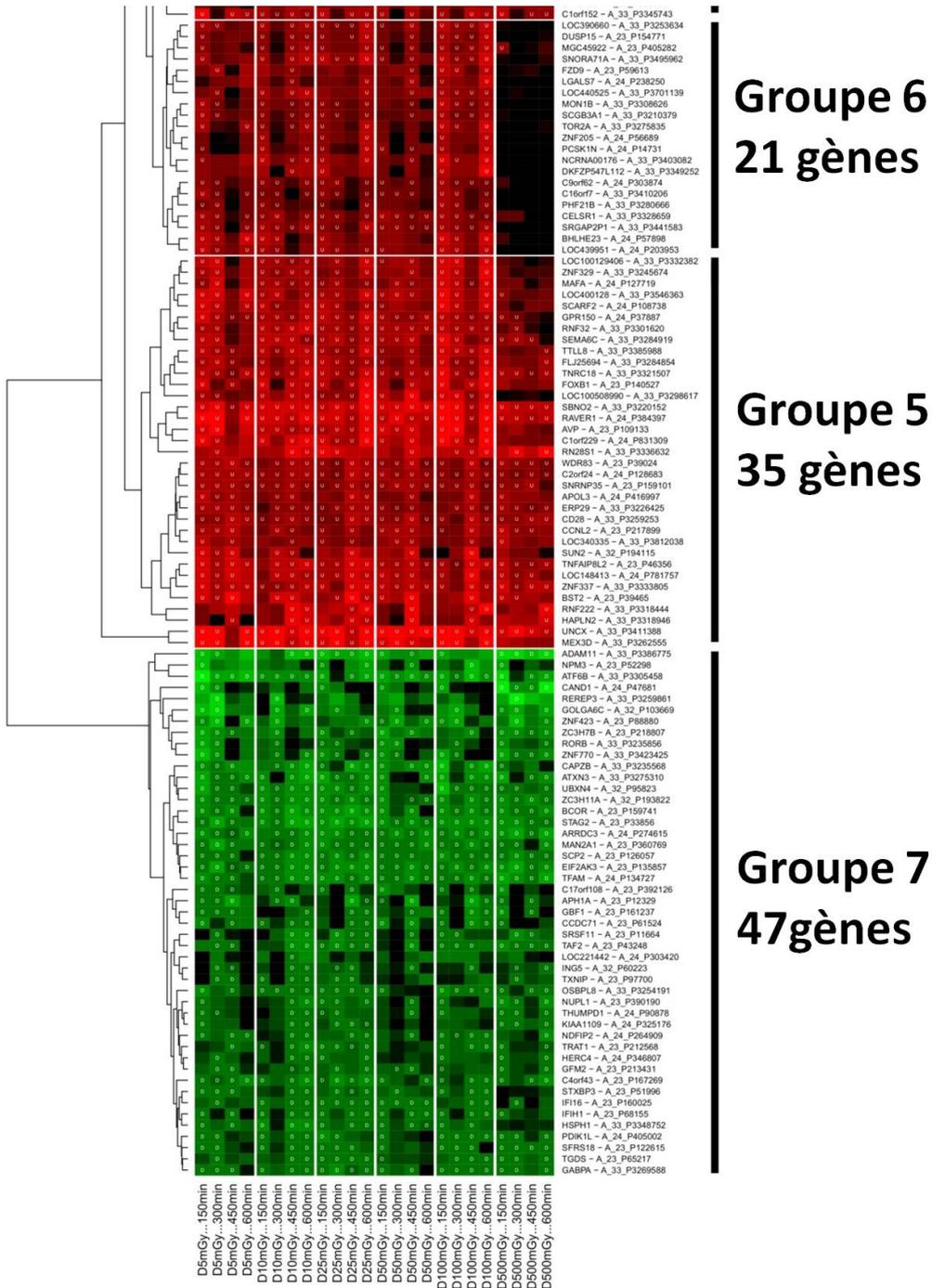


FIGURE 3.4.5: Expression et classification hiérarchique des gènes appartenant aux profils de type II (suite).

Les profils d'expression moyen de chaque groupe sont présentés dans la Figure 3.4.6.

Le groupe 4 se compose de 199 gènes induits à toutes les doses testées. Leur niveau d'induction ne dépend pas de la dose. Les gènes du groupe 5 ont un profil d'expression assez particulier. En effet, les 35 gènes de ce groupe ont un niveau d'induction constant de 5 mGy à 100 mGy, puis leur expression diminue légèrement à la dose la plus forte (500 mGy). Les 21 gènes du groupe 6 ont un profil similaire à ceux du groupe 5 sauf que l'on observe une absence de modulation à 500mGy. Le groupe 7 rassemble 47 gènes présentant une répression génique après exposition aux radiations ionisantes à des doses comprises entre 5 et 500 mGy. Les profils d'expression de chaque gène prenant en compte la variabilité inter-individuelle est présenté en annexe D.

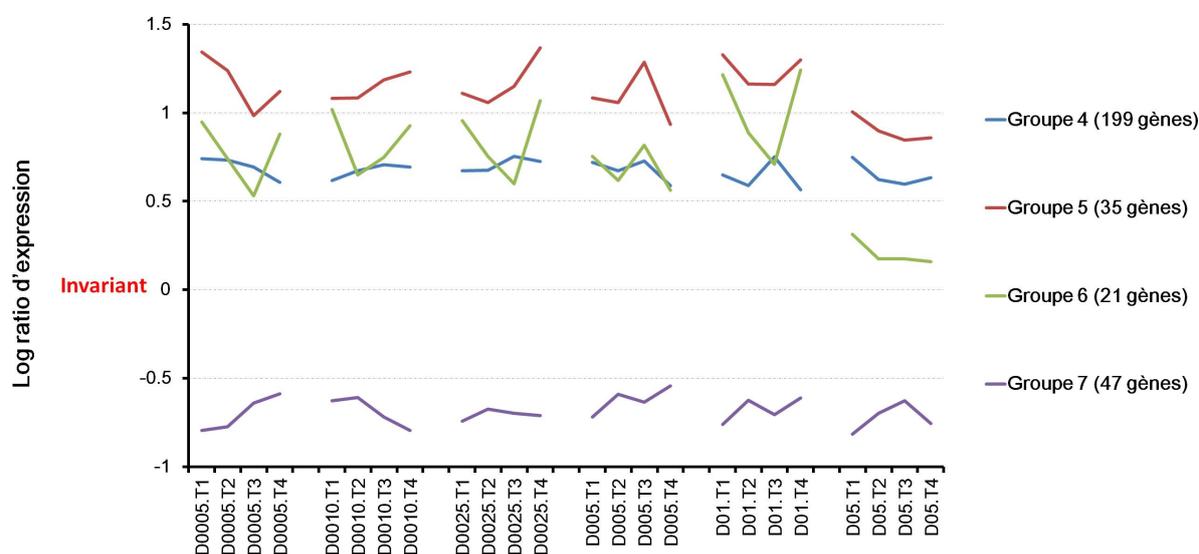


FIGURE 3.4.6: **Profils moyens des gènes provenant des groupes 4, 5, 6 et 7.** Variation moyenne des gènes issus du groupe 4 (bleu), groupe 5 (rouge), groupe 6 (vert) et groupe 7 (violet) en fonction du temps et de la dose d'irradiation.

3.4.4 Discussion sur la classification des gènes

Le traitement des données est un point critique dans l'analyse des approches à haut débit et sur ce point les méthodes de classification sont des outils essentiels dans l'exploitation des données. Ces dernières permettent de constituer des groupes de gènes sur des critères de distances ou de corrélations calculés entre les profils de modulations. Dans notre étude, un profil de modulation comporte toutes les valeurs d'expression mesurées dans les 24 conditions pour un gène donné. Ainsi, les gènes présents dans un même groupe ont un comportement similaire en fonction du temps et de la dose d'irradiation. Cette classification semble donc être un bon point de départ pour étudier les fonctions et régulateurs impliqués dans la réponse à une exposition à différents niveaux de faibles doses de rayonnements ionisants.

CHAPITRE 3.5

INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE DES PROFILS DE MODULATION D'EXPRESSION

L'objectif de ce chapitre est de pouvoir donner une interprétation biologique aux modifications du transcriptome par l'identification des processus biologiques et des régulateurs d'expression susceptibles d'être impliqués dans la réponse cellulaire suite à une exposition à de faibles doses.

3.5.1 Analyse des fonctions biologiques

3.5.1.1 Gènes différentiellement modulés en fonction de la dose.

Cette analyse fonctionnelle vise à mettre en évidence des processus biologiques dans lesquels seraient impliqués les gènes identifiés. Elle est réalisée avec l'outil ToppGene qui fait référence à des bases de données d'annotation fonctionnelle : Gene Ontology et Entrez Gene entre autres. L'outil ToppGene calcule un score d'enrichissement pour une annotation dans notre liste de gène d'intérêt par rapport à la fréquence de cette annotation dans le génome entier (voir matériel et méthode). Nous avons ainsi voulu connaître les fonctions cellulaires enrichies significativement (P valeur < 0.05) dans les sous-ensembles des gènes identifiés dans le chapitre précédent.

3.5.1.1.1 Sur-expression à partir de 50 mGy

Le Tableau 3.5.1 liste les fonctions biologiques significativement enrichies dans le groupe 3. Il semble que les activations des processus de régulation de l'apoptose (P valeur = $2.01.10^{-7}$) et de la réponse aux dommages ADN (P valeur = $1.47.10^{-4}$) soient détectables dès 50 mGy.

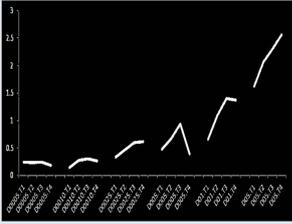
Profil moyen groupe 3 (7 gènes)	Numéro GO	Fonction cellulaire	P-valeur	Nombre de gènes annotés	Nom des gènes
	GO:0042981	régulation des processus apoptotiques	2,01E-07	4	BBC3,BAX,TNFRSF10B,AEN
	GO:0006974	réponse aux dommages à l'ADN	1,47E-04	4	DDB2,BBC3,BAX,AEN

TABLEAU 3.5.1: **Processus biologiques du groupe 3**

Dans le groupe 3, le gène FDXR a été observé comme ayant la modulation génique la plus sensible, significative dès 25 mGy mais il n'a pas pu être associée à une fonction cellulaire significativement enrichie dans ce groupe. FDXR a déjà été décrit comme étant induit en réponse aux rayonnements ionisants à de faibles et fortes doses. Une récente étude a mis en évidence par RT-PCR l'induction du gène FDXR dans un modèle de lymphocytes en culture et un modèle utilisant du sang total, 2h et 24h après irradiation à des doses de 2 et 4 Gy ([Kabacik et al., 2011](#)). Dans le même sens, l'analyse du transcriptome des cellules du sang périphérique 6h et 24h après irradiation à 0.5, 2, 5 et 8 Gy avec la méthode des puces à ADN a permis à Paul *et al* ([Paul and Amundson, 2008](#)) de mesurer une induction de FDXR dès 500 mGy. Manning *et al* ont aussi étudié les modulations de FDXR en réponse aux radiations ionisantes dans un modèle d'irradiation de sang total ([Manning et al., 2013](#)). Ils ont analysé la réponse des cellules à 2h et 24 h après irradiation à des doses faibles de 5, 10, 20, 50, 75 et 100 mGy par PCR quantitative. Ils observent une modulation significative de FDXR à partir de 50 mGy.

Le gène FDXR code pour une flavoprotéine mitochondriale qui initie le transport des électrons pour les cytochromes recevant du NADPH.

3.5.1.1.2 Sur-expression à partir de 100 mGy

Le Tableau 3.5.2 liste les trois catégories fonctionnelles significativement enrichies dans le groupe 2.

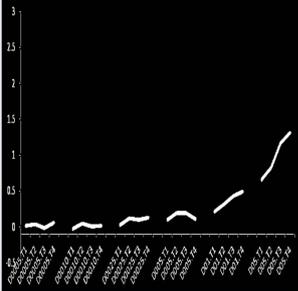
Profil moyen groupe 2 (18 gènes)	Numéro GO	Fonction cellulaire	P-valeur	Nombre de gènes annotés	Nom des gènes
	GO:0006974	réponse aux dommages à l'ADN	1,12E-09	9	GADD45A, TRIAP1, ASCC3, ZMAT3, RPS27L, POLQ, PCNA, XPC, CCNG1
	GO:0042981	régulation des processus apoptotiques	9,09E-06	8	DRAM1, TRIAP1, ZMAT3, RPS27L, GLS2, CD70, TNFRSF10D, CCNG1
	GO:0022402	progression du cycle cellulaire	3,26E-04	6	GADD45A, TRIAP1, RPS27L, PCNA, XPC, CCNG1

TABLEAU 3.5.2: **Processus biologiques du groupe 2**

Il semble que les activations des processus de réponse aux dommages à l'ADN (P valeur = $1.12 \cdot 10^{-9}$) de régulation des processus apoptotiques (P valeur = $9.09 \cdot 10^{-6}$) et de progression du cycle cellulaire (P valeur = $3.26 \cdot 10^{-4}$) soient détectables dès 100 mGy. C'est dans ce groupe que l'on trouve une majorité de gènes (70 %) déjà décrits dans la littérature comme étant modulés en réponse aux radiations ionisantes. Les gènes GADD45A (Papathanasiou et al., 1991), RPS27L (Kabacik et al., 2010), PCNA (Shan et al., 2003), XPC (Wiebalk et al., 2007), ASCC3 (Rashi-Elkeles et al., 2011), POLH (Rashi-Elkeles et al., 2011), ZMAT3 (Rashi-Elkeles et al., 2011), CD70 (Turtoi et al., 2010) et CCNG1 (Manning et al., 2013) sont en effet déjà largement décrits dans la littérature comme induits en réponse aux radiations ionisantes.

3.5.1.1.3 Sur-expression à partir de 500 mGy

Le Tableau 3.5.3 présente les fonctions cellulaires significativement enrichies dans le groupe 1.

Profil moyen groupe 1 (43 gènes)	Numéro GO	Fonction cellulaire	P-valeur	Nombre de gènes annotés	Nom des gènes
	GO:0042981	régulation des processus apoptotiques	8,91E-03	8	MDM2,TNFSF8,TP53INP1,GPX1, EI24,PLK3,FAS,FHL2
	GO:0007049	cycle cellulaire	4,46E-02	7	MDM2,TP53INP1,SESN1,PLK3, SAC3D1,PPM1D, PTP4A1
	GO:0044265	catabolisme cellulaire	5,28E-03	6	MDM2,DCP1B,GPX1,PLK3, FBX022,RPS19

TABLEAU 3.5.3: **Processus biologiques du groupe 1**

Il semble que les activations de ces processus soient détectables à 500mGy. Cependant à cette dose, on observe une modulation de l'ensemble des gènes appartenant aux autres groupes (exception faite des gènes du groupe 6) et donc une implication de l'ensemble des processus biologiques décrits pour ces autres groupes. La seule catégorie fonctionnelle spécifique de cet ensemble de gènes est celle du catabolisme cellulaire. Une proportion de 14 % du groupe 1, soit six gènes (MDM2, DCP1B, GPX1, PLK3, FBX022, RPS19), codent pour des protéines impliquées dans cette fonction. Les protéines MDM2 et FBOX22 sont impliquées dans des mécanismes liés au protéasome. La protéine MDM2 est une protéine à activité de protéine ubiquitine ligase E3. Elle assure la médiation de l'ubiquitination de la protéine TP53 conduisant à sa dégradation par le protéasome ([Michael and Oren, 2003](#)). Le gène MDM2 est connu pour être induit en réponse à l'irradiation ([Perry, 2004](#)). FBOX22 est aussi une protéine à activité de protéine ubiquitine ligase ([Tan et al., 2011](#)). Une récente étude a étudié les modulations de différents gènes dont FBOX22 dans un modèle de lymphocytes en culture et de sang, 2 h et 24 h après irradiation à 2 et 4 Gy ([Kabacik et al., 2011](#)). Cette étude a mis en évidence une induction du gène FBOX22 dès 2 Gy d'irradiation par puce à ADN ([Kabacik et al., 2011](#)).

3.5.1.1.4 Synthèse

L'étude fonctionnelle de ces trois groupes a permis d'identifier des processus biologiques qui sont clairement connus comme étant caractéristiques de la réponse à l'irra-

diation : apoptose, cycle cellulaire, réparation des dommages à l'ADN (Figure 3.5.1). D'après la littérature, l'activation de ces processus nécessite la présence de la protéine P53 (Fei and El-Deiry, 2003). En réponse aux dommages à l'ADN la protéine P53 met en place une régulation transcriptionnelle de gènes cibles codant pour des protéines impliquées dans la phase effectrice de ces différents processus (Figure 3.5.2). En fait, 51%, 83% et 86% des gènes inclus respectivement dans les groupes 1, 2 et 3 sont connus pour avoir un régulation dépendante de p53.

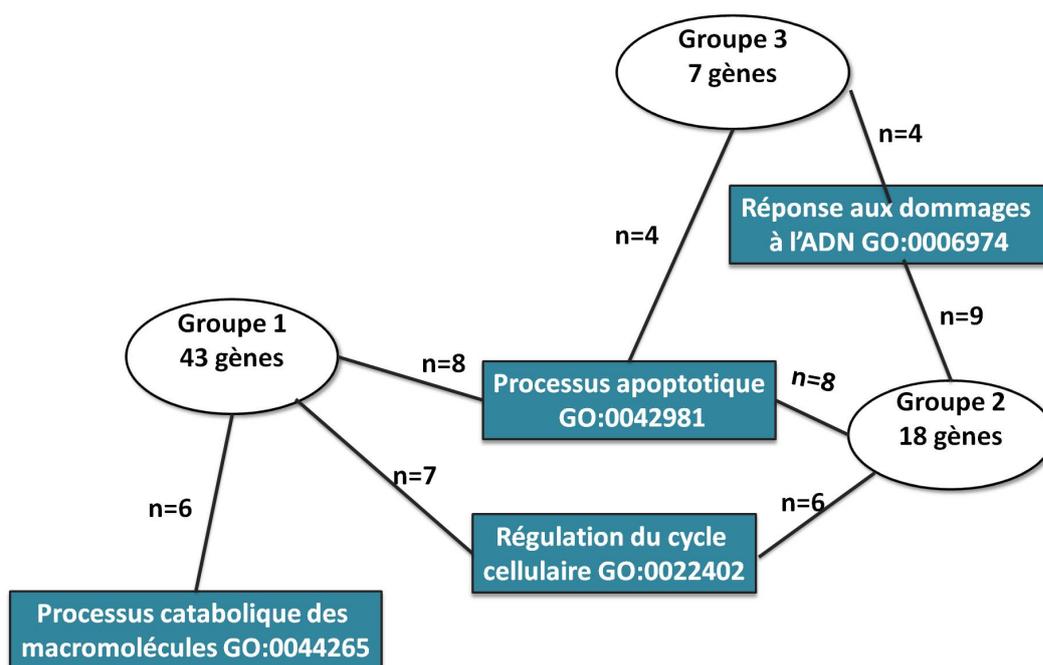
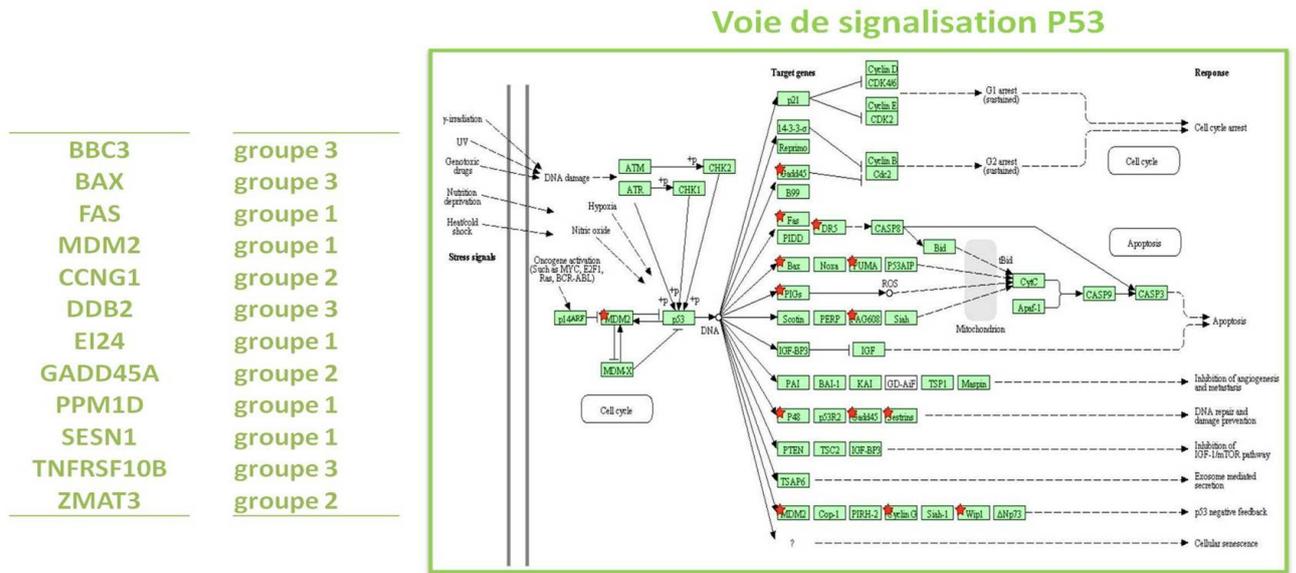


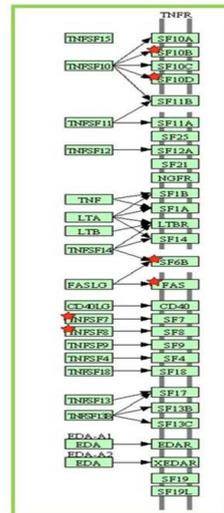
FIGURE 3.5.1: Réseau d'interaction des processus biologiques propres à chaque groupe.

Un autre point commun unissant les résultats de l'analyse fonctionnelle des gènes des groupes 1, 2 et 3 concerne les processus liés à la régulation de la mort cellulaire. Plus particulièrement, six gènes co-régulés codent pour des protéines impliquées dans la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) (Figure 3.5.2). L'annotation dans KEGG pour cette voie de signalisation est significativement enrichie parmi la liste regroupant les gènes des groupes 1, 2 et 3. Les lymphocytes T CD4⁺ dits auxiliaires, ont une fonction régulatrice d'amplification des réponses immunitaires en sécrétant de nombreux

médiateurs appelés cytokines. Ces cytokines sont des substances solubles libérées par les lymphocytes T, elles agissent en tant que médiateurs pour agir à distance sur les autres cellules environnantes. On distingue différentes grandes familles de cytokines dont la famille du facteur de nécrose tumorale ou mort cellulaire (TNF), chaque famille de cytokines se fixe sur des récepteurs membranaires spécifiques. Les TNFR sont des récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée (Nagata, 1997). Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation de caspases (Longthorne and Williams, 1997). Une récente étude a montrée dans un modèle murin que la moelle osseuse irradiée à 4Gy , produit des cytokines pro-inflammatoires apoptotiques FasL et TNF- α capable d'induire l'apoptose *in vitro* des cellules non irradiées de la moelle osseuse par effet bystander (Burr et al., 2010), (Rastogi et al., 2012), (Lorimore et al., 2013).



Récepteurs TNF et cytokines



<p>CD70</p> <p>FAS</p> <p>TNFSF8</p> <p>TNFRSF10B</p> <p>TNFRSF10D</p> <p>RTKL1</p>	<p>groupe 2</p> <p>groupe 1</p> <p>groupe 1</p> <p>groupe 3</p> <p>groupe 2</p> <p>groupe 1</p>
---	---

FIGURE 3.5.2: Potentielles voie de signalisation modulées en réponse aux faibles doses. (Source : Kegg)

3.5.1.2 Gènes modulés de manière similaire pour l'ensemble des doses

3.5.1.2.1 Sur-expression

Les catégories fonctionnelles enrichies dans le groupe 4 qui nous semblent pertinentes dans cette analyse sont présentées dans le Tableau 3.5.4.

Profil moyen groupe 4 (199 gènes)	Numéro GO	Fonction cellulaire	P-valeur	Nombre de gènes annotés	Nom des gènes
	GO:0019637	processus métabolique organophosphate	2,94E-02	18	TGFB1,DCXR,ISYNA1,RAB4B,SMPD1,RUVBL2,ATP6,DNM1,SPHK1,PGD,PGAM1,PLD3,IDH3G,PKM,VAC14,MGAT1,GNL3L,ATP1A4
	GO:0016192	transport vésiculaire	2,12E-02	18	TGFB1,RAB4B,CYTH1,TLN1,CYTH2,USP20,ERGIC3,CPNE1,LDLRAP1,DNM1,DBNL,PSD4,MYO1E,NR1H2,LRP4,LRP2,FLNA,SYTL1
	GO:0016568	modification de la chromatine	1,48E-03	12	JHDM1D,TGFB1,SMARCD2,RNF40,CHD8,RUVBL2,PKN1,RNF2,CXXC1,BAZ1B,APBB1,HIRA
	GO:0055114	Processus d'oxydo réduction	2,59E-03	14	DCXR,ND3,ND2,ND5,ND1,COX3,CYTB,ATP6,PGD,PGAM1,MICAL1,SLC25A6,UCP2,IDH3G
	GO:0045333	respiration cellulaire	2,34E-05	9	ND3,ND2,ND5,ND1,COX3,CYTB,ATP6,UCP2,IDH3G

TABLEAU 3.5.4: Processus biologiques du groupe 4

Parmi celles-ci, on peut noter la présence de gènes liés à la structure de la chromatine. On peut également noter dans ce groupe la présence de 10 gènes d'histones (9 codant pour l'histone H1 et 1 pour l'histone H2). Le lien qui unie généralement la structure de la chromatine aux rayonnements ionisants est l'endommagement de la molécule d'ADN (Karagiannis and El-Osta, 2007). Notre étude montre que l'amplitude de modulation des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine est similaire pour l'ensemble des doses. Ainsi, l'observation d'une modulation significative pour ces gènes à une dose inférieure à 25 mGy semble indiquer une certaine indépendance entre le processus identifié et les dommages à l'ADN. Le deuxième processus remarquable concerne les fonctions biologiques liés à la mitochondrie : respiration cellulaire et production d'ATP. La Figure 3.5.3 illustre les liens des complexes enzymatiques impliqués dans la phosphorylation oxydative et les protéines pour lesquelles nous avons observé une modulation d'expres-

phosphate (ATP) et du potentiel membranaire mitochondriale après irradiation, tandis que la masse mitochondriale et les niveaux d'ADN mitochondrial ne sont pas affectés. Nos observations semblent fournir de nouvelles information sur un potentiel effet des faibles et très faibles doses sur la régulation des gènes nécessaires pour les processus mitochondriaux. Il serait intéressant de réaliser des expérimentations dans notre modèle afin de corréliser ces modulations d'expression et l'activité mitochondriale pour confirmer que ces deux processus sont bien liés. Aucune annotation fonctionnelle n'a été significativement identifiée dans la liste des gènes du groupe 5 et 6.

3.5.1.2.2 Répression

Les catégories fonctionnelles enrichies dans le groupe 7 sont répertoriées dans le Tableau 3.5.5. Quelque soit la dose, nos résultats semblent indiquer une régulation négative de l'expression des gènes dont les protéines sont impliquées dans les processus de biosynthèse des macromolécules et de réponse aux protéines topologiquement incorrectes. Aucune régulation négative de ces processus n'a été décrit à ce jour dans la réponse aux radiations ionisantes.

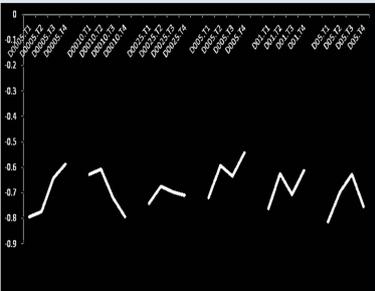
Profil moyen groupe 7 (47 gènes)	Numéro GO	Fonction cellulaire	P-valeur	Nombre de gènes annotés	Nom des gènes
	GO:0010557	Régulation positive des processus de biosynthèse des macromolécules	5,45E-04	10	TAF2,CAND1,RORB,HSPH1,ING5,ZNF423,IFI16,TFAM,EIF2AK3,GABPA
	GO:0010605	Régulation négative des processus de biosynthèse des macromolécules	5,74E-04	9	TXNIP,TRAT1,ZNF423,STAG2,BCOR,IFI16,EIF2AK3,NDFIP2,GABPA
	GO:0035966	Réponse aux protéines topologiquement incorrectes	2,43E-05	5	HSPH1,UBXN4,EIF2AK3,ATF6B,ATXN3

TABLEAU 3.5.5: Processus biologiques du groupe 7

3.5.1.3 Discussion sur l'analyse fonctionnelle

Au final, des fonctions spécifiques ont pu être associées aux deux grands types de profils mis en évidence au chapitre précédent (Figure 3.5.4). Les fonctions biologiques comme la régulation de la mort cellulaire, la réponse aux dommages l'ADN et la ré-

gulation du cycle cellulaire sont des processus qui semblent être activés à partir d'un certain seuil d'exposition aux radiations ionisantes. De plus, l'amplitude de ces réponses augmente avec la dose. Si l'on considère que le nombre de cassures double-brin à l'ADN induite par Gy de rayonnement γ est compris entre 20 et 40 par cellule ([Rothkamm and Löbrich, 2003](#)), à 5 mGy, nous pouvons nous attendre à observer une cassure dans une ou deux cellules sur dix. Ainsi, l'absence de gènes modulés liés à P53 observé dans notre étude à 5 mGy, semble indiquer que le niveau des dommages n'est pas suffisant pour activer une réponse cellulaire dépendante des cassures double-brin. Cette hypothèse est supportée également par la littérature et plus particulièrement par les observations de Suzuki *et al* ([Suzuki et al., 2001](#)) qui n'a pas observé de phosphorylation ou d'accumulation de p53 à des doses inférieures à 100 mGy.

D'autre part, les processus mis en évidence à toutes les doses incluant la plus faible dose testée de 5 mGy, sont des fonctions liées à la régulation de la fonction mitochondriale et l'organisation de la structure de l'ADN. De façon remarquable, l'amplitude de l'activation de ces processus semble être la même quelque soit la dose testée.

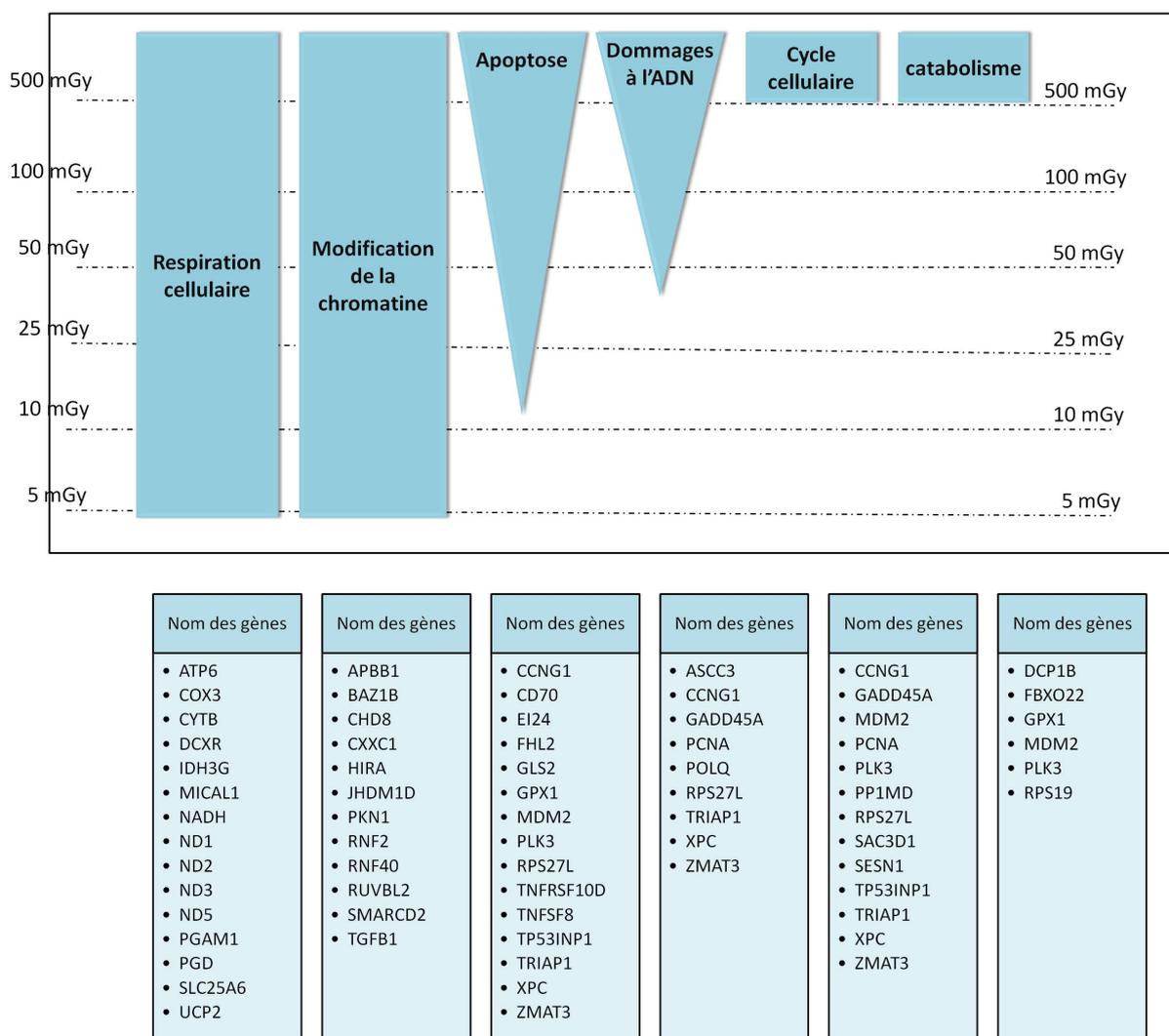


FIGURE 3.5.4: Synthèse des principaux processus biologiques modulés en réponse aux faibles doses.

Les études fonctionnelles basent leur analyse sur l'hypothèse que la modulation de l'expression d'un gène implique l'augmentation de l'activité des protéines pour laquelle il code. Or l'activation des produits des gènes modulés n'a pas été explorée dans cette étude. L'interprétation fonctionnelle sur les gènes modulés doit donc être considérée avec juste mesure. De plus, elle n'est basée que sur les fonctions connues à ce jour et annotées dans les bases de données. Néanmoins, ces approches fonctionnelles se basant

uniquement sur les fonctions connues et annotées restent de bons outils d'interprétation pour générer des hypothèses biologique. Mise à jour régulièrement, les bases de données d'annotation évoluent et dans un futur proche de nouvelles fonctions et annotations pourraient permettre d'identifier à partir de nos données, de nouveaux processus mis en jeu dans la réponse aux faibles doses.

3.5.2 Régulateurs de l'expression des gènes

Afin de pouvoir aborder la question de la régulation transcriptionnelle des différentes listes de gènes co-exprimés, nous avons étudié l'enrichissement d'une annotation de sites consensus de fixation de facteur de transcription pour chaque groupe. Le but étant de formuler des hypothèses sur les acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans les modulations d'expression observées en réponse à l'irradiation.

L'outil bio-informatique ToppGene est utilisé pour cette analyse *in-silico*. Il fait appel dans ce cas à une base de donnée d'annotation GSEA/MSig¹ composée de 615 motifs spécifiques de site de fixation de facteur de transcription annotés dans les régions promotrices [-2kb ; 2kb] de 9770 gènes humains. Le test de distribution hypergéométrie est utilisé comme méthode standard pour déterminer la significativité statistique (P valeur) de l'enrichissement fonctionnelle dans une liste de gènes d'intérêt.

3.5.2.1 Analyse des groupes de gènes surrexprimé différentiellement avec la dose

Le Tableau 3.5.6 liste les sites consensus significativement enrichie dans les groupes 1, 2 et 3. Parmi les facteurs de transcription potentiellement impliqués, on remarque la présence de P53, GATA et EGR1 et E2F.

Des séquences consensus V\$P53_02 et V\$P53_DECAMER_Q2 sont trouvées annotées significativement dans 19 % des promoteurs géniques du groupe 1 (Tableau 3.5.6).

1. <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>

Ce résultat était attendu car beaucoup de gènes du groupe 1 sont connus comme étant des cibles du facteur de transcription P53. L'activation du facteur de transcription P53 est largement connu en réponse à une exposition aux radiations ionisantes, et les principales études décrivent son activation pour des doses allant de 0.1 à 20 Gy ([Zhan et al., 1993](#)), ([Suzuki et al., 2001](#)).

Trois gènes possédant un site de fixation du facteur de transcription EGR1 ont été identifiés. L'activation du facteur de transcription EGR1 est connu en réponse à l'irradiation et a été mis en évidence dans des cellules de mélanome humaine à 5 et 20 Gy dès 30 minutes post-irradiation ([Venkatasubbarao, 1996](#)). Une autre étude a mis en évidence l'activation du promoteur EGR1 en réponse à une dose de 4 Gy de radiation ionisantes dans des cellules de gliome ([Meyer et al., 2002](#)).

Le facteur de transcription GATA-1 est aussi susceptible d'intervenir dans la réponse à l'irradiation. Ce facteur de transcription a attiré notre attention car il fait partie de la famille des facteurs GATA ([Ko and Engel, 1993](#)). Or, dans cette famille le facteur GATA-3 a été décrit activé en réponse à l'irradiation dans des kératinocytes à 100 mGy ([Bonin et al., 2009](#)). Cependant, à ce jour aucune étude ne décrit une implication de GATA-1 dans la réponse à l'irradiation.

Des facteurs de transcription E2F sont aussi susceptibles d'intervenir en réponse à l'irradiation. Ces facteurs de transcription jouent un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire. Le gène codant pour le facteur de transcription E2F-1 a été décrit activé en réponse à l'irradiation à 5 Gy dans divers lignées cellulaires ([Blattner et al., 1999](#)). Les autres facteurs de transcription listés dans le Tableau 3.5.6 ne sont à ce jour pas décrit comme étant impliqués dans la réponse à l'irradiation.

	Séquence consensus	Facteur de transcription	P-valeur	Nombre de gènes	Nom des gènes annotés
Groupe 1	RTAAACA_V\$FREAC2_01	FOXF2	1.22E-03	7	MDM2,PAPPA,NEO1,GPX1,EI24,FHL2,PPM1D
	V\$P53_02	P53	1.29E-03	4	MDM2,GPX1,EI24,RPS19
	V\$P53_DECAMER_Q2	P53	1.43E-03	4	MDM2,EI24,RPS19,PPM1D
	V\$CART1_01	Cart-1	8.43E-03	3	PAPPA,GPX1,RPS19
	V\$E2F_Q6_01	E2F	8.82E-03	3	PEG3,RPS19,PPM1D
	V\$E2F_Q4_01	E2F	8.95E-03	3	PEG3,RPS19,PPM1D
	V\$HFH1_01	HFH-1	1.06E-02	3	NEO1,GPX1,PPM1D
	V\$TBP_01	TBP	1.17E-02	3	MGAT3,RPS19,FHL2
	V\$AP1_Q6	AP-1	1.36E-02	3	PAPPA,GPX1,PTP4A1
	V\$CRX_Q4	Crx	1.47E-02	3	NEO1,GPX1,MOCOS
	V\$EGR_Q6	Egr-1	1.48E-02	3	RELB,RGL1,PPM1D
	YGTCTTGR_UNKNOWN	Unknown	1.50E-02	2	RGL1,FHL2
	V\$GATA1_05	GATA-1	1.59E-02	3	PAPPA,NEO1,GPX1
	RCGCANGCGY_V\$NRF1_Q6	NRF1	1.62E-02	5	RGL1,SESN1,GSS,TMEM30A,PPM1D
	GCGNNANTTCC_UNKNOWN	Unknown	2.07E-02	2	FBXO22,ZNF79
TATAAA_V\$TATA_01	TBP	3.42E-02	6	PEG3,PAPPA,GPX1,MGAT3,RPS19,FHL2	
V\$FOXJ2_01	FOXJ2	4.97E-02	2	NEO1,PPM1D	
Groupe 2	V\$CMYB_01	c-Myb	7.56E-03	2	POLH,IER5
	V\$GFI1_01	Gfi-1	9.75E-03	2	GADD45A,POLH
	CGGAARNGGCNG_UNKNOWN	Unknown	2.55E-02	1	POLH
	CTGRYYYYNATT_UNKNOWN	Unknown	3.74E-02	1	GADD45A
Groupe 3	KTGGYRSGAA_UNKNOWN	Unknown	2.23E-02	1	DDB2
	GATTGGY_V\$NFIY_Q6_01	NF-YB	4.55E-02	2	PHPT1,FDXR
	V\$AHRANT_01	AhR	4.67E-02	1	PHPT1

TABLEAU 3.5.6: Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 1, 2 et 3

3.5.2.2 Analyse des groupes de gènes modulés de manière similaire pour l'ensemble des doses.

3.5.2.2.1 Surexpressions

Le Tableau 3.5.7 présente les sites consensus significativement enrichis dans le groupe 4.

3.5.2. Régulateurs de l'expression des gènes

Séquence consensus	Facteur de transcription	P-valeur	Nombre de gènes	Nom des gènes annotés
V\$MAZR_01	MAZR	3.54E-04	8	MAGED2,BAI2,FKBP2,FXR2,PRRC2A,FUS,UBA1,ZNF513
V\$SP1_01	SP1	5.96E-04	8	MAGED2,HNRNPA2B1,EGLN2,ECE1,FXR2,NAGK,IDH3G,BCL11B
V\$LFA1_Q6	LFA1	6.16E-04	8	RAB4B,SMARCD2,FKBP2,CPNE1,HIRA,BCL11B,PLEC,ZNF513
KRCTCNMANNMANAGC_UNKNOWN	Unknown	2.65E-03	4	HIST1H3G,HIST1H3H,HIST1H4A,HIST1H3B
V\$AP2_Q6	AP2	2.99E-03	7	TLN1,CYTH2,SMARCD2,CENPB,FMNL1,FXR2,ZNF513
SCGGAAGY_V\$ELK1_02	ELK1	3.21E-03	17	SLC25A1,RAB4B,TNKS2,MAGED2,CD2BP2,CXXC1,STIM1,NR1H2,NUDC,LRP10,NAGK,APEH,UBA1,HIRA,CSTF3,ZNF513,CDK13
GGGNRMNNYCAT_UNKNOWN	Unknown	3.35E-03	4	BAI2,MKL1,CSTF3,MRPL38
GGGTGRR_V\$PAX4_03	PAX4	5.06E-03	19	TLN1,MAGED2,BAI2,CD2BP2,HNRNPA2B1,SPHK1,FMNL1,EGLN2,MYO1C,LRP2,CA11,MKL1,MAN2B1,UBA1,SPTAN1,PLEC,ZNF513,ARHGFE1,PTPN6
CRGAARNNNCGA_UNKNOWN	Unknown	5.13E-03	3	TLN1,SPTAN1,BCL11B
V\$MIF1_01	MIF1	8.67E-03	5	CYTH2,PRKCSH,MYO1C,LRP2,SPTAN1
RCGCANGCY_V\$NRF1_Q6	NRF1	8.74E-03	13	ILVBL,TNKS2,MAGED2,FKBP2,RNF40,CPNE1,EGLN2,FAM134C,CAPNS1,MRPL30,FXR2,FUS,IDH3G
V\$NFMUE1_Q6	NFMUE1	1.04E-02	6	TNKS2,PRKCSH,CPNE1,APBB1,BCL11B,MRPL38
V\$NGFIC_01	NGFIC	1.11E-02	6	FKBP2,EGLN2,LRP10,CA11,FUS,BCL11B
GCCATNTTG_V\$YY1_Q6	YY1	1.27E-02	8	RAB4B,PRKCSH,CPNE1,AKAP8L,APBB1,FUS,UBA1,IDH3G
V\$HNF4_Q6	HNF4	1.36E-02	6	ILVBL,TGFB1,TLE1,FKBP2,RNF40,ZNF513
V\$MTF1_Q4	MTF1	1.52E-02	6	TNKS2,C19orf68,MAGED2,DNM1,FMNL1,PLEC
V\$PAX4_03	PAX4	1.59E-02	6	TGFB1,TLN1,HNRNPA2B1,LRP2,MAN2B1,SPTAN1
V\$ARNT_01	ARNT	1.69E-02	6	EGLN2,MGC13053,NUDC,UBA1,HIRA,BCL11B
GTGACGY_V\$E4F1_Q6	E4F1	1.94E-02	10	TNKS2,BAP1,RNF40,HIST1H4H,HIST1H4E,HIST1H4A,NR1H2,CSTF3,IDH3G,BCL11B
TTTNNANAGCYR_UNKNOWN	Unknown	2.81E-02	4	CPNE1,HIST1H3H,HIST1H4A,HIST1H3B
V\$NRF1_Q6	NRF1	2.90E-02	5	TNKS2,MAGED2,FAM134C,FXR2,FUS
V\$PAX3_B	PAX3	3.22E-02	3	PRRC2A,BCL11B,PLEC
V\$VDR_Q3	VDR	3.27E-02	5	TGFB1,FKBP2,EGLN2,BCL11B,ZNF513
V\$E2F1_Q6_01	E2F1	3.41E-02	5	SLC25A1,NUMA1,MGC13053,FXR2,HIRA
V\$E2F1_Q4	E2F1	3.41E-02	5	PRKCSH,HNRNPA2B1,CXXC1,UBA1,ZNF513
V\$E2F4DP1_01	E2F4DP1	3.41E-02	5	C19orf68,HNRNPA2B1,HIST1H4A,MGC13053,HIRA
V\$POU1F1_Q6	POU1F1b	3.47E-02	5	CPNE1,FMNL1,MYO1C,CYFIP2,APBB1
V\$E2F_03	E2F	3.54E-02	5	C19orf68,CENPB,PRKCSH,EGLN2,FUS
V\$MZF1_02	MZF1	3.54E-02	5	TGFB1,HNRNPA2B1,PRRC2A,BCL11B,CDK13
V\$SCP2_02	CP2	3.61E-02	5	TLN1,FKBP2,CPNE1,UBA1,BCL11B
V\$NRF2_01	NRF2	3.68E-02	5	TNKS2,CD2BP2,PRKCSH,NR1H2,UBA1
V\$MYOD_Q6_01	MYOD	3.82E-02	5	CPNE1,FMNL1,APBB1,SPTAN1,PLEC
TTCYNRGAA_V\$STAT5B_01	STAT5B	4.11E-02	6	SMPD1,CPNE1,PSMD3,FLT3LG,ZYX,PLEC
V\$E47_02	E47	4.11E-02	5	CPNE1,PSMD3,MKL1,MGAT1,PLEC
TGCGCANK_UNKNOWN	Unknown	4.11E-02	8	TNKS2,MAGED2,FKBP2,HNRNPA2B1,DNM1,FAM134C,FXR2,CA11
V\$E2F1_Q3_01	E2F1	4.18E-02	5	CYTH2,CENPB,FKBP2,FXR2,IDH3G
V\$SPZ1_01	Spz1	4.33E-02	5	MAGED2,CPNE1,MYO1C,HIRA,ZNF513
V\$STAT5A_01	STAT5A	4.41E-02	5	SMPD1,CPNE1,PSMD3,APBB1,ZYX
V\$AP2_Q3	AP-2gamma	4.73E-02	5	TGFB1,TLN1,FXR2,HIRA,BCL11B
V\$AP4_01	AP-4	4.73E-02	5	BAI2,PSMD3,NR1H2,FLT3LG,PLEC

TABLEAU 3.5.7: Séquences consensus de facteur de transcription enrichies dans la liste des gènes du groupe 4.

Parmi l'ensemble des facteurs de transcription mis en évidence on remarque la présence de deux classes de facteur de transcription :

- NRF1, NRF2

– Elk-1

La première classe de facteurs de transcription (NRF1, NRF2) est connue pour être impliquée dans le contrôle nucléaire de la respiration mitochondriale, la biosynthèse de l'hème, la transcription de l'ADN mitochondriale et la réplication. Cela semble concordant avec la présence de 20 gènes correspondant à des protéines liées directement à la fonction mitochondriale parmi les 199 gènes présents dans le groupe 4.

La seconde classe de facteur de transcription (Elk-1) identifié est liée aux facteurs ETS. La famille des facteurs ETS a été définie par la présence dans ces protéines d'un domaine ETS conservé. Ces facteurs peuvent agir comme des activateurs ou des répresseurs de transcription ([Sharrocks, 2001](#)). Le facteur de transcription Elk-1 est l'un des membres de la famille des facteurs ETS et est une cible de la voie des MAPK ([Edmunds and Mahadevan, 2004](#)). Une étude a observé par une approche protéomique, que Elk-1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, seraient des candidats potentiels pour des biomarqueurs en matière d'exposition à des doses en dessous de 100 mGy ([Marchetti et al., 2006](#)). Plus précisément Suzuki *et al* ([Suzuki et al., 2001](#)) montrent que des doses comprises entre 50 mGy et 20 mGy sont capable d'induire la phosphorylation de MAPK3 et MAPK1 (alias respectifs de ERK1 et ERK2) aussi efficacement que des doses élevées, alors que le niveau de la protéine p53 n'a pas été modifié à des doses inférieures à 500 mGy. Ces observations semblent être en accord avec nos résultats.

Le Tableau 3.5.8 montre les facteurs identifiés pour les groupes 5 et 6. Cependant, aucun n'est connu pour être activé par les radiations ionisantes.

	Séquence consensus	Facteur de transcription	P-valeur	Nombre de gènes	Nom des gènes annotés
Groupe 5	CATTGTYT_V\$SOX9_B1	SOX 9	8.33E-04	4	SEMA6C,HAPLN2,SUN2,MEX3D
	V\$SOX5_01	SOX 5	3.78E-03	3	FOXB1,SEMA6C,HAPLN2
	YATGNWAAT_V\$OCT_C	OCT	1.03E-02	3	FOXB1,BST2,SEMA6C
	V\$HNF3B_01	HNF-3B	3.00E-02	2	FOXB1,SCARF2
	V\$SOX9_B1	SOX 9	3.41E-02	2	SEMA6C,MEX3D
	V\$SMAD3_Q6	SMAD-3	3.44E-02	2	FOXB1,HAPLN2
	V\$HMG1Y_Q6	HMG I(Y)	3.48E-02	2	FOXB1,HAPLN2
	V\$CHX10_01	Chx10	3.51E-02	2	FOXB1,SEMA6C
	V\$SR_Y_02	Sry	3.64E-02	2	FOXB1,SEMA6C
	V\$NKX62_Q2	NKX6B	3.64E-02	2	FOXB1,MAFA
	V\$SMAD4_Q6	SMAD-4	3.68E-02	2	AVP,FOXB1
	V\$LMO2COM_01	Lmo2	3.74E-02	2	HAPLN2,CCNL2
	V\$TAL1BETAIF2_01	Tal-1beta	3.91E-02	2	FOXB1,SCARF2
	V\$STAT6_01	STAT6	3.95E-02	2	FOXB1,GPR150
	V\$T3R_Q6	RAR-alpha:RXR-gamma	4.09E-02	2	SEMA6C,HAPLN2
V\$OCT_C	NF-A	4.30E-02	2	BST2,SEMA6C	
V\$GFI1_01	Gfi-1	4.34E-02	2	AVP,MEX3D	
Groupe 6	V\$VDR_Q6	VDR	6.34E-03	2	PCSK1N,ZNF205
	GCANCTGNY_V\$MYOD_Q6	MyoD	6.76E-03	3	FZD9,PCSK1N,ZNF205
	V\$LXR_Q3	LXR-beta:RXR-alpha	3.57E-02	1	PCSK1N
	WCTCNATGGY_UNKNOWN	Unknown	3.63E-02	1	PCSK1N
	RNCTGNYNRCTGNY_UNKNOWN	Unknown	3.75E-02	1	FZD9

TABLEAU 3.5.8: Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 5 et 6.

3.5.2.2.2 Répressions

Le Tableau 3.5.9 liste les séquences consensus identifiées pour le groupe 7. Parmi les facteurs de transcription correspondants, on peut souligner la présence de Elk1 venant appuyer les observations déjà réalisées lors de l'analyse du groupe 4 sur l'implication des MAPK dans la réponse aux faibles doses de radiations ionisantes. On peut noter également l'annotation de sites consensus spécifiques du facteur Myc (Tableau 3.5.9). L'activation de Myc donne lieu à de nombreux effets biologiques comme la prolifération cellulaire et l'apoptose (Dang, 1999). L'activation de Myc est connue en réponse à l'irradiation (Sheen and Dickson, 2002).

Séquence consensus	Facteur de transcription	P-valeur	Nombre de gènes	Nom des gènes annotés
YTAATTAA_V\$LHX3_01	Lhx3b	3.77E-04	4	RORB, OSBPL8, ZNF423, ADAM11
YCATTAA_UNKNOWN	Unknown	5.49E-04	6	TAF2, RORB, ZNF423, BCOR, NPM3, GBF1
TAATTA_V\$CHX10_01	ChX10	5.81E-04	7	STXBP3, RORB, OSBPL8, ZNF423, STAG2, IFI16, ADAM11
V\$CDC5_01	Cdc5	1.43E-03	4	RORB, ARRDC3, STAG2, BCOR
CATRRAGC_UNKNOWN	Unknown	1.83E-03	3	RORB, ZNF423, BCOR
V\$IRF_Q6	IRF	9.35E-03	3	RORB, STAG2, BCOR
V\$POU1F1_Q6	POU1F1b	9.63E-03	3	RORB, ZNF423, NPM3
V\$LHX3_01	Lhx3b	9.77E-03	3	TAF2, RORB, ADAM11
V\$HSF2_01	HSF2	1.06E-02	3	HSPH1, STAG2, HERC4
V\$S8_01	S8	1.23E-02	3	RORB, ZNF423, ADAM11
AAAYWAACM_V\$HFH4_01	HFH4	1.25E-02	3	STAG2, BCOR, ADAM11
V\$NFY_Q6_01	NFY	1.26E-02	3	TXNIP, EIF2AK3, ATF6B
V\$NFY_Q6	NFY	1.28E-02	3	TXNIP, ARRDC3, ATF6B
V\$HNF1_Q6	HNF1	1.31E-02	3	RORB, STAG2, ADAM11
V\$CDP_01	CUTL1	1.33E-02	2	HERC4, ADAM11
V\$MYCMAX_02	MYCMAX	1.45E-02	3	HSPH1, ARRDC3, BCOR
GATTGGY_V\$NFY_Q6_01	NFY	1.60E-02	6	TXNIP, ING5, ARRDC3, STAG2, EIF2AK3, GBF1
TTCYRGAA_UNKNOWN	Unknown	1.82E-02	3	HSPH1, STAG2, BCOR
WGTTNNNNNAAA_UNKNOWN	Unknown	1.96E-02	4	ZNF423, STAG2, BCOR, ADAM11
V\$STAT5A_02	STAT5A	2.77E-02	2	ZNF423, GABPA
TTANTCA_UNKNOWN	Unknown	2.92E-02	5	RORB, HSPH1, ZNF423, STAG2, ADAM11
TTCNRGNNTTC_V\$HSF_Q6	HSF	3.05E-02	2	HSPH1, STAG2
TATAAA_V\$TATA_01	TBP	3.42E-02	6	RORB, OSBPL8, ARRDC3, ZNF423, STAG2, ADAM11
V\$PAX5_01	PAX5	3.55E-02	2	STAG2, BCOR
V\$NKX22_01	NKX22	4.74E-02	2	ZNF423, STAG2
SCGGAAGY_V\$ELK1_02	ELK1	4.85E-02	5	HSPH1, STAG2, ATF6B, TGDS, HERC4
V\$HSF_Q6	HSF	4.92E-02	2	HSPH1, STAG2
RGAANNTTC_V\$HSF1_01	HSF1	4.92E-02	3	RORB, HSPH1, STAG2

TABLEAU 3.5.9: Séquences consensus de facteur de transcription enrichies par la liste des gènes du groupe 7.

Nous avons cherché des annotations de microARN au niveau des 47 gènes réprimés constituant le groupe des répressions. ToppGene fait appel à une base d'annotation des microARN, Msig², composée de 221 motifs de fixation de micro ARN. Cette base de donnée propose des sites de fixation au niveau des régions 3' UTR des gènes susceptibles de se lier avec des micro ARN. Des annotations de séquences consensus pour la fixation de micro ARN sont enrichies dans la liste des 47 gènes du groupe 7 (Figure 3.5.5). Ces micro ARN (miR374, miR382, miR412 et miR607) susceptibles d'intervenir dans la répression des gènes du groupe 7 ne sont pas connus en réponse à l'irradiation et leur

2. <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>

implication reste à être confirmée.

Les micro ARN sont des régulateurs capable de provoquer la dégradation d'ARNm en réponse à un stress. Le micro ARN le plus étudié en réponse aux dommages à l'ADN est miR-34a dont l'induction est dépendante du facteur de transcription P53 (Chang *et al.*, 2007). Ce micro ARN est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose après des dommages à l'ADN. Les micro ARN de la famille let-7 sont également connus pour être induits en réponse aux radiations ionisantes (Chaudhry *et al.*, 2012). Chaudry *et al* ont pu mettre en évidence une induction de micro ARN de la famille let-7 à 100 mGy dans des fibroblastes. Cependant, parmi les études qui ont identifié les microARN en réponse aux radiations, peu ont identifié les gènes cibles et les mécanismes de réponse (Chaudhry *et al.*, 2012).

	ADCY10P1	APH1A	ARRDC3	ATF6B	BCOR	CAND1	EIF2AK3	GABPA	HERC4	HSPH1	IFI16	KIAA1109	NDFIP2	NUPL1	OSBP18	PDIK1L	PNISR	RORB	SCP2	SRSF11	STAG2	UBXN4	ZC3H11A	ZC3H7B	ZNF423	ZNF770
miR-374a						1		1	1	1		1	1		1			1				1		1	1	
miR-374b						1		1	1	1		1	1		1			1				1		1	1	
miR-382	1			1	1		1		1		1	1	1	1			1		1		1					
miR-412		1	1											1		1					1					
miR-607			1			1		1				1			1	1				1			1		1	1

FIGURE 3.5.5: Matrice de synthèse des annotations de micro ARN enrichies avec leur gènes annotés (groupe 7).

3.5.2.3 Analyse des régulateurs sur l'ensemble des 2745 gènes et synthèse

Dans une première étape, nous avons réalisée une analyse des annotations de sites de fixation de facteurs de transcription sur les gènes contenus dans les sept groupes de profils isolés au Chapitre 4. Cette approche avait pour objectif d'identifier de potentiels régulateurs spécifiques des profils d'expression identifiés. Elle a permis ainsi d'identifier

pour le groupe 4, l'intervention de régulateurs liés à la fonction mitochondriale et de régulateurs cibles de la voie des MAP kinases. Cependant, compte tenu du faible nombre de gènes dans certains groupes et d'annotations loin d'être exhaustives dans la base de donnée GSEA/MSIG³, la puissance statistique de l'analyse groupe par groupe s'est révélée limitée. C'est dans le but d'enrichir cette étude, que nous avons réalisé l'analyse *in silico* des sites de liaison de facteur de transcription sur l'ensemble des 2745 gènes identifiés comme modulés dans au moins une des 24 conditions étudiées. Un total de 50 sites consensus ont été identifiés (Tableau 3.5.6). Parmi eux, les deux même catégories de régulateur se démarquent mais cette fois avec beaucoup plus de significativité statistique. Ainsi, le site consensus SCGGAAGY_V\$ELK1_02 correspond au facteur de transcription Elk-1 et est annoté dans un total de 171 gènes avec un score d'enrichissement de $4.81 \cdot 10^{-8}$. Si l'on cumule l'ensemble des annotations trouvées pour des facteurs de transcription de la famille Ets, on en identifie 295 susceptibles d'être modulés par cette famille en réponse à de faibles doses de radiations ionisantes. Le constat est le même lorsque que l'on étudie les annotations pour le facteur NRF1, NRF2/GABPA et GABPB qui régule la transcription de gènes impliqués dans les processus liés à la mitochondrie. Un total de 246 gènes a été identifié dans notre étude comme présentant un site de fixation pour l'un de ces facteurs de transcription. Cette analyse globale de la réponse aux faibles doses de radiations ionisantes mesurée dans ce travail semble confirmer l'implication de ces deux types de régulateurs. Elle permet de renforcer la nécessité de confirmer, d'explorer leur implication et leur rôle dans cette réponse cellulaire.

3. <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb>

	Séquence consensus	P valeur	Nombre de gènes modulés
1	SCGGAAGY_V\$ELK1_02	4.81E-08	171
2	RCGCANGCGY_V\$NRF1_Q6	2.29E-07	133
3	KRCTCNNNMANAGC_UNKNOW	6.35E-06	22
4	MGGAAGTG_V\$GABP_B	1.57E-04	105
5	V\$TEL2_Q6	3.58E-04	40
6	TGCGCANK_UNKNOW	4.35E-04	79
7	V\$ELK1_02	6.74E-04	41
8	GGAANCGGAANY_UNKNOW	1.02E-03	23
9	ACTAYRNNCCCR_UNKNOW	2.45E-03	61
10	V\$NRF2_01	2.92E-03	40
11	V\$CETS1P54_01	3.53E-03	41
12	V\$NRF1_Q6	5.20E-03	37
13	CGGAARNGGCNG_UNKNOW	5.89E-03	11
14	GTGACGY_V\$E4F1_Q6	6.63E-03	86
15	CRGAARNNNCGA_UNKNOW	7.38E-03	11
16	V\$AP1_Q6	7.63E-03	42
17	TTTNNANAGCYR_UNKNOW	9.15E-03	26
18	V\$P53_DECAMER_Q2	1.07E-02	41
19	GATTGGY_V\$NFY_Q6_01	1.07E-02	145
20	V\$MAZR_01	1.17E-02	36
21	V\$GABP_B	1.17E-02	36
22	V\$EGR3_01	1.30E-02	15
23	GGGTGGRR_V\$PAX4_03	1.45E-02	167
24	V\$ZID_01	1.49E-02	36
25	V\$AP1_Q4_01	1.56E-02	41
26	YGCCTTGR_UNKNOW	1.74E-02	18
27	RYTTCCTG_V\$ETS2_B	1.94E-02	137
28	WCAANNNYCAG_UNKNOW	2.19E-02	36
29	V\$NERF_Q2	2.19E-02	36
30	V\$E2F_Q2	2.24E-02	26
31	V\$MYOD_01	2.24E-02	38
32	V\$P300_01	2.36E-02	36
33	GCGSCMNTT_UNKNOW	2.36E-02	13
34	V\$NFMUE1_Q6	2.53E-02	36
35	V\$E2F1_Q4	2.79E-02	35
36	STTTCRNTT_V\$IRF_Q6	2.93E-02	30
37	V\$AP1_Q2	3.08E-02	41
38	V\$ETF_Q6	3.10E-02	18
39	V\$MZF1_02	3.21E-02	35
40	V\$YY1_01	3.47E-02	37
41	CATRRAGC_UNKNOW	3.74E-02	21
42	V\$E2F1_Q3_01	3.82E-02	36
43	V\$LFA1_Q6	3.82E-02	36
44	V\$AP1_Q6_01	3.83E-02	38
45	V\$ZIC2_01	4.07E-02	36
46	TGASTMAGC_V\$NFE2_01	4.25E-02	30
47	V\$IK3_01	4.30E-02	32
48	V\$E2F1_Q6_01	4.33E-02	34
49	V\$NFAT_Q4_01	4.34E-02	38
50	V\$E2F_Q6_01	4.77E-02	33

FIGURE 3.5.6: Séquences consensus enrichies sur les 2745 gènes modulés.

CHAPITRE 3.6

RECHERCHE D'UN GROUPE DE GÈNES POUR LA DISCRIMINATION D'ÉCHANTILLONS IRRADIÉS AUX FAIBLES DOSES

A partir de notre modèle cellulaire, nous avons dans les chapitres précédents identifié et caractérisé les modulations d'expression génique en fonction de la dose et du temps post-irradiation. Ces principaux résultats ont été utilisés dans le but d'émettre des hypothèses sur les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la réponse de cellules exposées à de faibles doses de rayonnement ionisant. L'objectif de ce chapitre est d'identifier un groupe de gènes permettant avec leur niveau d'expression de classer les conditions expérimentales en fonction de la dose et/ou du temps post-irradiation.

3.6.1 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des 370 gènes modulés

Une classification hiérarchique basée sur les niveaux d'expression mesurés pour 370 gènes (fusion des 7 groupes) a été réalisée. Ces classifications reposent sur les niveaux de dissimilarité de ces 370 profils d'expression sur l'ensemble des conditions testées. Quand deux conditions présentent des niveaux d'expression proches sur l'ensemble des 370 gènes

elles sont regroupées dans la même branches. La Figure (3.6.1) présente le résultat de cette classification. Elle met en évidence deux niveaux de dissimilarité.

Le premier niveau de dissimilarité (1) permet de distinguer pour l'ensemble des doses, temps et individus testés, les échantillons irradiés des échantillons non irradiés. Le deuxième niveau (2) permet de discriminer relativement la dose de 500 mGy de l'ensemble des autres doses. Il n'est pas possible de dissocier les échantillons irradiés en dessous de 100 mGy sur la base de l'expression des 370 gènes d'intérêt. En revanche, cette liste semble très efficace pour distinguer une condition irradiée d'une condition non irradiée dans les dix premières heures qui suivent l'irradiation.

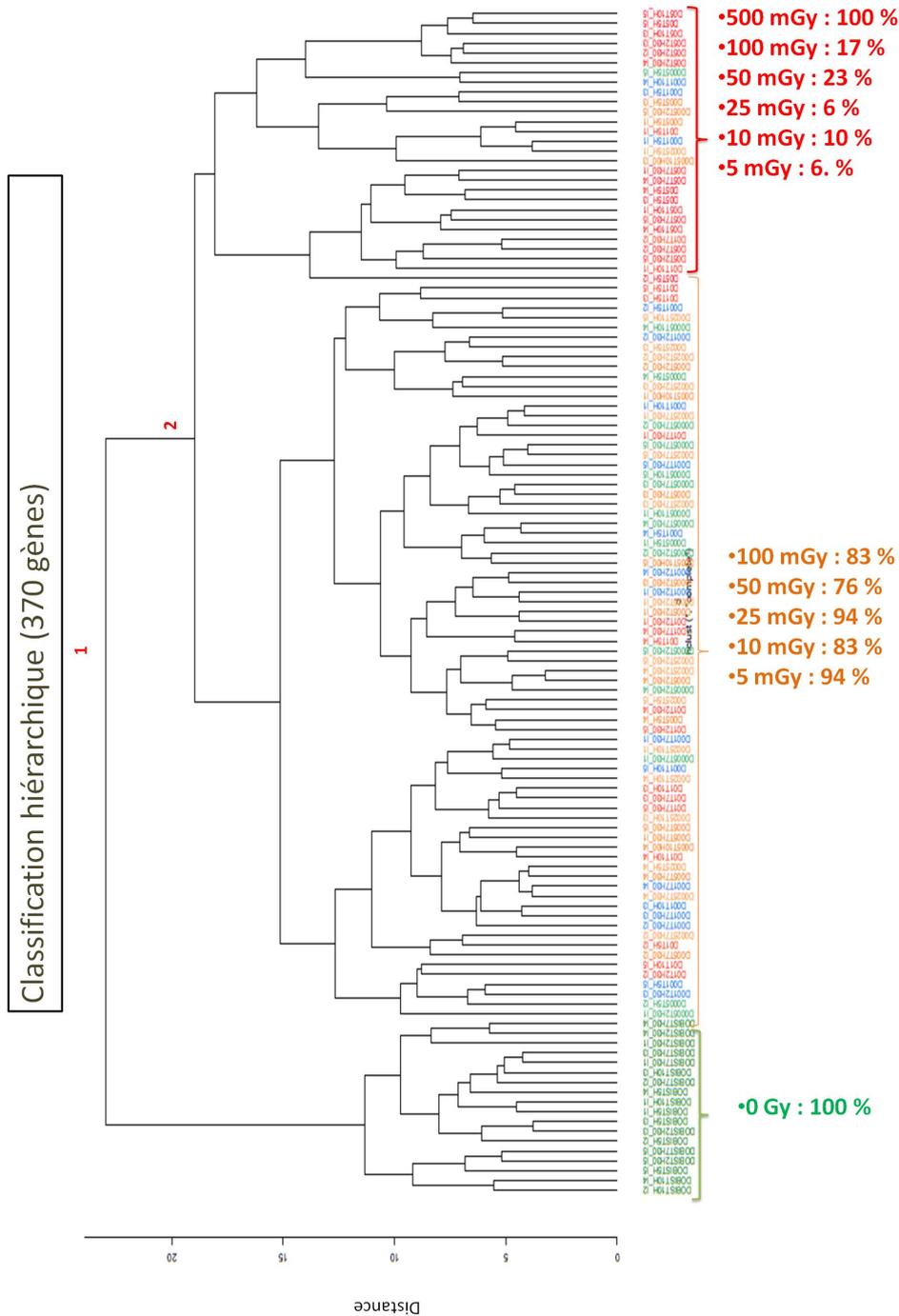


FIGURE 3.6.1: Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des 370 gènes sélectionnés. Il est généré, à l'aide de la fonction Hierclus de « R », à partir des données normalisées et filtrées. Chaque couleur correspond à une dose d'irradiation. Les conditions en rouge correspondent aux conditions 500/100mGy, en orange 50/25mGy, en bleu 10mGy et en vert 5 et 0mGy.

3.6.2 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des gènes des groupes 1, 2 et 3

Dans le but de discriminer plus précisément les échantillons irradiés entre eux, une classification basée sur les profils de type I a été évaluée. En effet, ces gènes possèdent un profil dépendant de la dose d'irradiation avec différents seuils d'activation mais aussi une variabilité inter-individuelle faible. Le résultat de cette classification sur la base de ces 68 gènes est présenté en Figure 3.6.2 . On distingue trois principaux niveaux de dissimilarité. Le premier niveau (1) permet de distinguer clairement les échantillons irradiés à 500 mGy de tous les autres. Les deuxième et troisième niveaux (2) et (3) sont moins performants en termes de discrimination. Cependant, on peut noter une discrimination correcte des échantillons irradiés à 100 mGy à partir de 7h30 après exposition au niveau (2) et des échantillons à 100 mGy de 2h30 à 5h au niveau (3). Avec cette sous sélection de 68 gènes, on est en revanche incapable de distinguer les échantillons non irradiés des échantillons irradiés.

3.6.2. Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des gènes des groupes 1, 2 et 3

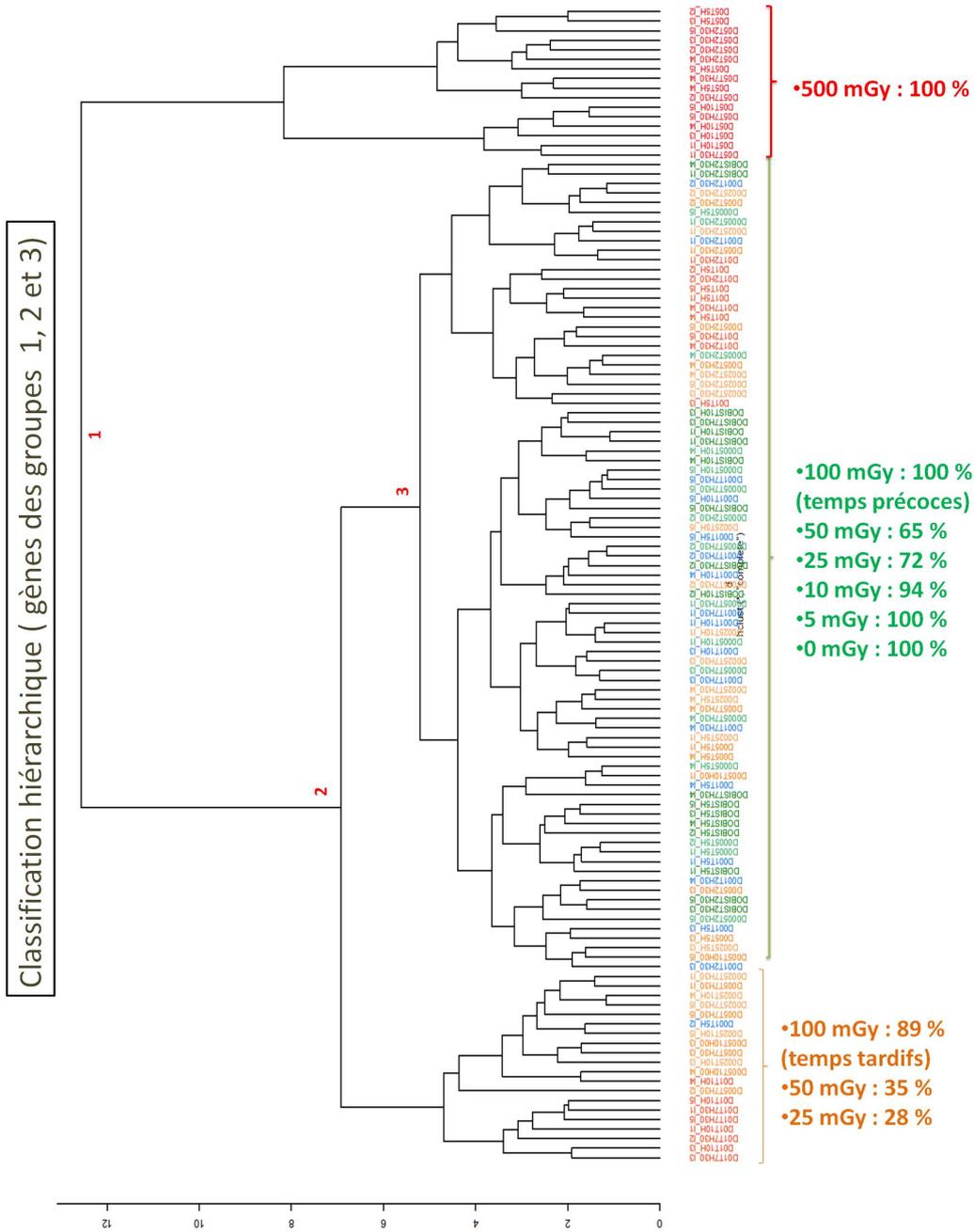


FIGURE 3.6.2: Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des gènes des groupes 1, 2 et 3. Il est généré, à l'aide de la fonction Hierclust de « R », à partir des données normalisées et filtrées. Chaque couleur correspond à une dose d'irradiation. Les conditions en rouge correspondent aux conditions 500/100mGy, en orange 50/25mGy, en bleu 10mGy et en vert 5 et 0mGy.

3.6.3 Classification hiérarchique des échantillons basée sur l'expression des gènes des groupes 3

En raison du faible niveau de dose nécessaire pour induire une modulation significative des gènes du groupe 3, ce dernier a été évalué pour sa capacité à discriminer les échantillons irradiés à très faibles doses. Le résultat de cette classification est présenté en Figure 3.6.3. La classification basée sur l'expression de ce sous-ensemble a mis en évidence deux niveaux de dissimilarité. Le premier permet de distinguer les échantillons irradiés à 500 mGy et 100 mGy à partir de 7h30 de l'ensemble des autres conditions et avec une bonne précision. Le deuxième niveau de discrimination permet d'isoler les échantillons ayant reçu une dose de 25 mGy et plus de tous les échantillons ayant reçu une dose nulle ou inférieure.

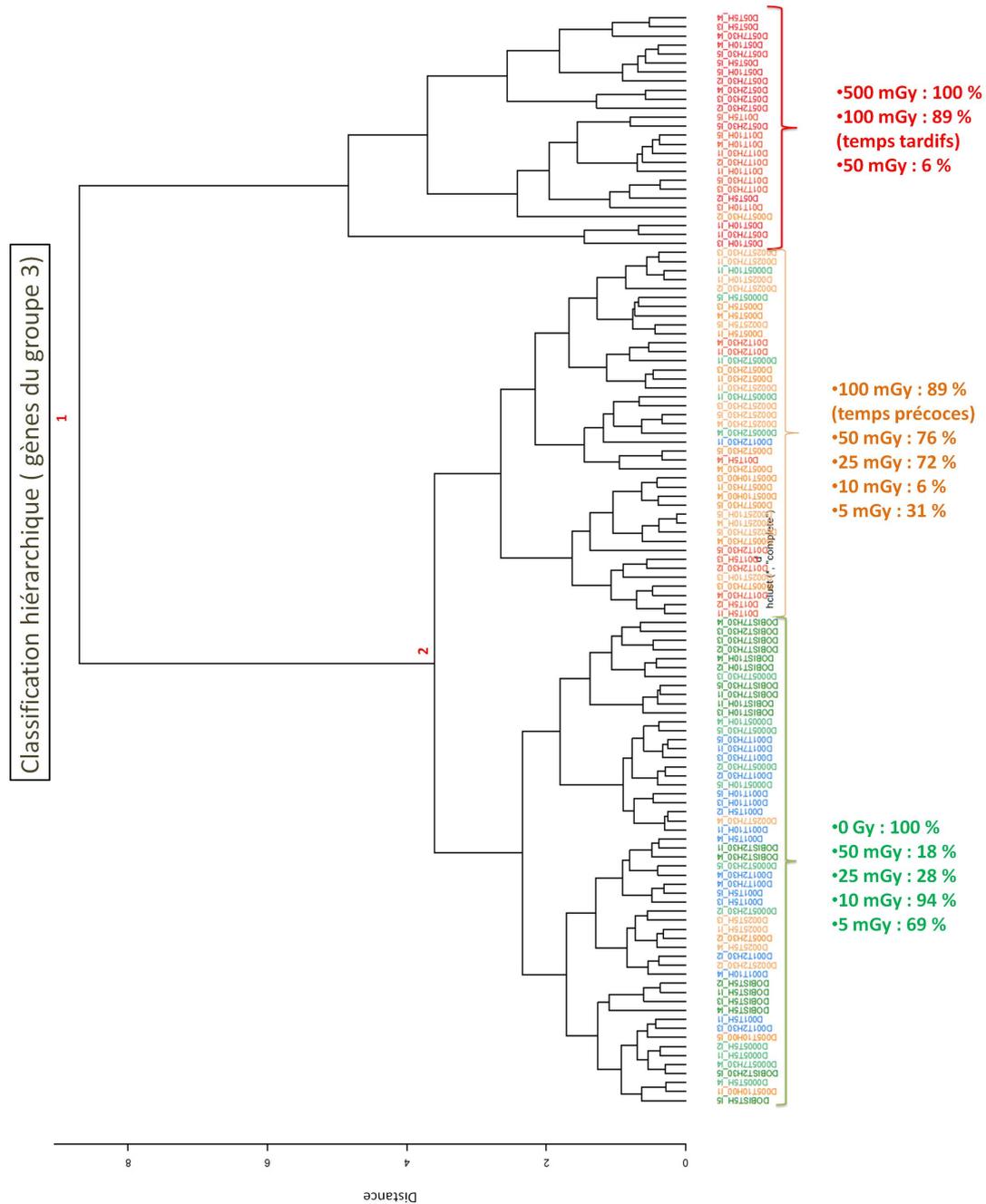


FIGURE 3.6.3: Regroupement hiérarchique à partir des intensités de fluorescence des gènes du groupe 3. Il est généré, à l'aide de la fonction Hierclus de « R », à partir des données normalisées et filtrées. Chaque couleur correspond à une dose d'irradiation. Les conditions en rouge correspondent aux conditions 500/100mGy, en orange 50/25mGy, en bleu 10mGy et en vert 5 et 0mGy.

3.6.4 Discussion

En se basant sur les différentes classes de profils d'expression identifiés il a été possible dans nos données de différencier des échantillons en fonction de leur dose d'irradiation. Chaque groupe de gènes possède des spécificités en terme de capacité de regroupement des échantillons en fonction de la dose d'irradiation (Tableau 3.6.1). Cette figure montre bien qu'on pourrait construire une méthodologie analytique qui jouerait sur les trois groupements de gènes et les résultats obtenus avec chacun pour déduire les doses d'exposition.

Liste de gènes	Irradiés Versus non irradiés	Irradiés < 100 mGy Versus les autres conditions	Irradiés <25mGy Versus les autres conditions
370 gènes	OUI	OUI	NON
68 gènes	NON	OUI (partiellement)	NON
7 gènes	NON	OUI (partiellement)	OUI

TABLEAU 3.6.1: Récapitulatif du potentiel de discrimination de dose des différentes listes de gènes.

Ces résultats mettent en exergue le potentiel de ces divers candidats en termes de biomarqueurs d'exposition à l'irradiation. Cependant, ils sont à considérer avec précaution, car le travail dont ils découlent a été réalisée sur seulement cinq individu. Rappelons aussi que cette étude a été réalisée exclusivement sur un modèle cellulaire trié et dans les 10 h suivant l'irradiation *ex-vivo* de sang total. Ces limitations expérimentales entraînent bien évidemment une extrapolation difficile de l'utilisation de ces groupes de gènes à des fins de dosimétrie biologique.

Certaines études ont déjà émis l'hypothèse d'utilisation de tels biomarqueurs en dosimétrie biologique (Amundson et al., 2000), (Grace et al., 2005), (Knops et al., 2012),

(Manning et al., 2013). Elles ont proposé certains gènes cibles du facteur P53 comme de bon candidats en termes de biomarqueurs moléculaires de l'irradiation. Amundson *et al* ont mis en évidence un ensemble de gènes induits (DDB2, XPC, PCNA, WAF1) dans les lymphocytes humains jusqu'à trois jours après irradiation à des doses de 200 mGy et 2 Gy (Amundson et al., 2000). Grace *et al* ont mis en évidence des changements d'expression quantifiables et reproductibles des gènes CDKN1A, BAX, GADD45A et DDB2 au sein de sang total 24h et 48h après une irradiation *ex-vivo* à 250 mGy et 3 Gy (Grace et al., 2005). Ces mêmes biomarqueurs moléculaires ont été identifiés récemment par Kabacik *et al* en analysant le transcriptome de lymphocytes 2 h et 24 h après une irradiation à 2 et 4 Gy (Kabacik et al., 2011). Une récente étude menée sur des lymphocytes humain, après 6, 24 et 48 h après différentes doses d'expositions comprises entre 20 mGy et 4 Gy, a identifié une signature de 9 gènes dont FDXR qui pourrait se révéler pertinente pour discriminer une exposition aux doses inférieures à 100 mGy (Knops et al., 2012). Manning et ses collaborateurs ont eux évalué par PCR quantitative 13 biomarqueurs dont CCNG1, DDB2 et FDXR. Leur étude est celle qui se rapproche la plus de nos conditions expérimentales puisqu'ils ont utilisé un modèle de sang total 2h et 24 h après une irradiation *ex vivo* à des doses comprises entre 5 et 100 mGy (Manning et al., 2013).

L'identification de biomarqueurs pourrait avoir aussi un intérêt pour des études épidémiologiques moléculaire incorporant les notions de biomarqueurs et tests biologiques dans le suivi des cohortes. En effet, l'évaluation des risques sanitaires aux faibles doses reste compliquée en raison de l'impossibilité, dans certain cas, de réaliser une évaluation dosimétrique robuste des expositions potentielles (Pernot et al., 2012). L'identification de biomarqueurs appropriés pour une utilisation dans les études de population à risque pourrait permettre d'améliorer les données épidémiologiques concernant l'exposition aux faibles doses et donc l'étude de leurs effets à long terme.

Notre étude a mis en évidence une liste de 370 gènes dont les profils d'expression pourraient être capable de discriminer une "non irradiation" d'une irradiation à une dose comprise entre 5 et 50 mGy. A ce jour, aucune des autres études ne semblent être capable de mettre en évidence une telle sensibilité, car elles se basent toutes sur des gènes induits suite aux dommages à l'ADN (*i.e.* cible de p53). Or, nous avons constaté dans notre analyse fonctionnelle que ce type de réponse n'était plus détectable aux doses inférieures à 50 mGy. Ce résultat est très encourageant pour la recherche de biomarqueurs pertinents pouvant mettre en évidence une irradiation à des doses inférieures à 100 mGy.

Quatrième partie

Conclusion générale et perspectives

« Les gènes, comme les
diamants, sont éternels, mais
pas tout à fait de la même façon
que ces derniers. »"

*(Richard Dawkins, Le gène
égoïste, 1976)*

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Depuis l'optimisation des méthodes d'étude des données à haut débit, le potentiel du transcriptome a été largement exploité dans la recherche scientifique afin de décrypter la réponse moléculaire d'une cellule. Même si l'analyse du transcriptome ne s'avère pas suffisante pour obtenir une image de la cellule, puisque la transcription d'un gène ne reflète pas obligatoirement sa traduction et encore moins l'activation fonctionnelle de la protéine correspondante, elle en reste cependant un bon indicateur de l'état d'une cellule à un instant donné. De manière générale, l'analyse de l'abondance relative des transcrits de l'ensemble du génome humain, a permis d'obtenir une vision dynamique et globale de la réponse moléculaire à l'irradiation. Notons qu'il s'avère difficile de passer de la caractérisation d'un groupe de gènes à l'explication d'un processus biologique complexe. Au vue des résultats obtenus, seules des hypothèses sur d'éventuels mécanismes biologiques peuvent être formulées. Ainsi, les hypothèses qui découlent de ce type d'étude peuvent alors faire l'objet de vérification puis de validation par des approches expérimentales plus classiques.

Une partie des hypothèses émises a pu être confirmée en les confrontant aux systèmes de régulation activés en réponses à l'irradiation déjà bien caractérisés dans la littérature. Ces hypothèses concernent l'ensemble des processus (réparation des dommages, mort cellulaire, cycle cellulaire) dont la régulation dépend du facteur de transcription

P53 et dont le niveau d'activation dépend lui même du taux de dommages généré par l'irradiation dans les cellules. Nous avons pu mettre en évidence à travers la mesure différentiel de l'expression des gènes que de tels processus semblaient ne pas être activés pour un taux de dommage induit inférieur à une cassure double brin par cellule (entre 50 et 100 mGy). L'autre partie des hypothèses que nous avons formulées à partir de nos résultats concerne l'implication possible du métabolisme mitochondrial ainsi que l'activation de la voie des MAPKinase dans la réponse aux très faibles doses d'irradiation gamma (Figure 4.6.4). Le rôle de l'ATP, produit de la chaîne respiratoire mitochondrial comme messenger secondaire inter-cellulaire a déjà été démontré dans la littérature en réponse à une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants (Kojima et al., 2011). Son action sur des récepteurs extra cellulaire de type P2Y pourrait être à l'origine de l'activation de la voie des MAPKinases (Tsukimoto et al., 2010), (Kojima et al., 2011). L'implication réelle de ces mécanismes identifiés grâce à l'analyse de nos résultats et de la littérature devront faire l'objet de validation par des approches ciblées. Ainsi il serait particulièrement intéressant de mesurer le potentiel membranaire des mitochondries après irradiation à très faibles doses ainsi que les concentrations intra et extra cellulaire d'ATP et leur variation au cours du temps. De manière complémentaire, la mesure de l'activation de la voie des MAPKinase et des facteurs de transcription à domaine ETS semble être pertinente dans la caractérisation de cette réponse.

Il pourrait également être intéressant de combiner d'autres approches "omiques" à cette étude comme la protéomique ou la métabolique ce qui permettrait de mieux caractériser les différents réseaux biologiques et leurs interconnexions et ainsi compléter la connaissance au niveau des mécanismes moléculaires mis en jeu aux faibles doses. Ces approches peuvent être utiles pour mettre en évidence d'éventuel biomarqueurs d'exposition ou bien générer de nouvelles connaissances d'un point de vue mécanistique.

La réponse transcriptionnelle entraine l'activation de facteurs de transcription capables d'interagir afin de réguler l'expression des gènes. Nos résultats démontrent que

l'analyse de la réponse transcriptionnelle induite ne doit pas se limiter à émettre des hypothèses sur les conséquences de ces modulations d'expression mais doit également s'intéresser à leurs causes. En effet, à ce jour l'origine moléculaire des processus d'instabilité génomique ou d'effet bystander pour ne citer qu'eux, restent mal élucidé et les études haut débit comme celle-ci pourraient permettre d'identifier un ou plusieurs senseurs moléculaires à l'origine d'un ou plusieurs de ces effets cellulaires mis en évidence à faible dose.

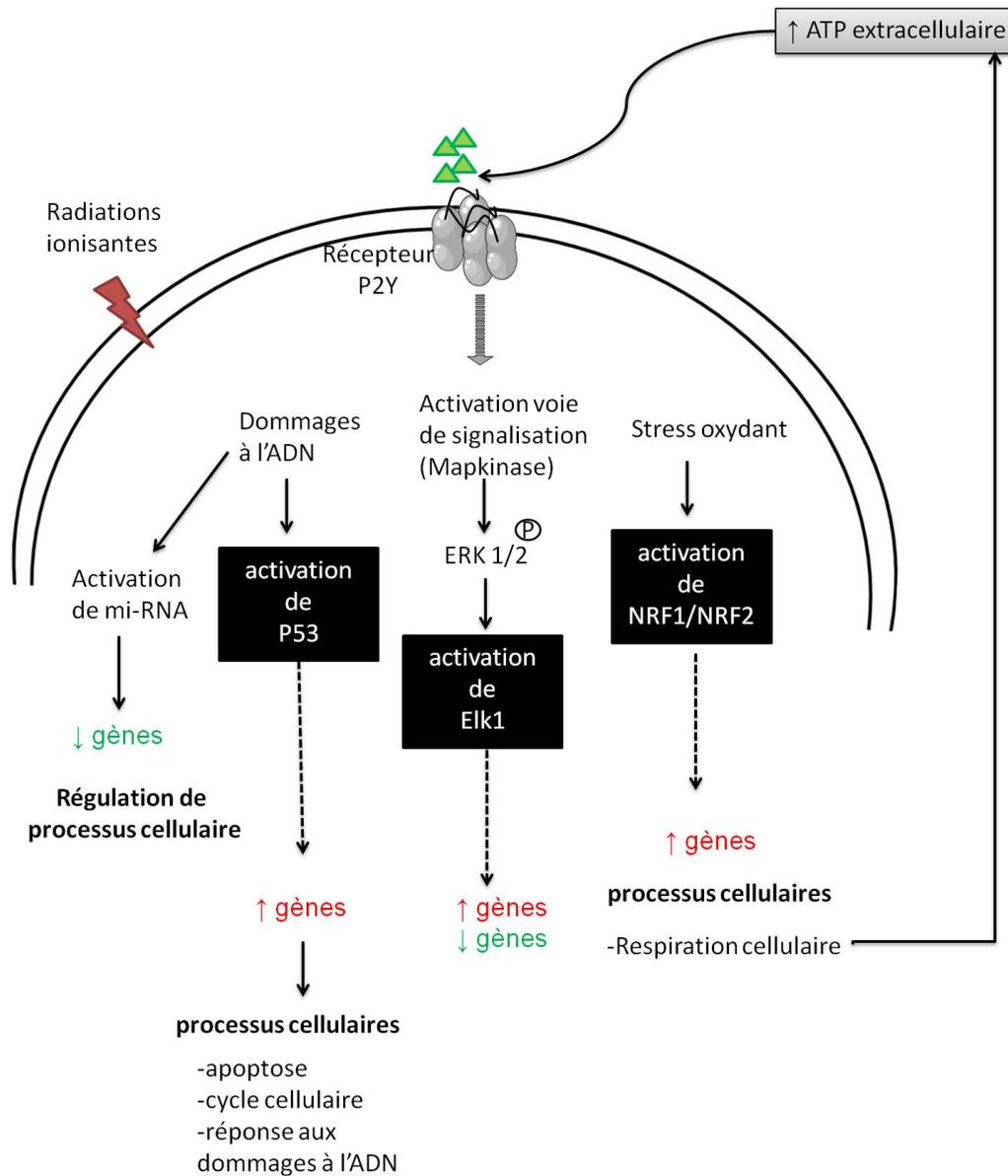


FIGURE 4.6.4: Mécanisme hypothétique moléculaire en réponse aux faibles doses basés sur l'interprétation des données du transcriptome

Cinquième partie

Références bibliographiques

« L'ADN fonctionne d'une
manière mystérieuse. »"

*(Richard Dawkins, Le gène
égoïste, 1976)*

A

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*, 15(17) :2177–96.
- Adams, J. (2003). The proteasome : structure, function, and role in the cell. *Cancer treatment reviews*, 29 Suppl 1(03) :3–9.
- Agarwal, S. and Rao, a. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*, 9(6) :765–75.
- Albanese, J., Martens, K., Karanitsa, L. V., Karkanitsa, L. V., Schreyer, S. K., and Dainiak, N. (2007). Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology. *Experimental hematology*, 35(4 Suppl 1) :47–54.
- Amundson, S. A., Bittner, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., and Fornace, A. J. (1999a). Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene*, 18(24) :3666–72.
- Amundson, S. A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., and Fornace, A. J. (2001). Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. *Radiation research*, 156(5 Pt 2) :657–61.
- Amundson, S. A., Do, K. T., and Fornace, A. J. (1999b). Induction of stress genes by low doses of gamma rays. *Radiation research*, 152(3) :225–31.
- Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., and Fornace, A. J. (2000). Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiation research*, 154(3) :342–6.

- Amundson, S. A., Do, K. T., Vinikoor, L., Koch-Paiz, C. A., Bittner, M. L., Trent, J. M., Meltzer, P., and Fornace, A. J. (2005). Stress-specific signatures : expression profiling of p53 wild-type and -null human cells. *Oncogene*, 24(28) :4572–9.
- Amundson, S. A., Lee, R. A., Koch-Paiz, C. A., Bittner, M. L., Meltzer, P., Trent, J. M., and Fornace, A. J. (2003). Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Molecular cancer research : MCR*, 1(6) :445–52.
- Anzai, K., Ban, N., Ozawa, T., and Tokonami, S. (2012). Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident : facts , environmental contamination , possible biological effects , and countermeasures. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50(1) :2–8.
- Ashcroft, M. and Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18(53) :7637–43.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2) :473–8.
- Azzam, E. I. and Little, J. B. (2004). The radiation-induced bystander effect : evidence and significance. *Human & experimental toxicology*, 23(2) :61–5.

B

- Backlund, M. G., Trasti, S. L., Backlund, D. C., Cressman, V. L., Godfrey, V., and Koller, B. H. (2001). Impact of ionizing radiation and genetic background on mammary tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer research*, 61(17) :6577–82.
- Badie, C., Iliakis, G., Foray, N., Alsbeih, G., Cedervall, B., Chavaudra, N., Pantelias, G., Arlett, C., and Malaise, E. P. (1995). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiation research*, 144(1) :26–35.
- Becker, T. and Haferkamp, S. (2013). Molecular Mechanisms of Cellular Senescence. In *Agricultural and Biological Sciences A» "Senescence and Senescence-Related Disorders"*. Senescence and Senescence-Related Disorders.
- Beckerman, R. and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(8) :a000935.
- Benjamini, Y. and Hochber, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, 57(1) :289–300.

- Berglund, S. R., Rocke, D. M., Dai, J., Schwiertert, C. W., Santana, A., Stern, R. L., Lehmann, J., Hartmann Siantar, C. L., and Goldberg, Z. (2008). Transient genome-wide transcriptional response to low-dose ionizing radiation in vivo in humans. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 70(1) :229–34.
- Bertagna, A. and Jahroudi, N. (2001). The NFY transcription factor mediates induction of the von Willebrand factor promoter by irradiation. *Thrombosis and haemostasis*, 85(5) :837–44.
- Blattner, C., Sparks, a., and Lane, D. (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Molecular and cellular biology*, 19(5) :3704–13.
- Bolstad, B. (2001). Probe Level Quantile Normalization of High Density Oligonucleotide Array Data. (December) :1–8.
- Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., MacDougald, O. a., Cho, K. R., and Fearon, E. R. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology : CB*, 17(15) :1298–307.
- Bonin, F., Molina, M., Malet, C., Ginestet, C., Berthier-Vergnes, O., Martin, M. T., and Lamartine, J. (2009). GATA3 is a master regulator of the transcriptional response to low-dose ionizing radiation in human keratinocytes. *BMC genomics*, 10 :417.
- Brach, M. A., Gruss, H. J., Kaisho, T., Asano, Y., Hirano, T., and Herrmann, F. (1993). Ionizing radiation induces expression of interleukin 6 by human fibroblasts involving activation of nuclear factor-kappa B. *The Journal of biological chemistry*, 268(12) :8466–72.
- Brach, M. A., Hass, R., Sherman, M. L., Gunji, H., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1991). Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *The Journal of clinical investigation*, 88(2) :691–5.
- Burr, K. L., Robinson, J. I., Rastogi, S., Boylan, M. T., Coates, P. J., Lorimore, S. a., and Wright, E. G. (2010). Radiation-induced delayed bystander-type effects mediated by hemopoietic cells. *Radiation research*, 173(6) :760–8.
- Büssing, I., Slack, F. J., and Grosshans, H. (2008). let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in molecular medicine*, 14(9) :400–9.

C

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA : formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 131 :1–87.

- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation research*, 424(1-2) :9–21.
- Cai, L. and Liu, S. Z. (1990). Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *International journal of radiation biology*, 58(1) :187–94.
- Chang, T.-C., Wentzel, E. a., Kent, O. a., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., Arking, D. E., Beer, M. a., Maitra, A., and Mendell, J. T. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*, 26(5) :745–52.
- Chaudhry, M. A. (2008). Biomarkers for human radiation exposure. *International Journal of Cancer*, pages 557–563.
- Chaudhry, M. A. and Omaruddin, R. a. (2011). Mitochondrial gene expression in directly irradiated and nonirradiated bystander cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 26(5) :657–63.
- Chaudhry, M. A., Omaruddin, R. a., Kreger, B., de Toledo, S. M., and Azzam, E. I. (2012). Micro RNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation. *Molecular biology reports*, 39(7) :7549–58.
- Chaudhry, M. A., Sachdeva, H., and Omaruddin, R. a. (2010). Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways. *DNA and cell biology*, 29(9) :553–61.
- Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J., and Jegga, A. G. (2009). ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue) :W305–11.
- Cheng, Q. and Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(3) :472–8.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair : an update. *Toxicology*, 193(1-2) :3–34.
- Coates, P. J., Lorimore, S. A., and Wright, E. G. (2004). Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutation research*, 568(1) :5–20.
- Coleman, M. A., Yin, E., Peterson, L. E., Nelson, D., Sorensen, K., Tucker, J. D., Wyrobek, A. J., and Al, C. E. T. (2005). Low-Dose Irradiation Alters the Transcript Profiles of Human Lymphoblastoid Cells Including Genes Associated with Cytogenetic Radioadaptive Response. *Radiation Research*, 382 :369–382.

- Commission, E. (2001). *Radiation protection 125 Low dose ionizing radiation and cancer risk*. European Communities, Luxembourg.
- Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H., and Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation research*, 704(1-3) :78–87.
- Council, N. R. (2006). Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. *BEIRVII , Phase 2*, page 424.
- Criswell, T., Leskov, K., Miyamoto, S., Luo, G., and Boothman, D. A. (2003). Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37) :5813–27.
- Croft, D., McIntyre, P., Wibulswas, a., and Kramer, I. (1999). Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. *The American journal of pathology*, 154(4) :1149–58.
- Cui, Y. F., Gao, Y. B., Yang, H., Xiong, C. Q., Xia, G. W., and Wang, D. W. (1999). Apoptosis of circulating lymphocytes induced by whole body gamma-irradiation and its mechanism. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 18(3) :185–9.

D

- Dainiak, N. (2002). Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*, 30 :513–528.
- Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA repair*, 11(1) :12–21.
- Dang, C. V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and cellular biology*, 19(1) :1–11.
- Datta, R., Rubin, E., Sukhatme, V., Qureshi, S., Hallahan, D., Weichselbaum, R. R., and Kufe, D. W. (1992). Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CArG elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21) :10149–53.
- Datta, R., Taneja, N., Sukhatme, V. P., Qureshi, S. a., Weichselbaum, R., and Kufe, D. W. (1993). Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6) :2419–22.

- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry*, 262(20) :9895–901.
- Day, D. a. and Tuite, M. F. (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes : an overview. *The Journal of endocrinology*, 157(3) :361–71.
- Dbaiibo, G. S., Pushkareva, M. Y., Rachid, R. a., Alter, N., Smyth, M. J., Obeid, L. M., and Hannun, Y. a. (1998). P53-Dependent Ceramide Response To Genotoxic Stress. *The Journal of clinical investigation*, 102(2) :329–39.
- DeRisi, J. L. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science*, 278(5338) :680–686.
- Devauchelle, V., Marion, S., Cagnard, N., Mistou, S., Falgarone, G., Breban, M., Letourneur, F., Pitaval, a., Alibert, O., Lucchesi, C., Anract, P., Hamadouche, M., Ayrat, X., Dougados, M., Gidrol, X., Fournier, C., and Chiochia, G. (2004). DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets. *Genes and immunity*, 5(8) :597–608.
- Ding, L.-h., Shingyoji, M., Chen, F., Hwang, J.-j., Burma, S., Lee, C., Cheng, J.-F., and Chen, D. J. (2005). Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation : a comparative study of low and high doses. *Radiation research*, 164(1) :17–26.
- Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation research*, 591(1-2) :45–59.
- Dizdaroglu, M., Gajewski, E., Reddy, P., and Margolis, S. A. (1989). Structure of a hydroxyl radical induced DNA-protein cross-link involving thymine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry*, 28(8) :3625–8.

E

- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus : NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 30(1) :207–10.
- Edmunds, J. W. and Mahadevan, L. C. (2004). MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of cell science*, 117(Pt 17) :3715–23.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25) :14863–8.
- El-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in cancer biology*, 8(5) :345–57.

Enoch, T. and Norbury, C. (1995). Cellular responses to DNA damage : cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends in biochemical sciences*, 20(10) :426–30.

F

Fachin, A. L., Mello, S. S., Sandrin-Garcia, P., Junta, C. M., Ghilardi-Netto, T., Donadi, E. A., Passos, G. A. d. S., and Sakamoto-Hojo, E. T. (2009). Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Journal of radiation research*, 50(1) :61–71.

Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W. H., Becker, K. G., and Gorospe, M. (2002). Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16) :10611–6.

Favaudon, V. (2000). Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. *Cancer/Radiother*, 4(355-68).

Fei, P. and El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37) :5774–83.

Feinendegen, L. E., Pollycove, M., and Sondhaus, C. a. (2004). Responses to low doses of ionizing radiation in biological systems. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, 2(3) :143–71.

Ferguson, L. R. (2011). RNA silencing : Mechanism, biology and responses to environmental stress. *Mutation research*, 714(1-2) :93–4.

Fortini, P. and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair : mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA repair*, 6(4) :398–409.

Franco, N., Lamartine, J., Frouin, V., Le Minter, P., Petat, C., Leplat, J.-J., Libert, F., Gidrol, X., and Martin, M. T. (2005). Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiation research*, 163(6) :623–35.

Fujimori, A., Okayasu, R., Ishihara, H., Yoshida, S., Eguchi-Kasai, K., Nojima, K., Ebisawa, S., and Takahashi, S. (2005). Extremely low dose ionizing radiation up-regulates CXC chemokines in normal human fibroblasts. *Cancer research*, 65(22) :10159–63.

Funayama, R. and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma*, 116(5) :431–40.

Furlong, H., Mothersill, C., Lyng, F. M., and Howe, O. (2013). Apoptosis is signaled early by low doses of ionising radiation in a radiation-induced bystander effect. *Mutation research*, 741-742 :35–43.

G

- Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1990). Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry*, 29(4) :977–80.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. Y. H., and Zhang, J. (2004). Bioconductor : open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*, 5(10) :R80.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. a., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439) :531–7.
- Gong, B., Chen, Q., and Almasan, A. (1998). Ionizing radiation stimulates mitochondrial gene expression and activity. *Radiation research*, 150(5) :505–12.
- Goodhead, D. T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations : clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*, 65(1) :7–17.
- Grace, M. B., Salter, C. A., Bullard, J. R., Prasanna, P. G. S., Manglapus, G. L., and Blakely, W. F. (2005). Gene-Expression Biomarkers for Application to High-Throughput Radiation Biodosimetry. *Human Factors*, pages 1–15.
- Grudzenski, S., Raths, A., Conrad, S., Rube, C. E., and Löbrich, M. (2010). Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32) :14205–10.
- Gruel, G., Voisin, P., Vaurijoux, A., Roch-Lefevre, S., Grégoire, E., Maltere, P., Petat, C., Gidrol, X., Voisin, P., and Roy, L. (2008). Broad modulation of gene expression in CD4+ lymphocyte subpopulations in response to low doses of ionizing radiation. *Radiation research*, 170(3) :335–44.
- Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15(4) :129–35.

H

- Hafer, K., Iwamoto, K. K., and Schiestl, R. H. (2007). Adaptive Response to Gamma Radiation in Mammalian Cells Proficient and Deficient in Components of Nucleotide Excision Repair. *Radiation Research*, 174 :168–174.

- Hall EJ (2011). *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Hallahan, D. E., Gius, D., Kuchibhotla, J., Sukhatme, V., Kufe, D. W., and Weichselbaum, R. R. (1993). Radiation signaling mediated by Jun activation following dissociation from a cell type-specific repressor. *The Journal of biological chemistry*, 268(7) :4903–7.
- Hallahan, D. E., Sukhatme, V. P., Sherman, M. L., Virudachalam, S., Kufe, D., and Weichselbaum, R. R. (1991). Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6) :2156–60.
- Hartmann, C., Corre-menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., and Lelandais-brière, C. (2013). Les microARN Une nouvelle classe de l'expression génique. *Médecine sciences*, 20 :894–898.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25 :585–621.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. a., and Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148) :1130–4.
- Hei, T. K., Zhou, H., Ivanov, V. N., Hong, M., Lieberman, H. B., Brenner, D. J., Amundson, S. A., and Geard, C. R. (2008). Mechanism of radiation-induced bystander effects : a unifying model. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60(8) :943–50.
- Hermeking, H. (2007). p53 enters the microRNA world. *Cancer cell*, 12(5) :414–8.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell*, 1(1) :3–11.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835) :366–74.
- Huang, L., Snyder, A. R., and Morgan, W. F. (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene*, 22(37) :5848–54.

I

- Iliakis, G. (1991). The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 13(12) :641–8.

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37) :5834–47.

Iyer, R. and Lehnert, B. E. (2002). Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutation research*, 503(1-2) :1–9.

J

Jen, K.-Y. and Cheung, V. G. (2003). Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Genome research*, 13(9) :2092–100.

Jen, K.-y. and Cheung, V. G. (2005). Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer research*, 65(17) :7666–73.

Joly-tonetti, N. and Lamartine, J. (2012). The Role of MicroRNAs in the Cellular Response to Ionizing Radiations. In Nenoï, M., editor, *Current Topics in Ionizing Radiation Research*.

K

Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F., Ashworth, A., Bouffler, S., and Badie, C. (2010). Gene expression following ionising radiation : Identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Radiation Effects*, 44(0) :1–15.

Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F., Ashworth, A., Bouffler, S., and Badie, C. (2011). Gene expression following ionising radiation : identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *International journal of radiation biology*, 87(2) :115–29.

Karagiannis, T. C. and El-Osta, a. (2004). Double-strand breaks : signaling pathways and repair mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(17) :2137–47.

Karagiannis, T. C. and El-Osta, a. (2007). Chromatin modifications and DNA double-strand breaks : the current state of play. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 21(2) :195–200.

Kenyon, C. J. and Walker, G. C. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. 1980. *DNA repair*, 4(9) :1049–53.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4) :239–57.

- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research*, 36(17) :5678–94.
- Knops, K., Boldt, S., Wolkenhauer, O., and Kriehuber, R. (2012). Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes : possible applications for biodosimetry. *Radiation research*, 178(4) :304–12.
- Ko, L. J. and Engel, J. D. (1993). DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Molecular and cellular biology*, 13(7) :4011–22.
- Kojima, S., Takai, E., and Tsukimoto, M. (2011). ATP Released from Low-dose Gamma Ray-irradiated Cells Activates Intracellular Antioxidant Systems via Purine Receptors. *Anti aging medecine*, pages 108–113.
- Komili, S. and Silver, P. a. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes : a systems biology view. *Nature reviews. Genetics*, 9(1) :38–48.
- Koterov (2005). Genomic instability at exposure of low dose radiation with low let . Mythical mechanism of unproved carcinogenic effects Aleksey Nikolaevich Koterov. *International Journal of Low Radiation*, 1(4) :376–451.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, 172(6) :823–34.

L

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrum, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A.,

- Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J., and Szustakowski, J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822) :860–921.
- Lay, J. O., Liyanage, R., Borgmann, S., and Wilkins, C. L. (2006). Problems with the "omics". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(11) :1046–1056.
- Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis : Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water*, 3(4) :235–253.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5) :843–54.
- Leung, A. K. L. and Sharp, P. a. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell*, 40(2) :205–15.
- Levade, T., Andrieu, N., and Laurent, G. (1996). La voie sphingomyéline-céramide dans la réponse cellulaire aux effecteurs antitumoraux. *Médecine sciences*, 12 :1219–1227.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4) :707–19.

- Lindsay, K. J., Coates, P. J., Lorimore, S. a., and Wright, E. G. (2007). The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation. *The British journal of radiology*, 80 Spec No :S2–6.
- Little, J. B. (2000). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3) :397–404.
- Ljungman, M. (2005). Activation of DNA damage signaling. *Mutation research*, 577(1-2) :203–16.
- Longthorne, V. L. and Williams, G. T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 16(13) :3805–12.
- Lorimore, S. a., Coates, P. J., and Wright, E. G. (2003). Radiation-induced genomic instability and bystander effects : inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(45) :7058–69.
- Lorimore, S. A., Kadhim, M. A., Pocock, D. A., Papworth, D., Stevens, D. L., Goodhead, D. T., and Wright, E. G. (1998). Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10) :5730–3.
- Lorimore, S. A., McIlrath, J. M., Coates, P. J., and Wright, E. G. (2005). Chromosomal instability in unirradiated hemopoietic cells resulting from a delayed in vivo bystander effect of gamma radiation. *Cancer research*, 65(13) :5668–73.
- Lorimore, S. a., Rastogi, S., Mukherjee, D., Coates, P. J., and Wright, E. G. (2013). The influence of p53 functions on radiation-induced inflammatory bystander-type signaling in murine bone marrow. *Radiation research*, 179(4) :406–15.
- Lu, X. and Lane, D. P. (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation : defects in chromosome instability syndromes? *Cell*, 75(4) :765–78.

M

- Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146(1) :3–15.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11) :630–41.
- Manning, G., Kabacik, S., Finnon, P., Bouffler, S., and Badie, C. (2013). High and low dose responses of transcriptional biomarkers in ex vivo x-irradiated human blood. *International journal of radiation biology*.

- Marchetti, F., Coleman, M. A., Jones, I. M., and Wyrobek, A. J. (2006). Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 82(9) :605–39.
- Margolis, S. A., Coxon, B., Gajewski, E., and Dizdaroglu, M. (1988). Structure of a hydroxyl radical induced cross-link of thymine and tyrosine. *Biochemistry*, 27(17) :6353–9.
- Meighan-Mantha, R. L., Riegel, A. T., Suy, S., Harris, V., Wang, F. H., Lozano, C., Whiteside, T. L., and Kasid, U. (1999). Ionizing radiation stimulates octamer factor DNA binding activity in human carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 199(1-2) :209–15.
- Mesnil, M. and Yamasaki, H. (2000). Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy : role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer research*, 60(15) :3989–99.
- Messina, D. N., Glasscock, J., Gish, W., and Lovett, M. (2004). An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression. *Genome research*, 14(10B) :2041–7.
- Metheetrairut, C. and Slack, F. J. (2013). MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Current opinion in genetics & development*, 23(1) :12–19.
- Mevorach, D., Trahtemberg, U., Krispin, A., Attalah, M., Zazoun, J., Tabib, A., Grau, A., and Verbovetski-Reiner, I. (2010). What do we mean when we write "senescence," "apoptosis," "necrosis," or "clearance of dying cells" ? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209(1) :1–9.
- Meyer, R. G., Küpper, J.-H., Kandolf, R., and Rodemann, H. P. (2002). Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(1) :337–46.
- Michael, D. and Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology*, 13(1) :49–58.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, a., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome : a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, 91(4) :457–66.
- Moore, M. J. (2005). From birth to death : the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740) :1514–8.
- Morgan, W. F. (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation : II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiation research*, 159(5) :581–96.

- Morgan, W. F. and Sowa, M. B. (2007). Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutation research*, 616(1-2) :159–64.
- Mori, M., Benotmane, M. A., Tirone, I., Hooghe-Peters, E. L., and Desaintes, C. (2005). Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(13) :1489–501.
- Mori, M., Benotmane, M. A., Vanhove, D., van Hummelen, P., Hooghe-Peters, E. L., and Desaintes, C. (2004). Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4+ T lymphocytes and in Jurkat cells : unraveling novel pathways in radiation response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(15) :1955–64.
- Mori, M. and Desaintes, C. (2004). Gene expression in response to ionizing radiation : an overview of molecular features in hematopoietic cells. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 18(3-4) :363–71.
- Morimoto, S., Hatta, H., Fujita, S., Matsuyama, T., Ueno, T., and Nishimoto, S. (1998). Hydroxyl radical-induced cross-linking of thymine and lysine : identification of the primary structure and mechanism. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8(7) :865–70.
- Mothersill, C. and Seymour, C. (2004). Radiation-induced bystander effects and adaptive responses—the Yin and Yang of low dose radiobiology? *Mutation research*, 568(1) :121–8.

N

- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3) :355–65.
- Nakamura, N. (2006). Genetic effects of radiation in atomic-bomb survivors and their children : past, present and future. *Journal of radiation research*, 47 Suppl B :B67–73.
- Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors : brakes of the cell cycle engine during development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(12) :1020–9.
- Nguyen, D. V. and Rocke, D. M. (2002). Multi-class cancer classification via partial least squares with gene expression profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(9) :1216–26.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23(16) :2757–65.
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*, 24(7) :1311–7.

Nzeusseu Toukap, a., Galant, C., Theate, I., Maudoux, a. L., Lories, R. J. U., Hous-siau, F. a., and Lauwerys, B. R. (2007). Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 56(5) :1579–88.

O

O'Donnell, K. a., Wentzel, E. a., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043) :839–43.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999). KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, 27(1) :29–34.

Ohnishi, T., Mori, E., and Takahashi, A. (2009). DNA double-strand breaks : their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation research*, 669(1-2) :8–12.

Olivieri, G., Bodycote, J., and Wolff, S. (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science (New York, N.Y.)*, 223(4636) :594–7.

P

Papathanasiou, M. a., Kerr, N. C., Robbins, J. H., McBride, O. W., Alamo, I., Barrett, S. F., Hickson, I. D., and Fornace, a. J. (1991). Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells : lack of mediation by protein kinase C. *Molecular and cellular biology*, 11(2) :1009–16.

Patikoglou, G. and Burley, S. K. (1997). Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 26 :289–325.

Paul, S. and Amundson, S. A. (2008). Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 71(4) :1236–1244.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R. S., Byrnes, M. J., Wu, Z., Stephenson, M. T., and Piwnica-Worms, H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 9(3) :197–208.

Pernot, E., Hall, J., Baatout, S., Benotmane, M. A., Blanchardon, E., Bouffler, S., El Saghire, H., Gomolka, M., Guertler, A., Harms-Ringdahl, M., Jeggo, P., Kreuzer, M., Laurier, D., Lindholm, C., Mkacher, R., Quintens, R., Rothkamm, K., Sabatier, L., Tapio, S., de Vathaire, F., and Cardis, E. (2012). Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutation research*, 751(2) :258–86.

- Perry, M. E. (2004). Mdm2 in the response to radiation. *Molecular cancer research : MCR*, 2(1) :9–19.
- Pervan, M., Iwamoto, K. S., and McBride, W. H. (2005). Proteasome Structures Affected by Ionizing Radiation Proteasome Structures Affected by Ionizing Radiation. *Molecular cancer research : MCR*, 3 :381–390.
- Polo, S. E. and Almuzni, G. (2005). Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer letters*, 220(1) :1–9.
- Prives, C. and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *The Journal of pathology*, 187(1) :112–26.

Q

- Qian, H., Wang, T., Naumovski, L., Lopez, C. D., and Brachmann, R. K. (2002). Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene*, pages 7901 – 7911.

R

- Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Shavit, S., Lerenthal, Y., Linhart, C., Kupershtein, A., Amariglio, N., Rechavi, G., Shamir, R., and Shiloh, Y. (2011). Transcriptional modulation induced by ionizing radiation : p53 remains a central player. *Molecular oncology*, 5(4) :336–48.
- Rastogi, S., Coates, P. J., Lorimore, S. A., and Wright, E. G. (2012). Bystander-type effects mediated by long-lived inflammatory signaling in irradiated bone marrow. *Radiation research*, 177(3) :244–50.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular cell*, 26(5) :731–43.
- Ray, M., Yunis, R., Chen, X., and Rocke, D. M. (2012). Comparison of low and high dose ionising radiation using topological analysis of gene coexpression networks. *BMC genomics*, 13(1) :190.
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 124(1-2) :1–6.
- Repetto, M., Semprine, J., and Boveris, A. (2012). Lipid Peroxidation : Chemical Mechanism , Biological Implications and Analytical Determination.

- Rigaud, O. (1993). RÉPONSE ADAPTATIVE AUX RADIATIONS IONISANTES DES CELLULES HUMAINES. *RADIOPROTECTION*, 28.
- Roos, W. P. and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death : From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*, 332(2) :237–48.
- Rothkamm, K. and Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9) :5057–62.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18(38) :5311–7.
- Russell, J. E. and Liebhaber, S. a. (1996). The stability of human beta-globin mRNA is dependent on structural determinants positioned within its 3' untranslated region. *Blood*, 87(12) :5314–23.

S

- Sabin, R. J. and Anderson, R. M. (2011). Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome integrity*, 2(1) :7.
- Saei, A. A. and Omidi, Y. (2011). A glance at DNA microarray technology and applications. *BioImpacts : BI*, 1(2) :75–86.
- Sahijdak, W. M., Yang, C. R., Zuckerman, J. S., Meyers, M., and Boothman, D. A. (1994). Alterations in transcription factor binding in radioresistant human melanoma cells after ionizing radiation. *Radiation research*, 138(1 Suppl) :S47–51.
- Sankaranarayanan, K. (1991). Ionizing radiation and genetic risks. IV. Current methods, estimates of risk of Mendelian disease, human data and lessons from biochemical and molecular studies of mutations. *Mutation research*, 258(1) :99–122.
- Sankaranarayanan, K., von Duyn, A., Loos, M. J., and Natarajan, A. T. (1989). Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutation research*, 211(1) :7–12.
- Satoh, C., Takahashi, N., Asakawa, J., Kodaira, M., Kuick, R., Hanash, S. M., and Neel, J. V. (1996). Genetic analysis of children of atomic bomb survivors. *Environmental health perspectives*, 104 Suppl(May) :511–9.
- Schärer, O. D. and Jiricny, J. (2001). Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(3) :270–81.

- Schild-Poulter, C., Shih, a., Tantin, D., Yarymowich, N. C., Soubeyrand, S., Sharp, P. a., and Haché, R. J. G. (2007). DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage. *Oncogene*, 26(27) :3980–8.
- Scott, B. R. (2004). A biological-based model that links genomic instability, bystander effects, and adaptive response. *Mutation research*, 568(1) :129–43.
- Seong, J., Suh, C. O., and Kim, G. E. (1995). Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 33(4) :869–74.
- Seymour, C. B. and Mothersill, C. (2000). Relative Contribution of Bystander and Targeted Cell Killing to the Low-Dose Region of the Radiation Dose Response Curve. *Radiation Research*, 153(5) :508–511.
- Shadley, J. D. (1994). Chromosomal adaptive response in human lymphocytes. *Radiation research*, 138(1 Suppl) :S9–12.
- Shadley, J. D. and Wolff, S. (1987). Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*, 2(2) :95–6.
- Shan, B., Xu, J., Zhuo, Y., Morris, C. a., and Morris, G. F. (2003). Induction of p53-dependent activation of the human proliferating cell nuclear antigen gene in chromatin by ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*, 278(45) :44009–17.
- Sharrocks, a. D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(11) :827–37.
- Sheen, J.-h. and Dickson, R. B. (2002). Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Molecular and cellular biology*, 22(6) :1819–33.
- Smyth, G. (2005). Limma : linear models for microarray data. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*, 19 Suppl 1(3) :S19–25.
- Smyth, G. K. (2004). Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microar. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1).
- Sokolov, M., Ā, I. G. P., and Neumann, R. (2006). GENOME-WIDE GENE EXPRESSION CHANGES IN NORMAL HUMAN FIBROBLASTS IN RESPONSE TO LOW-LET GAMMA-RADIATION AND HIGH-LET-LIKE. *Radiation Protection Dosimetry*, pages 1–7.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899 :191–208.

- Stenerlöw, B., Karlsson, K. H., Cooper, B., and Rydberg, B. (2003). Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites : results for cells deficient in nonhomologous end joining. *Radiation research*, 159(4) :502–10.
- Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, 79(2) :329–39.
- Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M. (2001). Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells. *Cancer research*, 61(14) :5396–401.

T

- Tan, M.-K. M., Lim, H.-J., and Harper, J. W. (2011). SCF(FBXO22) regulates histone H3 lysine 9 and 36 methylation levels by targeting histone demethylase KDM4A for ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology*, 31(18) :3687–99.
- Team, R. D. C. (2009). *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. 1.
- Templin, T., Paul, S., Amundson, S. a., Young, E. F., Barker, C. a., Wolden, S. L., and Smilenov, L. B. (2011). Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 80(2) :549–57.
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells : the molecular choreography. *Mutation research*, 751(2) :158–246.
- Ting, N. S. Y. and Lee, W.-H. (2004). The DNA double-strand break response pathway : becoming more BRCAish than ever. *DNA repair*, 3(8-9) :935–44.
- Tsukimoto, M., Homma, T., Ohshima, Y., and Kojima, S. (2010). Involvement of purinergic signaling in cellular response to gamma radiation. *Radiation research*, 173(3) :298–309.
- Tubiana, M. (2008). *Radiobiologie*. Hermann Médecine, Paris, hermann edition.
- Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., and Masse, R. (2006). Recent reports on the effect of low doses of ionizing radiation and its dose-effect relationship. *Radiation and environmental biophysics*, 44(4) :245–51.
- Turtoi, a., Brown, I., Schläger, M., and Schneeweiss, F. H. a. (2010). Gene expression profile of human lymphocytes exposed to (211)At alpha particles. *Radiation research*, 174(2) :125–36.

U

- UNSCEAR (2000). Medical radiation exposures. *UNSCEAR 2000*, ANNEX D.
- UNSCEAR (2006a). Effects of ionizing radiation on the immune system Contents. *UNSCEAR*, Annex D.
- UNSCEAR (2006b). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation Contents. *UNSCEAR*, REPORT Vol(ANNEX C).
- UNSCEAR (2008). SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Technical report, unsear.
- UNSCEAR (2010). SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Technical report, unsear.

V

- Venkatasubbarao, K. (1996). EGR-1 Induction Is Required for Maximal Radiosensitivity in A375-C6 Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46) :29231–29237.
- Verger, P., Hubert, P., and Bard, D. (1998). EVALUATION DES EFFETS DES FAIBLES DOSES DE RAYONNEMENTS IONISANTS : APPORTS DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE. Technical report.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of ageing and development*, 126(1) :111–7.

W

- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells : identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 35 :95–125.
- Warters, R. L., Packard, A. T., Kramer, G. F., Gaffney, D. K., and Moos, P. J. (2009). Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. *Radiation research*, 172(1) :82–95.
- Weir Lipton, M. S., Fuciarelli, A. F., Springer, D. L., and Edmonds, C. G. (1996). Characterization of radiation-induced thymine-tyrosine crosslinks by electrospray ionization mass spectrometry. *Radiation research*, 145(6) :681–6.

- Wiebalk, K., Schmezer, P., Kropp, S., Chang-Claude, J., Celebi, O., Debus, J., Bartsch, H., and Popanda, O. (2007). In vitro radiation-induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(10) :2340–5.
- Wolff, S. (1998). The adaptive response in radiobiology : evolving insights and implications. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl(February) :277–83.
- Woloschak, G. E., Chang-Liu, C. M., Jones, P. S., and Jones, C. A. (1990). Modulation of gene expression in Syrian hamster embryo cells following ionizing radiation. *Cancer research*, 50(2) :339–44.
- Wyrobek, a. J., Manohar, C. F., Krishnan, V. V., Nelson, D. O., Furtado, M. R., Bhattacharya, M. S., Marchetti, F., and Coleman, M. a. (2011). Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation. *Mutation research*, 722(2) :119–30.

Y

- Yang, C. R., Wilson-Van Patten, C., Planchon, S. M., Wuerzberger-Davis, S. M., Davis, T. W., Cuthill, S., Miyamoto, S., and Boothman, D. A. (2000). Coordinate modulation of Sp1, NF-kappa B, and p53 in confluent human malignant melanoma cells after ionizing radiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(2) :379–90.
- Yang, L., Chiang, Y., Lenz, H. J., Danenberg, K. D., Spears, C. P., Gordon, E. M., Anderson, W. F., and Parekh, D. (1998). Intercellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Human gene therapy*, 9(5) :719–28.

Z

- Zhan, Q., Carrier, F., and Fornace, A. J. (1993). Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Molecular and cellular biology*, 13(7) :4242–50.
- Zhang, Y., Zhou, J., Baldwin, J., Held, K. D., Prise, K. M., Redmond, R. W., and Liber, H. L. (2009). Ionizing radiation-induced bystander mutagenesis and adaptation : quantitative and temporal aspects. *Mutation research*, 671(1-2) :20–5.
- Zheng, L. M., Zychlinsky, a., Liu, C. C., Ojcius, D. M., and Young, J. D. (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 112(2) :279–88.

- Zhou, B.-b. S. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response : checkpoints in perspective. *Nature*, 408(November) :433–439.
- Zyuzikov, N. a., Coates, P. J., Parry, J. M., Lorimore, S. a., and Wright, E. G. (2011). Lack of nontargeted effects in murine bone marrow after low-dose in vivo X irradiation. *Radiation research*, 175(3) :322–7.

Sixième partie

Publication

« Si j'ai vu plus loin que les autres, c'est parce que j'ai été porté par des épaules de géants. »"

(Sir Isaac Newton, Lettre à Robert Hooke, 1676)



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

DNA Repair

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair



Characterization of gene expression profiles at low and very low doses of ionizing radiation

Ingrid Nosel, Aurélie Vaurijoux, Joan-Francesc Barquinero, Gaetan Gruel*

IRSN, Laboratoire de Dosimétrie Biologique, BP 17, 92262 Fontenay aux Roses cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2012
Received in revised form 19 April 2013
Accepted 21 April 2013
Available online xxx

Keywords:

Gene expression
Microarray
Ionizing radiation
Low dose
TCD4⁺ lymphocytes

ABSTRACT

The aim of the present study is to analyse by microarray techniques how gene expression is modulated after exposure to low and very low doses of ionizing radiation, to evaluate if the pattern of gene expression shows dose dependence, and to search for putative regulatory mechanisms behind the observed gene-expression modifications.

For this, whole blood samples from five healthy donors were exposed in six doses between 5 and 500 mGy. Total RNA extraction from CD4⁺ lymphocytes was done at four different post-irradiation times. After mRNA amplification, aRNAs were hybridized on DNA microarrays.

The results indicated that up-regulation was twice than down-regulation. Surprisingly, the number of modulated genes does not seem to change drastically with dose, even at the lowest dose of 5 mGy. Clustering analysis revealed seven gene expression clusters with different dose dependence profiles. The functional analysis showed that the genes which increased their expression with the dose were related to p53 pathway and DNA damage response. This could be observed from 25 mGy, but became very clear at doses equal or greater than 100 mGy. On the other hand, genes with a constant modulation of their expression in all the tested doses were related to cellular respiration, ATP metabolic process and chromatin organization. These latter molecular mechanisms seem to be triggered at very low doses (5–25 mGy). *In silico* promoter analysis seems to confirm the implication of transcription factors related to the pathways mentioned above.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Medical exposures are the largest human-made source of exposure to ionizing radiation. In this sense, diagnostic procedures using X-ray technologies have resulted in a marked increase in collective dose [1]. Health impact of this increase is difficult to assess and a better understanding of molecular and cellular consequences of low-dose exposures could help on this issue. As many environmental stimuli, radiation exposure can produce activation of several signalling pathways and leads to complex patterns of gene modulations [2–4]. Main studied pathways are those activated in response to DNA damage. Ionizing radiation plays an important role in induction of DNA damage [5,6] and especially one of the most deleterious damage for the stability of the genetic material of the cell: double-strand breaks (DSB). At doses above 100 mGy of gamma rays, p53 transcription factor is known to be activated and this activation has been described to depend on DNA damage [7–9]. However, DNA

damage is less frequent at low doses of gamma radiation and the distinction between exposed and non-exposed cells becomes more difficult due to the low number of DSB induced. In fact, the detection of gamma-H2Ax foci in cell nuclei was shown to be sensitive to low doses [10], and below 30–50 mGy of gamma-rays less than one DSB per cell seems to be produced. Thus, below that level of dose, the ratio of cells with no signalized DSB increase in a population of exposed cells. Accordingly, the number of DSB per cell seems to become insufficient to activate DNA repair-related signalling pathways and phosphorylation or accumulation of p53 at doses below 100 mGy of gamma-rays does not seem to be observed at the scale of a cell population [11]. Nevertheless, studies performed at low doses showed the involvement of mechanisms not directly related with DNA-repair pathways as the bystander effect [12–15]. The corresponding molecular mechanisms seem to involve mainly membrane receptors for interleukins and growth factors, GAP junctions, MAPK pathways and cyclooxygenase-2 signalling pathway. However, it is difficult to get an overview of the links between the different molecular mechanisms identified as involved in the effects of irradiation at low doses below 100 mGy. High-throughput approaches are ideal tools to understand the possible interactions between different pathways involved in the cellular response. These approaches combined with relevant experimental design

* Corresponding author at: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Dosimétrie Biologique (PRP-HOM/SRBE/LDB), BP 17, 92262 Fontenay aux Roses cedex, France. Tel.: +33 1 58 35 98 98; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: gaetan.gruel@irsn.fr (G. Gruel).

are very efficient to understand and formulate assumptions about how the involved pathways are coordinated [16–18].

Our goal is to better understand the mechanism of gene regulation recruited at low and very low doses using oligonucleotide microarray bioassays. This biotechnology allows studying simultaneously the expression level of thousands of genes to obtain a quantitative differential activity and, combined with bioinformatics tools, to propose putative regulatory mechanisms behind the changes of expression level of genes. To achieve this goal, we used a model of *ex vivo* irradiations of human whole blood. More specifically, we study the gene expression levels in the lymphocyte CD4⁺ sub-population after gamma rays exposure of whole blood with doses between 5 and 500 mGy.

2. Materials and methods

2.1. Blood samples

Venous peripheral blood samples, roughly 400 ml each, were collected from five healthy male donors. The blood collection was performed by “Etablissement Français du Sang” in accordance with the French law no. 2004-800 regarding bioethics. All blood samples tested negative for Human immunodeficiency virus-1, Human immunodeficiency virus-2, Hepatitis C virus and Hepatitis B virus. A complete blood count was made on each whole blood sample with a Hematology System ADVIA (Bayer HealthCare). All samples complied with standard lymphocyte proportion of 16–45%. Heparin was added to whole blood samples at a final concentration of 34 U ml⁻¹. Then, blood dilution was performed at 1:10 with Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies). After a series of preliminary tests (data not shown), IMDM showed the best performance in terms of conservation of the initial characteristics of blood samples as conservation of the morphology and the proportions of different cell types during the first 48 h post blood sampling and dilution. Due to the composition of IMDM, anticoagulants with a mechanism of action based on the chelation of calcium ions (such as EDTA or citrate) cannot be used. The resulting mix was then divided into 7 culture flasks of 300 cm² (Becton Dickinson), one for each studied dose (see below). Finally, blood samples were incubated overnight at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Ex vivo irradiation

Whole blood exposures were performed with a ⁶⁰Co source at a low dose rate (50 mGy min⁻¹) at the ICO-4000 facility at Fontenay-aux-Roses (France). Exposures were performed independently on blood samples of each donor. The kerma rate was determined using a Physikalisch-Technische Werkstätten (PTW) ionization chamber irradiated in the same conditions used for the samples. Uncertainty regarding the kerma rate was 4%. Exposures to doses 5, 10, 25, 50, 100 and 500 mGy and sham irradiated condition were done. After *ex vivo* irradiation, blood samples were incubated at 37 °C for 150, 300, 450 and 600 min in a 5% CO₂ atmosphere.

2.3. Cell sorting and flow cytometry

Rosette SepTM CD4 cell enrichment cocktail consists of using tetrameric antibody complexes with specific antibodies directed against CD8, CD16, CD19, CD36, and CD56 according to the manufacturer's instructions (Stem cell Technologies). Addition of this antibody cocktail to whole blood (50 μl ml⁻¹ of blood) results in cross-linking of unwanted cells with multiple RBCs to form immunorosettes that pellet by centrifugation. A density medium (Ficoll-Paque PLUS, Sigma-Aldrich) was used to collect CD4⁺ T

Table 1

List of conditions tested: doses, times post-irradiation, numbers of biological replicate and means of CD4 T cell enrichment. *Ex vivo*, irradiation was performed with a source of cobalt-60 at a low dose rate (0.05 Gray min⁻¹).

Doses (mGy)	Time post-irradiation (min)	Biological replicate	Mean of TCD4 ⁺ enrichment
0	150	n = 4	91.7 ± 3.56%
	300	n = 5	95.6 ± 3.57%
	450	n = 5	89.4 ± 5.87%
	600	n = 4	94.9 ± 2.27%
5	150	n = 4	90.1 ± 4.35%
	300	n = 4	94.6 ± 2.11%
	450	n = 5	95.0 ± 2.33%
	600	n = 3	94.9 ± 1.73%
10	150	n = 4	93.0 ± 4.35%
	300	n = 5	95.0 ± 2.11%
	450	n = 5	95.0 ± 2.33%
	600	n = 4	94.9 ± 1.73%
25	150	n = 5	90.2 ± 6.48%
	300	n = 4	91.6 ± 8.92%
	450	n = 5	91.1 ± 10.28%
	600	n = 4	93.9 ± 3.59%
50	150	n = 5	91.9 ± 5.57%
	300	n = 3	92.8 ± 5.41%
	450	n = 5	94.1 ± 4.37%
	600	n = 4	94.5 ± 2.74%
100	150	n = 4	89.4 ± 9.00%
	300	n = 5	93.5 ± 3.69%
	450	n = 5	92.5 ± 6.67%
	600	n = 4	92.4 ± 3.03%
500	150	n = 4	92.1 ± 4.94%
	300	n = 4	93.3 ± 5.81%
	450	n = 4	92.7 ± 5.83%
	600	n = 4	95.1 ± 2.37%

lymphocytes. Flow cytometry analysis was performed to validate the purity of the cell enrichment procedure. Pellets were re-suspended in PBS buffer and fluorescent antibody labelling was performed on a small aliquot with anti-CD4-R-Phycoerythrin (R-PE), anti-CD3-Tricolor (Trico), anti-CD8-Fluorescein (FITC) (Caltag Laboratories-Life Technologies). After incubation for 10 min, cells were washed and immediately analysed with a cytometer FACSsort (Becton Dickinson). Enrichment percentage value of the [CD3⁺/CD4⁺] phenotype was at least 80% for each sample as shown in Table 1.

2.4. RNA extraction

Total RNA was extracted from CD4⁺ T lymphocytes using RNeasy Mini columns from RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Quality and quantity of extracted total RNA were checked using a NanoDrop[®] ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The integrity of total RNA samples was assessed with microfluidic capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) on RNA 6000 NanoChip. The RIN (RNA integrity number) for assigning integrity values to RNA measurements was calculated for all RNA samples. All RIN values were greater than the recommended value of 7 for gene expression assays. The mean value was 8.49 (min: 7.3 and max: 9.6).

2.5. RNA amplification and microarray hybridization

A sample (0.2 μg) of the isolated total RNA was converted into Cy3-aRNA using Low RNA input linear amplification kit (Agilent Technologies). Agilent RNA Spike-In was used as positive control. These exogenous RNA derived from the Adenovirus E1A were

added to each total RNA samples with a known concentration. Verification of the aRNA quantity and Cyanine-3 incorporation was assessed using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Integrity of aRNA was controlled with the same process than total RNA except for the computation of RIN. Gene expression analysis was performed using the whole human genome 4×44k DNA microarray v.2 (Agilent Technologies) that contains oligonucleotides probes designed against 27,958 human mRNA. The amount of amplified RNA needed per labelling reaction was 1.65 µg. The purified Cy3-labelled aRNA was fragmented and hybridized on the 4×44k array with a rotation speed of 10 rpm at 65 °C for 17 h. Arrays were washed and immediately scanned with a microarray scanner (Agilent technologies, G2565AA). DNA microarray feature intensities were measured using Agilent Feature Extraction software 7.5. Quality controls of hybridizations were assessed for each hybridized array. Hybridizations not in accordance with quality criteria defined by Agilent Technologies were eliminated or repeated if possible. Of the 140 initial samples (7 doses, 4 times, 5 donors), 121 samples passed all quality controls (total RNA, aRNA and microarrays) and were used in the analysis. The final number of donors analysed at the different conditions is indicated in Table 1.

2.6. Normalization and filtering

Data of all of the 121 microarrays were normalized, filtered and analysed with R software [19]. The mean signal intensity for each spot was calculated and a log base 2 transformation was performed. The normalization step in the analysis of gene expression data was used to remove systematic biases. An average distribution was set derived from the quintiles of each array and quintiles intensities distributions were fitted as similar as possible across all arrays [20]. Agilent Feature Extraction Software flagged undetected spot and bad features allowing their exclusion from the analysis. The basic filtering criteria consisted of removing a probe when it was undetected in at least 75% of the replicates. A total of 19,246 probes were selected after filtering step. All microarray data have been submitted to the public functional genomics data repository Gene Expression Omnibus [21,22] under the accession number GSE43151.

2.7. Statistical analysis of gene expression

Identification of differentially expressed genes was performed with the Limma package [23,24] available on BioConductor [25]. For each gene in the set of all arrays a linear model was fitted [23,26]. First, a design matrix was built to indicate which RNA samples have been applied to each array. Second, matrix of contrast was designed to assess differentials of expression between each of the tested doses and the corresponding unirradiated condition for each post-irradiation time. The statistic used for significance analysis is the moderated *t*-statistic, which is computed for each probe and for each contrast. This has the same interpretation as an ordinary *t*-statistic except that the standard errors have been moderated across probes using a simple Bayesian model [23]. Moderated *t*-statistics lead to *p*-values in the same way that ordinary *t*-statistics do except that the degrees of freedom are increased, reflecting the greater reliability associated with the smoothed standard errors [27]. To reduce the risk of false-positive, *p*-values were adjusted for multiple testing issues using Benjamini and Hochberg's method to control the false discovery rate (FDR) [28]. A gene was considered differentially expressed when the corresponding adjusted *p*-value was less than 0.05 and the fold change greater than 1.5. Thus, a set of 24 lists of significantly modulated genes was obtained: one list for each combination of dose and time (6 doses and 4 post-irradiation times). These 24 lists were merged in different ways depending

on the objectives of the further analysis: global overview (quantitative and comparative) or detailed analysis (clustering analysis, functional analysis and *in silico* promoter analysis). When the 24 lists were all merged together, the resulting number of genes modulated at least at one dose and one time was 2745. Clustering was performed with gplots package [29] using Euclidian distance and complete agglomeration method.

2.8. Computation of correlation scores

For each post-irradiation time, each dose was associated with its specific set of 2745 values of fold-change corresponding to the global list of modulated genes. This association was defined as "dose profile" for a given post-irradiation time. Spearman's correlation scores were then computed for each combination of two "dose profiles" using R software. A total of 15 correlations scores were performed for each post-irradiation time.

2.9. In silico analysis of gene promoters and gene functions

Microarray bioinformatic tools and online databases were used to perform data analysis.

The main tool used was the web server ToppGene (<http://toppgene.cchmc.org>) [30]. ToppFun application of the ToppGene suite portal was used to detect relevant gene function among our gene lists and to find putative transcription factor binding sites (TFBS) in the promoter regions of the modulated genes.

3. Results

3.1. Overview of the modulations: quantitative and comparative analysis

Gene expression modifications have been investigated in CD4⁺ T lymphocytes in response to a range of low doses of ionizing radiation. In order to reveal gene alteration, a quantitative analysis considering both time post-irradiation and doses has been performed. Criteria of 1.5-fold change in transcript level and a 5% cut-off on corrected *p*-values were used to identify differentially expressed genes as described in material and methods. For each of the 6 doses, the lists of selected genes obtained for the 4 different post-irradiation times were merged. This allowed to study the total number of modulated genes for each studied dose (Fig. 1), to compare the similarities among modulated gene lists (Fig. 2), and also to analyse the Spearman's correlation scores computed between each dose at each post-irradiation time (sFig. 1).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.021>.

The number of modulated genes did not seem to change drastically with dose, even at the lowest dose of 5 mGy (Fig. 1A). The results indicated that modulations of gene expression concerned about one thousand genes at each dose and 2 times more up-regulations than down-regulations. The greatest number was seen at the highest dose of 500 mGy. At this dose, 864 genes were selected as up-regulated and 577 as down-regulated at least in one of the tested post-irradiation times. To evaluate the kinetic of the gene expression in the response to radiation stress, the analysis of variations in the number of modulated genes in function of time for each dose was performed (Fig. 1B–G). Even if the number of modulated genes during the first 10 h was broadly the same regardless of the dose, the kinetic variations of the number of modulations were not the same for each tested dose. Clear time patterns could be highlighted especially for the lowest and the highest doses. For 5 mGy, the number of modulated genes decreased significantly when post irradiation times increased (Fig. 1B). For 500 mGy and

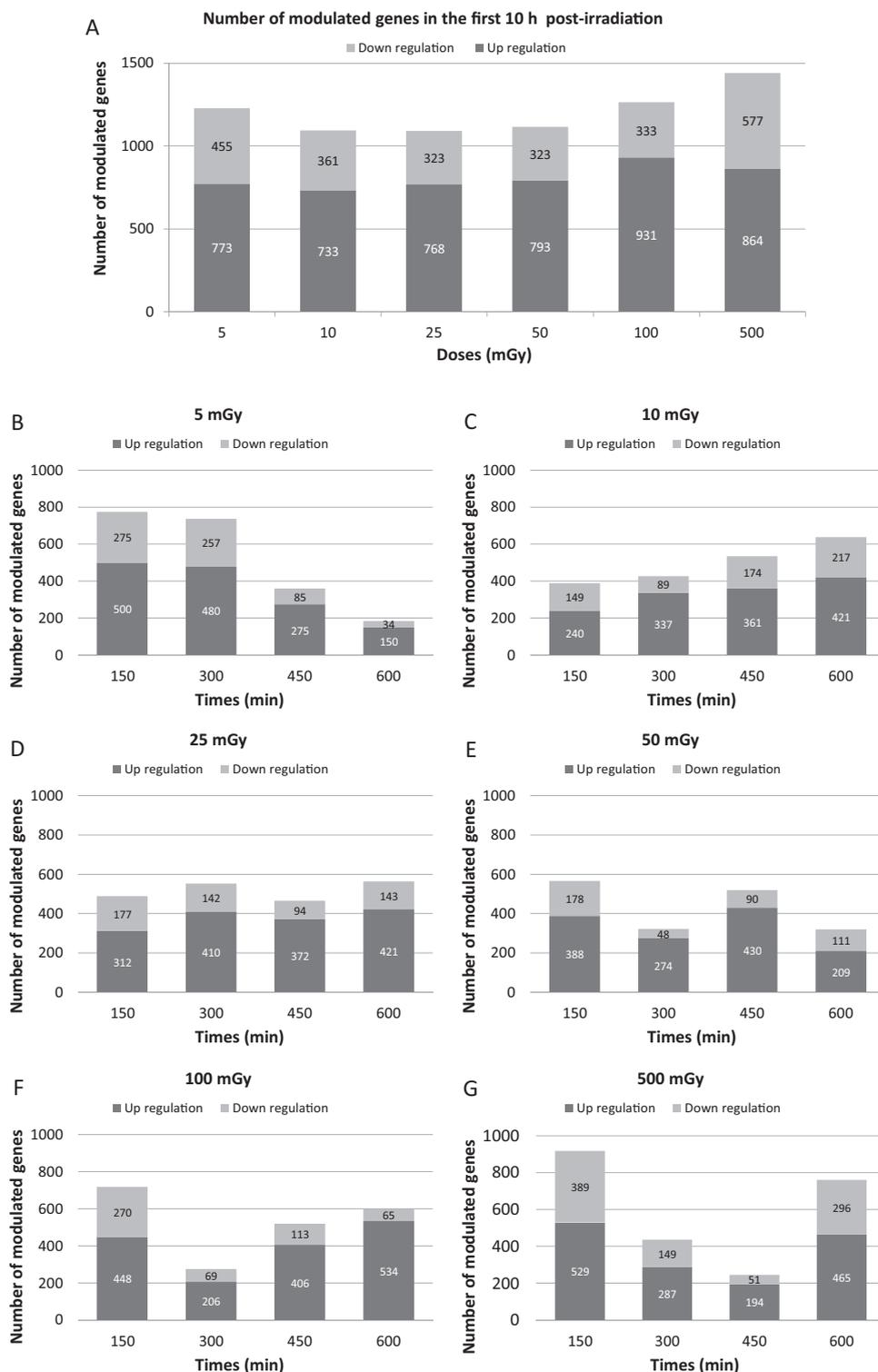


Fig. 1. Number of modulated genes in lymphocytes T CD4⁺ in response to low or very low doses of gamma rays. Up-regulated genes correspond to dark grey part of the histogram bar and down-regulated genes to the light part of the histogram bar. (A) Number of genes significantly modulated at each tested doses whatever the post irradiation times. (B) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 5 mGy. (C) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 10 mGy. (D) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 25 mGy. (E) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 50 mGy. (E) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 100 mGy. (F) Number of modulated genes for each post-irradiation time at 500 mGy.

even 100 mGy, a decline in the number of modulated genes can be observed at 300 and/or 450 min but it is followed by a renewed increase in the number of significant modulations at the later time.

To further investigate the nature of the measured responses, a comparative analysis was performed to evaluate the level of

overlap among modulated gene lists obtained for each dose (Fig. 2). The intersection matrix indicates the percentage of commonly up-regulated genes (Fig. 2A) or down-regulated genes (Fig. 2B) between two different doses. This comparison showed that overlap level accounts from around 31 to 64% for up-regulated genes

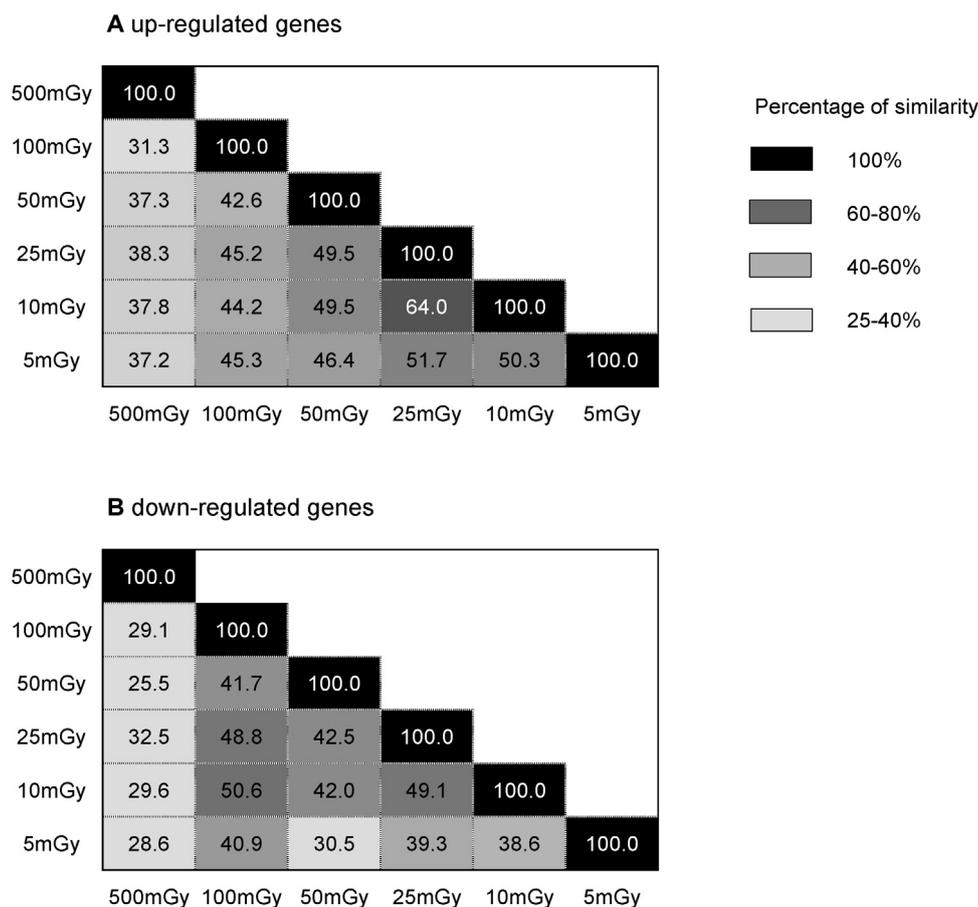


Fig. 2. Comparative analysis performed to evaluate the level of overlap among modulated gene lists obtained for each dose. (A) The intersection matrix indicates the percentage of commonly up-regulated genes between two different doses. (B) The intersection matrix indicates the percentage of commonly down-regulated genes between two different doses.

and from around 25 to 50% for down-regulated genes. The overlap increased when the dose decreased. A maximum of 64% of overlap between dose 25 and 10 mGy was measured for up-regulated genes (Fig. 2A). The same trend was observed for repression. Interestingly, the dose of 500 mGy has the lowest overlap with all the other doses. In fact, a mean of 33% of modulated genes at 500 mGy were shared with the others doses.

The analysis of the correlation scores computed between each pair of doses for each post-irradiation time (sFig. 1) showed the same trend. The correlation scores among the lowest doses (5, 10 and 25 mGy) were greater than when these low doses were compared to the highest doses (50, 100 and 500 mGy). In addition, the lowest correlation scores were generally observed when making comparisons with 500 mGy. All these trends were particularly marked for the latest post-irradiation time (600 min).

3.2. Clustering analysis

To investigate the overall cellular functions potentially involved in the response to the whole range of studied doses, the 24 lists of modulated genes (one for each combination of time and dose) were merged to provide a selection of genes of putative interest across all experimental conditions (*i.e.* at least significantly modulated at one dose and one time). This overall gene list, composed of 2745 genes, was then studied in detail using the fold change and statistical significance measured for each gene in each of the 24 conditions. This was done using a clustering of gene expression profiles combined with dedicated graphical representation (sFig. 2). Clustering

methods allowed grouping genes according to Euclidian distance calculated between expression profiles. In the present study, a profile of a gene consisted of all the fold changes measured in the 24 conditions studied. Genes within the same cluster could therefore have a common behaviour as a function of time and/or dose. sFig. 2 allowed us to easily select interesting profiles due to the combination of a clustering tree and a graphical representation of the data using a colour code for fold change and a system of symbols for the significance of the modulation (fold change greater than 1.5 and corrected *p*-value less than 0.05). The selection of profiles of interest was based on the identification in sFig. 2 of gene clusters showing a juxtaposition of different temporal conditions or/and dose conditions with a significant modulation of expression (FDR < 0.05). We assumed that this kind of measures across experimental conditions for the same gene gave more statistical strength to the putative biological meaning of its modulation and then decreased the risk to include false positive modulations for the functional analysis or *in silico* promoter analysis. Thereby, we focused on two types of profiles among the huge classification tree shown in sFig. 2.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.021>.

The first type of profile was related to genes with a clear dose effect: the higher the dose, the greater the significance of the modulation. Five areas in sFig. 2 were identified as containing clusters of genes with such profile (areas 1–5 in sFig. 2). Genes belonging to these five areas were grouped into a new list and a new clustering of the corresponding profiles was performed (sFig.3A). From the result of this new clustering, three clusters were identified

and respectively named cluster 1, cluster 2 and cluster 3 (sFig. 3A). Genes inside cluster 1 were measured, as induced only at the dose of 500 mGy and preferentially at 600 min. Genes of cluster 2 were selected as induced from the dose of 100 mGy and showed a dose effect response as their induction level was higher at 500 mGy than at 100 mGy. Genes in cluster 3 were measured as induced from the dose of 25 mGy (and even 10 mGy for FDXR) and these inductions increased up to the highest tested dose (500 mGy).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.021>.

The second type of profiles identified in sFig. 2 was related to genes that showed modulations of expression in about all tested doses. The level of modulation of these genes remained the same whatever the tested dose with a significant modulation for several consecutive times for the same dose (see U or D symbols in sFig. 2). Five areas in sFig. 2 have been identified as containing clusters of genes with such profile (areas 6–10 in sFig. 2). Genes belonging to these five areas were grouped into a new list and a new clustering of the corresponding profiles was performed (sFig. 3B). From the result of this new clustering, four clusters were identified and respectively named cluster 4, cluster 5, cluster 6 and cluster 7 (sFig. 3B). Cluster 4 included genes with an induction of their expression

measured in about all the tested doses. Interestingly for this pattern no dose effect was observed. The level of induction of these genes remained the same whatever the tested dose. Genes inside cluster 5 had the same characteristics than those in the cluster 4 except a slight decrease of the induction level at 500 mGy. Cluster 6 was a sub-version of the cluster 5. In fact the decrease of the induction level observed at 500 mGy for genes in cluster 5 became an absence of modulation for genes in cluster 6. Indeed for this cluster, no significant modulation was measured at 500 mGy specifically (sFig. 3B). The last cluster, the seventh, concerned repression of gene expression levels for all the tested doses. No dose effect could be identified for down-regulations.

For one gene of each of the seven clusters, Fig. 3 shows the fold change measured for each individual (between 3 and 5 biological replicates) and the corresponding mean profile. These seven gene profiles were chosen according to two criteria: to be a representative profile of the average profile of the cluster to which it belongs, and to correspond to a protein involved in at least one function highlighted in Section 3.3. Supplemental figures sFig. 4–10 show the profiles of all the genes included in clusters 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively. For the great majority of the probes inside clusters 1–3, measurements performed for each biological

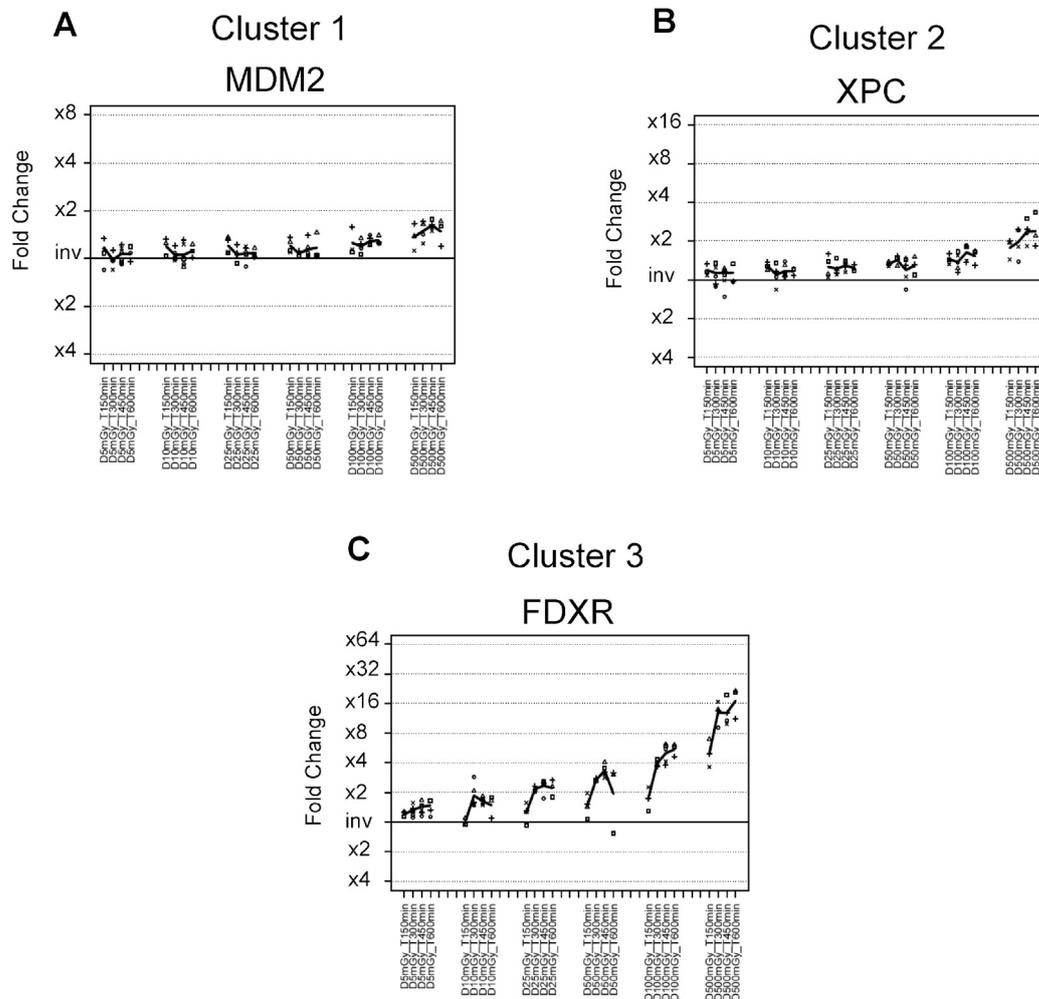


Fig. 3. Fold change measured for each of the biological replicates. The seven gene profiles were chosen according to two criteria: to be a representative profile of the average profile of the cluster to which it belongs, and to correspond to a protein involved in at least one function highlighted. Square, circle, triangle, cross type 1 and cross type 2 correspond to individual 1, 2, 3, 4 and 5 respectively. Bold black line corresponds to the mean profile calculated across all available individuals. Y axis shows the fold change between the level of expression measured in the irradiated condition and the level of expression measured in the corresponding sham-irradiated condition. Inv means invariant and corresponds to a fold change of 1. (A) Expressions profiles of MDM2 belonging to cluster 1. (B) Expressions profiles of XPC belonging to cluster 2. (C) Expressions profiles of FDXR belonging to cluster 3. (D) Expressions profiles of ND2 belonging to cluster 4. (E) Expressions profiles of MEX3D belonging to cluster 5. (F) Expressions profiles of C12ORF7 belonging to cluster 6. (G) Expressions profiles of TFAM belonging to cluster 7.

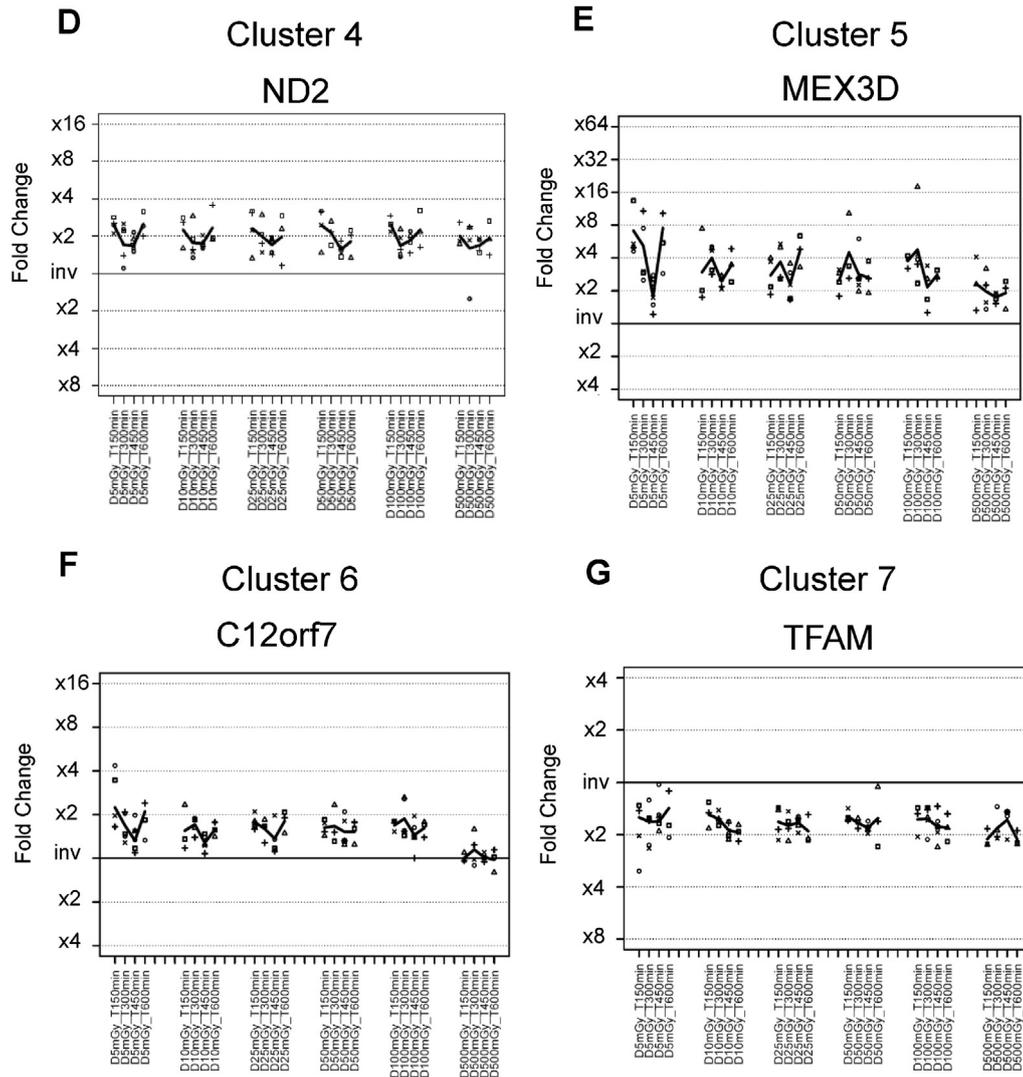


Fig. 3. (Continued).

replicate stayed close to the calculated mean modulations (sFig. 3A, 3B and 3C, and sFig. 4–6). This demonstrated the reproducibility of measurements made after 5 independent sessions of irradiation on 5 different blood samples corresponding to 5 different donors. It could be noted that the variability among inter-individual measurements increased for clusters 4–7 even if the corresponding mean modulations remained significant (sFig. 3D, 3E, 3F and 3G, and sFig. 7–10).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.021>.

3.3. Functional analysis

Based on the gene content of each of these seven clusters, a functional analysis was performed. A majority of proteins corresponding to the genes included in clusters 1–3 were known to be direct p53 effectors (NCI-Nature curated data of Pathway Interaction Database). Although the expression of genes included in these three clusters began to be induced at different dose thresholds (500 mGy for cluster 1, 100 mGy for cluster 2 and 10/25 mGy for cluster 3, see sFig. 3A), it appeared that functional categories linked to each of these clusters could overlap. In fact, enrichment in genes associated with the regulation of cell death process could be highlighted in the 3 clusters (GO: 0010941, $p=1.16E-02$, $p=1.28E-05$

and $p=2.29E-04$ for clusters 1, 2 and 3 respectively). Additionally, genes included in clusters 1 and 2, but not cluster 3, could be associated with cell cycle process (GO: 0022402, $p=3.85E-02$ and $p=3.26E-04$ for clusters 1 and 2 respectively). Clusters 2 and 3, but not cluster 1, could be linked to the response to DNA damage stimulus (GO: 0006974, $p=1.12E-09$ and $p=1.47E-04$ for clusters 2 and 3 respectively). However, specificities of each cluster could also be highlighted. Indeed, cluster 1 was specifically enriched with genes associated with the cellular macromolecule catabolic process (GO: 0044265, $p=5.28E-03$) and cluster 3 with the response to radiation (GO: 0009314, $p=1.40E-05$) and ion transport (GO: 0006811, $p=1.94E-03$).

In contrast, no overlap of functional categories was found for cluster showing modulations of expression measured in about all the tested doses (i.e. clusters 4–7 in sFig. 3B). Cluster 4 had a significant enrichment in genes associated with the biological process of cellular respiration (GO: 0045333, $p=2.34E-05$) and oxidation–reduction (GO: 0055114, $p=2.59E-03$). It could be noted that this cluster included 5 of the 13 mitochondrial genes necessary for the energy production by oxidative phosphorylation (OXPHOS process) and 20 genes whose corresponding proteins were components of the mitochondria (GO: 0044429 mitochondrial part, $p=3.16E-05$). Additionally, enrichment of gene linked to biological processes as mitochondrial ATP synthesis coupled electron

transport (GO: 0042773, $p=2.16E-05$), chromatin modification (GO: 0016568, $p=1.48E-03$) and vesicle-mediated transport (GO: 0016192, $p=2.12E-02$) was found in this cluster. No statistically significant association with a specific function could be done for clusters 5 and 6. Finally, the cluster of repressions (cluster 7) could be associated with regulation of biosynthetic process (GO: 0009891 and GO: 0009890, $p=4.09E-04$ and $p=1.77E-02$ respectively) and the response to topologically incorrect protein (GO: 0035966, $p=2.43E-05$).

3.4. *In silico* promoter analysis

In order to identify potential regulators involved in the modulations of expression measured, transcription factor binding sites (TFBS) in the promoter regions of the modulated genes were searched. Transcription factor binding sites were identified using ToppFun application of the ToppGene suite portal. We performed this analysis on each of the seven clusters identified above. Binding sites for p53 transcription factors were found to be significantly enriched in the promoter regions of genes inside cluster 1 ($p=8.88E-04$ for V\$P53_Q2 and $p=9.88E-04$ for V\$P53_DECAMER_Q2). This was expected as many of these genes were known to be p53 targets. More interestingly, binding sites for NRF1 (nuclear respiratory factor 1), NRF2/GABPA (GA binding protein transcription factor, alpha subunit) and ESRR1 (oestrogen-related receptor alpha) were found to be significantly enriched in promoters of genes belonging to cluster 4 ($p=8.84E-03$, $p=3.70E-02$ and $p=2.57E-02$ for RCGCANGCGY_V\$NRF1_Q6, V\$NRF2_Q1 and TGACCTY_V\$ERR1_Q2 respectively). These transcription factors were known to be involved in nuclear control of mitochondrial function as respiration, heme biosynthesis, and mitochondrial DNA transcription and replication. Additionally, binding sites for ELK1 were also found in promoter regions of the genes of this cluster ($p=3.26E-03$ for SCGGAAGY_V\$ELK1_Q2). This transcription factor was a member of the Ets family of transcription factors and a nuclear target for the ras-raf-MAPK signalling cascade.

In a second step, we performed this analysis of transcription factor binding sites on our initial set of 2745 genes selected to be modulated at least one dose and one time. This aimed to identify putative regulators for the modulations of gene expression observed without sub-selection of genes. This also allowed us to conduct this analysis with greater statistical power due to the larger number of promoters studied. A total of 46 different transcription factor binding sites were identified (Table 2). Among them two categories already highlighted in cluster analysis were found, but this time with much greater statistical significance. In fact binding sites for nuclear respiratory factor (NRF1 and NRF2/GABPA) were found in the promoter of a total of 240 modulated genes. Binding sites for Ets family were identified in the promoters of a total of 301 modulated genes. Thus these 2 categories of transcription factors binding sites were found in the promoters of more than 15% of the selected modulated genes.

4. Discussion

The aim of the present study was to identify putative molecular sensors that might be implied in the response of CD4⁺ lymphocyte subpopulation to an exposure to low or very low doses of ionizing radiation in a context of whole blood. To propose potential new molecular players of this response, a study of changes in the transcriptome of cells during the first 10 h after irradiation was performed. Six different doses were studied ranging from 5 mGy to 500 mGy and measurements were performed using blood samples from five different donors and exposed during five independent irradiation sessions.

Table 2

In silico identification of transcription factor binding sites among the 2745 gene set. A total of 46 different consensus sequences was found as significantly enriched ($p < 0.05$) in the list of genes selected to be modulated at least at one dose and one time.

No.	Transcription factor binding site ID	p-Value	Number of genes annotated with TFBS in list of modulated genes
1	SCGGAAGY_V\$ELK1_Q2	3.85E-08	171
2	RCGCANGCGY_V\$NRF1_Q6	4.66E-06	127
3	KRCTCANNMANAGC.UNKOWN	6.03E-06	22
4	MGGAAGTG_V\$GABP.B	8.79E-05	106
5	V\$ELK1_Q2	6.33E-04	41
6	V\$TEL2_Q6	6.74E-04	39
7	TGCGCANK.UNKOWN	9.46E-04	77
8	GGAAACGGAANY.UNKOWN	2.31E-03	22
9	RYTTCCTG_V\$SETS2.B	2.65E-03	144
10	V\$CETS1P54_Q1	3.34E-03	41
11	GTGACGY_V\$E4F1_Q6	4.25E-03	87
12	V\$AP1_Q6	4.30E-03	43
13	TTTTNNANAGCYR.UNKOWN	4.53E-03	27
14	V\$NRF2_Q1	4.89E-03	39
15	V\$AP1_Q4_Q1	5.56E-03	43
16	CGGAARNGGCNG.UNKOWN	5.75E-03	11
17	CRGAARNNNCGA.UNKOWN	7.22E-03	11
18	V\$NRF1_Q6	8.62E-03	36
19	ACTAYRNNCCCR.UNKOWN	8.73E-03	58
20	V\$P53_DECAMER_Q2	9.40E-03	41
21	V\$GABP.B	1.12E-02	36
22	V\$EGR3_Q1	1.26E-02	15
23	GGTGGRR_V\$PAX4_Q3	1.30E-02	167
24	V\$AP1_Q6_Q1	1.52E-02	40
25	V\$ZIC2_Q1	1.72E-02	38
26	V\$P300_Q1	2.26E-02	36
27	GCGSCMNTTT.UNKOWN	2.31E-02	13
28	GATTGGY_V\$NFY_Q6_Q1	2.59E-02	141
29	V\$IK3_Q1	2.62E-02	33
30	V\$E2F1_Q6_Q1	2.68E-02	35
31	CCGNMNTNACG.UNKOWN	2.79E-02	14
32	V\$MAF_Q6	2.94E-02	39
33	V\$AP1_Q2	2.95E-02	41
34	V\$MZF1_Q2	3.09E-02	35
35	WCAANNNYCAG.UNKOWN	3.31E-02	35
36	V\$NFMUE1_Q6	3.54E-02	35
37	V\$E2F_Q2	3.70E-02	25
38	V\$NFAT_Q4_Q1	3.92E-02	38
39	ATCMNTCCGY.UNKOWN	3.99E-02	10
40	V\$E2F1_Q4	4.17E-02	34
41	V\$CP2_Q1	4.31E-02	37
42	STTTCRNTTT_V\$IRF_Q6	4.53E-02	29
43	V\$MTF1_Q4	4.58E-02	37
44	V\$ELK1_Q1	4.60E-02	35
45	V\$MAZR_Q1	4.60E-02	33
46	V\$MYOD_Q1	4.74E-02	36

The choice of the cellular model was motivated by several reasons: lymphocytes are easily obtainable human primary cells; it is possible to collect samples from several donors fairly easily to study inter-individual variations of the response; and their *ex vivo* irradiation is quite simple. In addition, this cell type is naturally quiescent in absence of stimulation and thus allows the study of response to genotoxic stress in a homogeneous cell population in terms of cell cycle. The selection of a lymphocyte subtype allows analysis of a more consistent cellular stress response. Indeed it seems reasonable to assume that the response to be studied will be more homogeneous if the cell types within the analysed population have little or no difference. All these aspects are essential especially in the study of low-intensity stress such as the low doses of ionizing radiation used in the present study.

It is well known that ionizing radiation induces gene expression modulations. Several studies have described the existence of gene modification after an *ex vivo* irradiation of mammalian cell, at doses as low as 10 mGy [17,18,31–33]. Transcriptomic approaches using

oligonucleotide microarrays have been accepted as a relevant tool to observe global gene expression in response to a particular stimulus provided that appropriate analytical methodology was applied. Several proceedings were implemented in the present study to control and prevent, as much as possible, the statistical effect due to the contrast between the number of biological replicates and the high number of statistical hypothesis tested in parallel. The main risk of this issue was the increase of the rate of false positives or false negatives in the selection of statistically significant modulated genes. To control this risk, a combination of two strategies was used. The first strategy was a correction of *p*-values (FDR) in order to reduce the risk of false positive without greatly increasing the risk of false negative. This allowed us to select an initial list of 2745 probes corresponding to all the genes significantly modulated in at least one condition (one dose and one time). The second strategy was to identify within the general clustering tree of 2745 probes (sFig. 2) clusters of genes showing a juxtaposition of different temporal or/and dose conditions with a significant modulation of expression (FDR < 0.05). We assumed that this kind of measures across experimental conditions for the same gene gave more statistical strength to the putative biological meaning of its modulation and then decreased the risk to include false positive modulation for the functional analysis or *in silico* promoter analysis. From our knowledge, the present study of global transcriptional profiling was the first one that combined a kinetic analysis of the response (150, 300, 450 and 600 min) on a dose range including very low-dose exposures (5, 10, 25, 50, 100 and 500 mGy). This particular design allowed us to focus only on genes with a robust response across experimental conditions and to exclude those with significant but erratic modulations. In a recent work of Manning et al. [34], the expression of eight genes included in our selection (MDM2 and SESN1 from cluster 1, GADD45A and CCNG1 from cluster 2 and PHPT1, DDB2, FDXR and BBC3 from cluster 3) was measured by multiplex quantitative RT-PCR. The cell type (whole human blood) and irradiation conditions (250 kVp X-ray with doses ranging from 5 to 4000 mGy) were close to those used in our study and their measurements were very close to our results. This seems to confirm that the analytical strategy that we used to treat our microarray data was adequate.

Seven clusters of genes with different kinds of patterns of dose response were then identified. They could be separated into two groups. The first one (clusters 1–3) involved genes with a clear dose effect: the higher the dose, the greater the significance of the modulation. Any gene of this group had a significant modulation of expression at 5 mGy, and only 1 on 68 (FDXR) had significant modulations starting at 10 mGy. The second one (clusters 4–7) corresponded to genes with modulations of expression measured in about all the tested doses. For this group, the level of modulation of these genes remained the same whatever the tested dose with a significant modulation for several consecutive times for the same dose. In the same way that these two groups involved genes with different dose effect behaviours, functions and mechanisms associated with each of these groups seemed very different. In fact 51%, 83% and 86% of genes included in clusters 1, 2 and 3 respectively are known or suspected to have a regulation of their expression dependent on p53. We did not identify any known links between p53-dependent response and genes in clusters 4–7. Considering that the mean number of DSB induced per Gy of cobalt-60 is between 20 and 40 DSB per cell [10,35,36], with 5 mGy, we can expect 1 DSB in one or two cells on 10. The absence of p53 related genes modulated at 5 mGy, seems to indicate that the level of damage is not sufficient to activate a cellular response dependent on DSB. This was also supported by the literature and more specifically by the observations of Suzuki et al., which did not observed phosphorylation or accumulation of p53 at doses below 100 mGy of gamma-rays [11]. However, genes belonging to clusters 4–7 had

significant modulation at 5 mGy and represented more than 80% of the genes selected. In the light of the results of the present study, it appears that regulatory mechanisms could be activated even at doses as low as 5 mGy. More likely, the sensors involved are activated by mechanisms other than the detection of DSB. The results presented here demonstrate that a large part of the response remains to explore to find potential regulators of the gene network after exposure to very low doses of IR. In this sense, new hypotheses seem to emerge from the analysis of cluster 4. Unexpectedly, this cluster contains genes with induction starting at the lowest tested dose of 5 mGy and levels of modulation which remain constant regardless of the dose. Analysis of the promoter regions of genes of this cluster highlighted enrichment in binding sites for two classes of transcription factors.

The first class of transcription factors was known to be involved in nuclear control of mitochondrial function as respiration, heme biosynthesis, and mitochondrial DNA transcription and replication. Consistently, among a total of 199 genes in cluster 4, 20 genes corresponded to proteins that were directly related to mitochondrial function. If we consider the whole list of 2745 modulated genes, this number increases up to 124, including 10 of the 13 mitochondrial genes necessary for the OXPHOS process and involved in adenosine triphosphate (ATP) generation. The effects of ionizing radiation on mitochondrial activities have been already shown at higher doses (2 or 4 Gy) through the observation of mitochondrial genes deregulations after exposure [37]. Gong et al. also demonstrated that adenosine triphosphate levels and the mitochondrial membrane potential were increased significantly after irradiation, while mitochondrial mass and mitochondrial DNA levels remained unaffected. Our observations seem to provide new evidences for an effect of low and very low doses of γ -irradiation on the regulation of gene needed for mitochondrial processes. More generally, the induction of the mitochondrial genes has been mainly observed in correlation with an increase of energy production by oxidative phosphorylation of the cells [37]. Nishimaki et al. [38] and Tsukimoto et al. [39] showed that γ -rays (0.1–1 Gy) could induce ATP release from the exposed cells. They concluded that release of extracellular nucleotides, such as ATP, from cells could activate MAPK3 and MAPK1 (alias ERK1 and ERK2 respectively) and regulate the expression of intracellular antioxidants through activation of P2 receptors.

Interestingly, the second class of transcription factors found in the present study is related to ETS factors (ELK1, TEL2 and ETS2). The ETS transcription factor family was defined by the conserved ETS domain. ELK1, a member of the ETS factor family, is a target of the MAPK pathway. A study has found by a proteomic approach, that ELK1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, would be relevant candidate biomarkers for exposure at doses below 100 mGy [40]. More specifically Suzuki et al. [11] had shown that doses of 20 mGy and 50 mGy induced phosphorylation of MAPK3 and MAPK1 (alias ERK1 and ERK2 respectively) as efficiently as higher doses of X-rays, whereas the p53 protein level was not changed by doses below 500 mGy. These observations seem to be consistent with our results. Indeed, the large number of potential ELK1, ELF1, and TEL2 target genes found differentially regulated at low doses of ionizing radiation, could indicate the potential involvement of MAPK pathway in the gene regulatory network involved. Future work would investigate if phosphorylation of MAPK, increase of the mitochondrial activity and increase of the extracellular level of ATP can be detected after doses as low as 5 mGy.

The results presented here are based on robust statistical analysis of modulations of gene expressions measured during the first 10 h following exposure to dose ranging from 5 mGy to 500 mGy using blood samples from five different donors. The analysis confirmed, in our model, the involvement of signalling pathways partly related transcription factor p53 response from 25 mGy. This

involvement became very clear at doses equal or greater than 100 mGy. Interestingly, an activation of gene regulation starting at the lowest tested dose of 5 mGy, with modulation levels which remains constant regardless of the dose, has also been highlighted. The detailed analysis of this response at very low doses (<25 mGy) uncovers molecular players such as MAPK, mitochondria and energy production that seem to act together. Thus in the light of all these results it seems of major interest to further investigate the possible links between these different mechanisms and their roles in the network of molecular interactions involved in response to very low doses of ionizing radiation.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Institut de Radioprotection et Sureté Nucléaire and Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines. The authors are grateful to Ms. M. Bauman for her technical assistance in irradiation procedures. We also acknowledge P. Laloi for his support.

References

- [1] UNSCEAR, Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations, Vienna, Austria, 2008.
- [2] S.A. Amundson, M. Bittner, A.J. Fornace, Functional genomics as a window on radiation stress signaling, *Oncogene* 22 (2003) 5828–5833.
- [3] P. Dent, A. Yacoub, J. Contessa, R. Caron, G. Amorino, K. Valerie, et al., Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways, *Radiat. Res.* 159 (2003) 283–300.
- [4] P.J. Coates, S.A. Lorimore, E.G. Wright, Cell and tissue responses to genotoxic stress, *J. Pathol.* 205 (2005) 221–235.
- [5] T. Ohnishi, E. Mori, A. Takahashi, DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes, *Mutat. Res.* 669 (2009) 8–12.
- [6] E. Mladenov, G. Iliakis, Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways, *Mutat. Res.* 711 (2011) 61–72.
- [7] L.C. Huang, K.C. Clarkin, G.M. Wahl, Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 4827–4832.
- [8] W.G. Nelson, M.B. Kastan, DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 1815–1823.
- [9] T. Criswell, K. Leskov, S. Miyamoto, G. Luo, D.A. Boothman, Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation, *Oncogene* 22 (2003) 5813–5827.
- [10] K. Rothkamm, M. Löbrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 5057–5062.
- [11] K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe, Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 5396–5401.
- [12] E.I. Azzam, J.B. Little, The radiation-induced bystander effect: evidence and significance, *Hum. Exp. Toxicol.* 23 (2004) 61–65.
- [13] M.A. Chaudhry, Bystander effect: biological endpoints and microarray analysis, *Mutat. Res.* 597 (2006) 98–112.
- [14] H. Zhou, V.N. Ivanov, J. Gillespie, C.R. Geard, S.A. Amundson, D.J. Brenner, et al., Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 14641–14646.
- [15] F.M. Lyng, P. Maguire, B. McClean, C. Seymour, C. Mothersill, The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects, *Radiat. Res.* 165 (2006) 400–409.
- [16] S.A. Amundson, M. Bittner, Y. Chen, J. Trent, P. Meltzer, A.J. Fornace, Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses, *Oncogene* 18 (1999) 3666–3672.
- [17] N. Franco, J. Lamartine, V. Frouin, P. Le Minter, C. Petat, J.-J. Leplat, et al., Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes, *Radiat. Res.* 163 (2005) 623–635.
- [18] G. Gruel, P. Voisin, A. Vaurijoux, S. Roch-Lefevre, E. Grégoire, P. Maltere, et al., Broad modulation of gene expression in CD4⁺ lymphocyte subpopulations in response to low doses of ionizing radiation, *Radiat. Res.* 170 (2008) 335–344.
- [19] R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009.
- [20] G.K. Smyth, T. Speed, Normalization of cDNA microarray data, *Methods* 31 (2003) 265–273.
- [21] R. Edgar, M. Domrachev, A.E. Lash, Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 207–210.
- [22] T. Barrett, D.B. Troup, S.E. Wilhite, P. Ledoux, C. Evangelista, I.F. Kim, et al., NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—10 years on, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D1005–D1010.
- [23] G.K. Smyth, Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3 (2004) (Article 3).
- [24] G.K. Smyth, Limma: linear models for microarray data, in: R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (Eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using {R} and Bioconductor*, Springer, New York, 2005, pp. 397–420.
- [25] R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, et al., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.* 5 (2004) R80.
- [26] Y.H. Yang, T. Speed, Design and analysis of comparative microarray experiments, in: T. Speed (Ed.), *Statistical Analysis of Gene Expression Microarray Data*, Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, 2003, pp. 35–92.
- [27] R.A. Irizarry, From CEL files to annotated lists of interesting genes, in: R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, R. Irizarry, S. Dudoit (Eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, Springer, New York, 2005, pp. 431–442.
- [28] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B: Stat. Methodol.* 57 (1995) 289–300.
- [29] G.R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker, R. Gentleman, W.H.A. Liaw, T. Lumley, et al., gplots: Various R programming tools for plotting data. Available: <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>. Accessed 2013 Apr 19.
- [30] J. Chen, E.E. Bardes, B.J. Aronow, A.G. Jegga, ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) W305–W311.
- [31] L.-H. Ding, M. Shingyoji, F. Chen, J.-J. Hwang, S. Burma, C. Lee, et al., Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses, *Radiat. Res.* 164 (2005) 17–26.
- [32] K. Knops, S. Boldt, O. Wolkenhauer, R. Kriehuber, Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry, *Radiat. Res.* 178 (2012) 304–312.
- [33] S.A. Amundson, K.T. Do, A.J. Fornace, Induction of stress genes by low doses of gamma rays, *Radiat. Res.* 152 (1999) 225–231.
- [34] G. Manning, S. Kabacik, P. Finnon, S. Bouffler, C. Badie, High and low dose responses of transcriptional biomarkers in ex vivo x-irradiated human blood, *Int. J. Radiat. Biol.* (2013), in press.
- [35] S.V. Costes, I. Chiolo, J.M. Pluth, M.H. Barcellos-Hoff, B. Jakob, Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization, *Mutat. Res.* 704 (2010) 78–87.
- [36] B. Stenerlöw, K.H. Karlsson, B. Cooper, B. Rydberg, Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: results for cells deficient in nonhomologous end joining, *Radiat. Res.* 159 (2003) 502–510.
- [37] B. Gong, Q. Chen, A. Almasan, Ionizing radiation stimulates mitochondrial gene expression and activity, *Radiat. Res.* 150 (1998) 505–512.
- [38] N. Nishimaki, M. Tsukimoto, A. Kitami, S. Kojima, Autocrine regulation of γ -irradiation-induced DNA damage response via extracellular nucleotides-mediated activation of P2Y6 and P2Y12 receptors, *DNA Repair (Amst.)* 11 (2012) 657–665.
- [39] M. Tsukimoto, T. Homma, Y. Ohshima, S. Kojima, Involvement of purinergic signaling in cellular response to gamma radiation, *Radiat. Res.* 173 (2010) 298–309.
- [40] F. Marchetti, M.A. Coleman, I.M. Jones, A.J. Wyrobek, Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 82 (2006) 605–639.