

NNT : 2016SACLS077

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SURETE NUCLEAIRE

ECOLE DOCTORALE N° 569 ITFA
Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Toxicologie

Par

Stefania Musilli

Etude des mécanismes d'action du Strontium 90 sur le système immunitaire à la suite
d'une contamination chronique

Thèse présentée et soutenue à l'IRSN, Fontenay-aux-roses le 30 Mars 2016 :

Composition du Jury :

Pr. Armelle Baeza-Squiban	Université Paris Diderot	Rapporteur
Dr. Francis Herodin	Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA)	Rapporteur
Pr Chantal Houée-Levin	Université Paris Sud	Présidente du jury
Pr. Xavier Coumoul	Université Paris Descartes	Examineur
Pr. Saadia Kerdine-Römer	Université Paris Sud	Co-directrice de thèse
Dr. Jean-Marc Bertho	Institut de radioprotection et de sureté nucléaire (IRSN)	Directeur de thèse

Si haute est la montagne, n'oublie jamais qu'il y a toujours
un chemin qui mène au sommet - Proverbe afghan

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour l'évaluation de ce travail. Un grand merci aux rapporteurs, le Dr. Francis Herodin et le Pr. Armelle Baeza pour le temps que vous avez accordé à la relecture de ce manuscrit. Je remercie également le Pr. Chantal Houée-Levin et le Pr. Xavier Coumoul pour leur présence en tant qu'examineurs dans ce jury.

Je remercie également les personnes de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire sans qui, ce travail n'aurait été possible. Merci au Dr. Jocelyne Aigueperse pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du Pôle de Radioprotection de l'Homme ainsi qu'au Dr. Marc Benderitter et au Dr. Laurence Roy du Service de radiobiologie et d'Epidémiologie. Enfin, un grand merci au Dr. Karine Tack pour son accueil au sein du Laboratoire de Radiotoxicologie expérimentale.

Je remercie chaleureusement le Pr. Saadia Kerdine-Römer pour avoir co-encadré cette thèse. Merci pour les échanges scientifiques toujours très enrichissants que nous avons eu au cours de ces 3 années et pour tes précieux conseils. Ce n'était pas toujours facile de trouver des disponibilités pour se voir mais on y sera arrivées au moins pour la date la plus importante. Un grand merci pour tout.

Un immense merci au Dr. Jean-Marc Bertho pour m'avoir encadrée au cours de ces 3 longues années et demi de thèse. Merci pour ta patience, ton écoute, tes conseils, pour toutes les discussions scientifiques (et moins scientifiques), pour m'avoir permis de devenir une pro des ELISA et surtout pour la confiance que tu m'as accordée dès le M1. Pour tout ça, encore merci !

Mes remerciements vont également vers l'équipe technique de choc du LRTOX.

Merci à Line Manens pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble, pour les discussions toujours très passionnantes et surtout pour le désormais célèbre Vendredi paillettes qui, j'en suis sûre, va bientôt devenir une mode au sein de tout le SRBE.

Un grand merci aussi à Céline Gloaguen pour ta bonne humeur, ton calme à toute épreuve, pour ton super biceps de compét. C'était vraiment un plaisir de partager cette dernière année avec toi.

Je tiens aussi à remercier Dimitri Kerdlsi...Kerseld...Kerdlizds...Kereselidze pour les supers mercredi midi sportifs, pour ne m'avoir jamais mis de bâtons dans les roues et pour avoir eu la patience de supporter les nombreuses blagues sur les chauves !

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Christelle Elie. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble, pour avoir été là quand j'en avais besoin, pour m'avoir supportée dans les bonnes et les moins bonnes périodes, surtout au cours de ces derniers mois ! Merci pour avoir écouté toutes mes divagations, tu as été mon meilleur public depuis nos débuts ensemble au LRTOX il y a 3 ans (finalement cette thèse c'est un peu comme si tu l'avais faite aussi ☺). Pour tout ça un très grand merci !!!

Et évidemment je n'oublie pas de remercier Yohann Phalente, c'était un plaisir de connaître un grand monsieur comme toi.

Un grand merci aux chercheurs du LRTOX. Merci au Dr. Philippe Lestavel pour tes encouragements surtout dans cette dernière ligne droite, pour les bons moments passés à Porto (un peu de poulpe ?) et pour toutes les discussions et conseils au cours de ces années. Un grand merci aussi au Dr. Maâmar Souidi pour ses nombreux encouragements et ses conseils. Mes remerciements vont également aux Dr. Tény Ebrahimian, Yann Guéguen, Chrystelle Ibanez et Audrey Legendre pour leur support et les discussions horoscope du midi.

Un énorme merci au Dr. Christelle Durand pour toutes nos conversations, pour tes conseils, ton écoute et pour ta voiture ☺. Tu n'étais qu'une jeune thésarde quand on s'est connues et j'ai vraiment été heureuse de te retrouver en tant que chercheuse et surtout qu'on apprenne à se

connaître un peu plus qu'entre un microtome et un cryostat. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et pour tous ceux à venir.

Merci aussi à la team des EllesRTOX, Le Dr. Clélia Le Gallic et le Dr. Clémentine Poisson. A Clémentine, merci pour ton aide précieuse en début de thèse et pour les bons moments partagés ensemble dans notre super bureau (mais que se passe-t-il dans le Monde ?). Un grand merci au Dr. Clélia Le Gallic, co-thésarde et co-runneuse ! A quand le marathon main dans la main ? Merci pour tous ce que nous avons partagé, au labo et en dehors, pour la joie de vivre que tu as apportée au labo, et pour avoir fait de la couleur verte une couleur de référence !

Merci aussi aux (nombreux) stagiaires croisés au cours de ces années avec une pensée toute particulière pour Cécile Culeux, Sylvie Phung, Brice Saint-Marc et Baptiste Murgues. Vous êtes devenus bien plus que de simples connaissances, c'était un réel plaisir de partager ces périodes (plus ou moins longues) avec vous. Il m'en faudrait des lignes pour lister tous les bons moments passés ensemble, vous avez su apporter la bonne humeur au labo !

Une mention spéciale pour Céline Grand et sa plus que précieuse aide technique au cours de cette dernière année. Maintenant le strontium et les PCR n'ont plus de secret pour toi ! Je n'y serais sans doute jamais arrivée sans toi, je te souhaite vraiment que le meilleur pour ta future carrière, je suis certaine que tu y arriveras !

Et évidemment, mes remerciements les plus chaleureux vont au Dr² Marie Legrand. Tu as été à la fois ma psychologue, ma co-thésarde, ma colocataire de bureau et même ma voisine ! Il me faudrait plus que quelques lignes pour te remercier de tous les moments passés ensemble, au labo, au bureau et en dehors. Merci pour toutes les nombreuses conversations et débats qu'on a pu avoir (toujours scientifiques et très philosophiques), pour avoir toujours été là pour moi, pour nos marrades, pour les galères de la fac, pour nos pauses intellectuelles Youtube et Topito, pour nos instants tisanes, clémentines, granola, mikado et chamallows (dis donc qu'est-ce qu'on mange dans ce labo...), pour nos craquages de fin d'après-midi, surtout pendant la dernière ligne droite, et pour tellement d'autres choses qui nécessiteraient plus d'une page pour être listées. De Pierrelatte à Porto, de Dunkerque à l'Italie on en aura vu du pays et j'espère qu'on en verra encore d'autres ! Cette thèse n'aurait décidément pas été la même sans toi, on a commencé ensemble et, on en a souvent plaisanté, on aura fini ensemble... On n'aurait vraiment pas pu faire mieux que soutenir le même jour, mais bon, soyons indulgentes, 1 jour d'intervalle ce n'est pas si mal non plus. Finalement on n'est pas les meilleures thésardes du monde pour rien !! Pour tout ça et pour plus encore, ma ch'ti Marie je ne te dirais jamais assez MERCI.

Merci également aux futurs docteurs Stephane Grison et Dalila Lebsir. Courage à vous, vous allez voir, finalement ce n'est pas si terrible que ça. Dalila, c'était un plaisir de partager le bureau des meilleures thésardes pendant ces derniers mois, maintenant t'as la pression ☺.

Un grand merci également aux post-docs. Merci au Dr. Ghada Elmhiri, on n'aura pas eu le temps de beaucoup se connaître mais en tout cas garde ton optimisme à toute épreuve et surtout tes paillettes même si ce n'est pas que le vendredi. Muito obrigado au Dr. Juliana Viera-Dias, c'était un vrai plaisir de partager cette dernière année avec toi. Garde ta bonne humeur brésilienne et ta pêche (même quand le multiplex ne marche pas), je te souhaite que du bonheur et tout le meilleur pour la suite...Boa sorte ! Un merci plus que chaleureux au Dr. (BHE) Florence Miller. Même si on était en compot' pour gagner le soir (et t'as souvent gagné !) c'était malgré tout que des bons moments. Je te remercie vraiment pour tous tes encouragements, pour ton support et pour toutes les discussions qui m'ont souvent remonté le moral. Garde cette bonne humeur face à toute épreuve ! Je te souhaite que des bonnes choses pour ton avenir, le meilleur est devant toi (n'oublie pas, best post doc ever ever ever ;)).

Je tiens également à remercier Johanna Stéfani. Merci pour t'être occupée de moi lors de ma première année de thèse, pour ton aide et ton soutien et pour toutes nos conversations. J'espère que ces remerciements arriveront jusqu'en Suisse !

Un grand merci également au Dr. Marième Wade-Gueye pour avoir partagé avec moi un peu de ses connaissances sur l'os.

Merci aussi au Dr. Nicholas Synhaeve pour m'avoir initiée au monde du Strontium 90 et pour son encadrement au cours du M1.

Mes remerciements vont également à Veronique Joffres pour son assistance au cours de ces années de thèse. Et je tiens à remercier tout particulièrement Sandra Barth, ma co-coach adorée <3. C'était un plaisir de partager ces années en ta compagnie. Je compte sur toi pour le coaching du mercredi, fais les souffrir encore un peu...qu'eeeeeesst-ce qu'on veut ???!!!!!!

Je tiens à remercier également les membres du Laboratoire de Dosimétrie Biologique et en particulier le Dr. Sandrine Roch-Lefevre et Cécile Martin pour m'avoir permis de compter des foci encore et encore !

Un merci tout particulier à Benoit Usunier, merci pour ton sourire à toute épreuve, pour ton optimisme et pour ton infinie discrétion. C'était un plaisir de te retrouver pour la thèse. Merci pour avoir redécoré mon bureau avec tant de goût chaque fois. Vraiment je te souhaite une belle fin de thèse, finalement t'es pas si loin dans la liste ! Courage pour cette dernière ligne droite, tu sauras y arriver j'en suis sûre.

Muchas gracias au Dr. Alhondra Solares-Perez, merci pour tes encouragements, pour ton optimisme et ton calme. Tu as su apporter de l'énergie positive même dans les moments les plus difficiles...Merci !

Merci également aux autres doctorants Cyprien Jaillet, Amélie Fréneau et Aurélie Vaurijoux et aux tout récents docteurs Elodie Mintet (Kassos for ever !) et Sergey Zhivin pour leur soutien au cours de ces 3 années.

Un merci chaleureux au Dr. Fabien Panza pour toutes nos discussions et pour les déjeuners du jeudi.

Je n'oublie évidemment pas mes amis qui ont su me soutenir dans les bons et mauvais moments au cours de ces 3 années !!

Et enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille qui me supporte depuis toutes ces années (et qui n'a pas le choix). Un grand merci à elle(s).

A tutti, grazie dal più profondo del cuore.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	12
Liste des figures.....	15
Liste des tables	18
AVANT PROPOS	19
INTRODUCTION	22
1. Le Strontium 90	23
1.1. Généralités	23
1.1.1. Propriétés physico-chimiques	23
1.1.2. Utilisations du Strontium	23
1.1.3. Propriétés radioactives	23
1.2. Principales sources de ⁹⁰ Sr dans l'environnement	24
1.2.1. Les rejets des effluents liquides des centrales nucléaires	24
1.2.2. Les essais nucléaires atmosphériques	25
1.2.3. Les accidents nucléaires	25
1.2.3.1. L'accident de Kyshtym	25
1.2.3.2. L'accident de Tchernobyl	26
1.2.3.3. L'accident de Fukushima	26
1.3. Biocinétique	26
1.3.1. Voies d'exposition.....	26
1.3.2. Accumulation dans l'organisme	27
1.3.2.1. Les modèles de biocinétique	27
1.3.2.2. Absorption	29
1.3.2.3. Distribution.....	29
1.3.2.4. Elimination	30
1.4. Les effets sur la santé	31
1.4.1. Données épidémiologiques.....	31
1.4.1.1. Les effets cancéreux.....	31
1.4.1.2. Les effets non cancéreux.....	32
1.4.2. Etudes expérimentales.....	33
1.4.2.1. Chez l'animal	34
1.4.2.1.1. Contamination aiguë	34
1.4.2.1.2. Contamination chronique	35
1.4.2.2. Etudes <i>in vitro</i>	36
1.5. Objectifs de la thèse	37
2. Les systèmes physiologiques pouvant être impactés par le ⁹⁰Sr.....	38
2.1. La physiologie osseuse	38
2.1.1. Généralités.....	38
2.1.1.1. Les différents types d'os et leur structure.....	38
2.1.1.2. Architecture	38
2.1.1.3. Les cellules osseuses	40
2.1.1.3.1. Les ostéoblastes	40
2.1.1.3.2. Les ostéoclastes	42
2.1.2. La croissance osseuse et le remodelage osseux.....	43
2.1.2.1. La croissance osseuse	43
2.1.2.2. Le remodelage osseux	45
2.1.3. Effets d'une irradiation sur l'os.....	46
2.2. Le système hématopoïétique.....	47
2.2.1. Généralités.....	47
2.2.2. L'hématopoïèse.....	48
2.2.2.1. Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques	48
2.2.2.2. La régulation de l'hématopoïèse	49
2.2.2.3. Effets de l'irradiation sur l'hématopoïèse	51

2.3.	Le système immunitaire.....	52
2.3.1.	Généralités.....	52
2.3.2.	Les cellules de l'immunité.....	52
2.3.2.1.	Les granulocytes.....	53
2.3.2.1.1.	Les neutrophiles.....	53
2.3.2.1.2.	Les éosinophiles.....	53
2.3.2.1.3.	Les basophiles et les mastocytes.....	54
2.3.2.2.	Les monocytes et les macrophages.....	54
2.3.2.3.	Les cellules lymphoïdes.....	54
2.3.2.3.1.	Les lymphocytes T.....	55
2.3.2.3.2.	Les lymphocytes B.....	56
2.3.3.	La réponse immunitaire.....	59
2.3.3.1.	La réponse immunitaire innée.....	59
2.3.3.2.	La réponse immunitaire adaptative.....	59
3.	Les cellules souches pouvant être impactées par le ⁹⁰Sr.....	62
3.1.	Les cellules souches : définition.....	63
3.2.	Les cellules souches mésenchymateuses.....	63
3.2.1.	Généralités.....	63
3.2.2.	Différenciation des CSM : la voie Wnt/ β -caténine.....	65
3.2.3.	Fonctions et applications cliniques.....	67
3.2.3.1.	CSM et thérapeutique.....	67
3.2.3.2.	Mode d'action.....	68
3.3.	Les cellules souches hématopoïétiques.....	69
3.3.1.	Généralités.....	69
3.3.2.	Caractéristiques fonctionnelles.....	69
3.3.3.	Caractéristiques phénotypiques.....	70
3.3.4.	La niche hématopoïétique.....	70
3.3.4.1.	Les fonctions de la niche.....	70
3.3.4.2.	Les composants cellulaires et moléculaires de la niche.....	72
4.	Les mécanismes d'action et conséquences cellulaires des rayonnements ionisants.....	74
4.1.	Le stress oxydant.....	74
4.1.1.	Définition.....	74
4.1.2.	Le système antioxydant.....	75
4.1.2.1.	Les antioxydants enzymatiques.....	75
4.1.2.2.	Les antioxydants non-enzymatiques : le glutathion.....	75
4.1.2.3.	Le facteur de transcription Nrf2.....	77
4.1.3.	Les conséquences du stress oxydant.....	78
4.2.	Les dommages à l'ADN.....	79
4.2.1.	Généralités.....	79
4.2.2.	Les cassures double-brin et signalisation.....	80
4.2.3.	La réparation.....	81
4.2.3.1.	La voie de la recombinaison homologue.....	82
4.2.3.2.	La voie de la jonction d'extrémités non homologues.....	82
4.2.4.	Conséquences des dommages à l'ADN.....	83
4.3.	La mort cellulaire.....	84
4.3.1.	Généralités.....	84
4.3.2.	Les types de mort cellulaire.....	85
4.3.2.1.	L'apoptose.....	85
4.3.2.2.	La nécrose.....	87
4.3.2.3.	L'autophagie.....	88
4.4.	La sénescence.....	90
4.4.1.	Généralités et définition.....	90
4.4.2.	Les différents types de sénescence cellulaire.....	91
4.4.2.1.	La sénescence répllicative.....	91
4.4.2.2.	La sénescence en réponse à un stress.....	91
4.4.3.	Les caractéristiques des cellules sénescents.....	92
4.4.3.1.	L'arrêt dans le cycle cellulaire.....	92
4.4.3.2.	L'activité SA- β galactosidase.....	94

4.4.3.3.	Les facteurs secrétés en sénescence	94
4.4.4.	Les conséquences de la sénescence	95
5.	Problématique	97
MATERIEL & METHODES		99
1.	Matériel	100
1.1.	Le modèle <i>in vivo</i>	100
1.1.1.	Les souris Balb/c	100
1.1.2.	La contamination par le ⁹⁰ Sr	100
1.1.2.1.	Le mode de contamination	100
1.1.2.2.	Le modèle d'effet-dose	101
1.2.	Le modèle <i>in vitro</i>	102
1.2.1.	La lignée MS5	102
1.2.2.	Les cellules mésenchymateuses primaires	102
1.2.3.	Contamination par le ⁹⁰ Sr	102
2.	Méthodes	104
2.1.	Prélèvement et traitement des échantillons	104
2.1.1.	Les cellules MS5	104
2.1.2.	Modèle « effet-dose » : prélèvement d'organes	104
2.1.2.1.	Prélèvement chez les parents	104
2.1.2.2.	Prélèvements chez la descendance	104
2.2.	Mesure du ⁹⁰ Sr	106
2.2.1.	Vérification de la contamination des cellules MS5 et CSM-MO	106
2.2.2.	Mesure du ⁹⁰ Sr dans les os	106
2.2.2.1.	Calcul de l'activité massique	106
2.2.2.2.	Calcul des doses cumulées : os et corps entier	107
2.3.	Les analyses génétiques	107
2.3.1.	Extraction d'ARN totaux	107
2.3.1.1.	Extraction des ARN totaux des MS5, cellules de moelle osseuse et rate	107
2.3.1.2.	Extraction des ARN totaux des fémurs	107
2.3.2.	Dosage des ARN totaux	107
2.3.3.	Rétro-transcription	108
2.3.4.	PCR en temps réel	108
2.3.5.	Quantification de l'expression génique	108
2.4.	Les analyses protéiques	112
2.4.1.	Extraction de protéines	112
2.4.2.	Dosages de protéines	112
2.4.3.	Le western blot	112
2.4.4.	Le screening protéique	114
2.5.	Les dosages	114
2.5.1.	Enzyme Linked Immunosorbant Assays (ELISA)	114
2.5.1.1.	Concentrations extracellulaires	114
2.5.1.2.	Concentrations plasmatiques	115
2.5.1.3.	Concentrations spléniques	115
2.5.2.	Le multiplex	115
2.5.3.	Le dosage de la LDH	115
2.6.	Histologie et immunohistologie	116
2.6.1.	Le modèle <i>in vitro</i>	116
2.6.1.1.	Coloration à l'Oil Red O	116
2.6.1.2.	La SA β-galactosidase	116
2.6.1.3.	Immunohistochimie	116
2.6.1.3.1.	Cassures double-brin : γ-H2AX	116
2.6.1.3.2.	Immunomarquage de p21	117
2.6.2.	Le modèle <i>in vivo</i> : traitement des organes pour l'histologie	117
2.7.	La cytométrie en flux	118
2.7.1.	Phénotype des CSM-MO	118

2.7.2.	Le cycle cellulaire.....	118
2.7.3.	Evaluation du stress oxydant.....	119
2.8.	Tests fonctionnels.....	120
2.8.1.	Test de clonogénicité : les CFU-F.....	120
2.8.2.	La co-culture.....	120
2.8.2.1.	Différenciation clonale en méthylcellulose.....	120
2.8.2.2.	Long-term culture-initiating cells (LTC-IC).....	121
2.9.	Analyses statistiques.....	122
RESULTATS		123
1.	Résultats <i>in vitro</i>	124
1.1.	Calcul de la dose cumulée à la cellule.....	124
1.2.	Cassures double brin de l'ADN.....	124
1.3.	La réparation de l'ADN.....	126
1.4.	Le stress oxydant.....	127
1.5.	La sénescence cellulaire.....	129
1.5.1.	L'axe p53.....	129
1.5.2.	L'activité SA-β galactosidase.....	131
1.5.3.	La prolifération cellulaire.....	131
1.5.4.	L'arrêt dans le cycle cellulaire.....	133
1.6.	La mortalité.....	134
1.7.	La différenciation.....	136
1.8.	Fonction de soutien aux HSC.....	137
1.8.1.	Les LTC-IC.....	137
1.8.2.	Test de CFC.....	138
1.9.	Le profil de sécrétion.....	140
2.	Résultats <i>in vivo</i>.....	142
2.1.	Etat général des animaux.....	142
2.1.1.	Les données de reproduction.....	142
2.1.1.1.	Le nombre moyen de souriceaux par portée.....	142
2.1.1.2.	Le sexe- <i>ratio</i>	143
2.1.1.3.	Le poids des animaux.....	143
2.1.1.4.	La consommation d'eau et l'ingestion de ⁹⁰ Sr.....	144
2.1.2.	La concentration de ⁹⁰ Sr dans l'os.....	145
2.1.3.	Les calculs de la dose absorbée.....	145
2.2.	Validation du modèle.....	147
2.2.1.	Les paramètres sanguins.....	147
2.2.2.	Le système immunitaire.....	149
2.2.2.1.	L'analyse des isotypes d'immunoglobulines circulantes.....	149
2.2.2.2.	L'analyse de la balance Th1/Th2 Treg.....	150
2.2.2.2.1.	Expression des gènes.....	150
2.2.2.2.2.	Mesure des cytokines.....	152
2.2.3.	La physiologie osseuse.....	153
2.2.3.1.	Expression génique des marqueurs de la résorption et de la formation.....	153
2.2.3.2.	Dosage des enzymes de la résorption et de la formation.....	155
2.3.	Les mécanismes d'action.....	157
2.3.1.	Le stress oxydant.....	157
2.3.1.1.	Dans le fut fémoral.....	159
2.3.2.	La sénescence.....	161
2.3.2.1.	Dans la moelle osseuse.....	161
2.3.2.2.	Dans le fut fémoral.....	162
DISCUSSION		163
1.	Le modèle <i>in vitro</i>	165
1.1.	Le choix du modèle MS5.....	165
1.2.	Les dommages à l'ADN et le stress oxydant.....	166

1.3.	La sénescence cellulaire et la différenciation	169
1.4.	La mortalité	171
1.5.	Les conséquences fonctionnelles	172
2.	Modèle <i>in vivo</i>.....	175
2.1.	Le modèle de contamination	175
2.2.	Effet sur le système hématopoïétique	177
2.3.	Effet sur le système immunitaire	179
2.4.	Effet sur la physiologie osseuse	181
2.5.	Les mécanismes d'action	183
3.	Mécanisme général	186
4.	Conclusion et perspectives.....	187
	VALORISATIONS.....	189
	Liste des publications et présentations	190
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193

Liste des abréviations

Adipoq : Adiponectine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALP : Alkaline phosphatase (Phosphatase alcaline)

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : Acide ribonucléique

BCR : B-cell receptor

BFU-E : Burst forming unit erythrocyte

BMP : Bone morphogenetic protein

BSA : Bovine serum albumine

BSP : Bone sialoprotein (Sialoprotéine osseuse)

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding family of proteins

Ca : Calcium

CAT : Catalase

CD : Cluster de différenciation

CDB : Cassure double brin

CFC : Cellule formatrice de colonies

CFU-F : Colony forming unit fibroblast

CFU-G : Colony forming unit granulocyte

CIPR : Commission internationale de protection radiologique

CLP : Progéniteur lymphoïde commun

CMP : Progéniteur myéloïde commun

Colla1 : Collagène de type I

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

cpm : Coups par minute

Cs : Césium

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

CSM-MO : Cellule souche mésenchymateuse de moelle osseuse

CTX : C-terminal telopeptide du collagène I

CXCR-4 : Chemokine receptor type 4

DDR : DNA damage response (Réponse aux dommages à l'ADN)

ELISA : Enzyme linked immunosorbant assay

EPO : Erythropoïétine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fabp4 : Fatty-acid binding protein 4

Flt3-l : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand

Foxp3 : Forkhead box P3

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

GAPDH : Glyceraldehyde-3 phosphate
Gata 3 : GATA binding protein 3
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GST : Glutathion-S-tranférase
HR : Homologous recombination (Recombinaison homologue)
HRP : Horse-radish peroxydase
ICAM : Intercellular adhesion molecule
IFN- γ : Interféron- γ
Ig : Immunoglobuline
IGF : Insulin-like growth factor
IL : Interleukine
IL-ra : Récepteur antagoniste aux interleukines
IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire
IP : Iodure de propidium
Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KLH : Keyhole limpet hemocyanin (Hémocyanine de l'ormeau géant)
LB : Lymphocyte B
LDH : Lactate déshydrogénase
Lin : Lignage
Lpl : Lipoprotéine lipase
LT : Lymphocyte T
LTC-IC : Long term culture initiating cell
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MCP : Monocyte chemoattractant protein
MMP : Métalloprotéase
MnSOD : Manganèse Superoxyde dismutase
mTOR : Mammalian target of rapamycin
NFS : Numération et formule sanguine
NHEJ : Non-homologous end joining (Jonction des extrémités non homologues)
NK : Natural killer
NLM : Nœuds lymphoïdes mésentériques
Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OCN : Ostéocalcine
OPG : Ostéoprotégérine
OPN : Ostéopontine
Osx : Osterix
PBS : Phosphate buffered saline

PFA : Paraformaldéhyde
PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinase
PPAR- γ : Proliferator activated receptor- γ
RANKL : Receptor activator of nuclear factor κ -B ligand
RI : Rayonnements ionisants
RT-qPCR : Real-time quantitative polymérase chain reaction
Runx2 : Runt-related transcription factor 2
SASP : Senescence-associated secretory phenotype (Phénotype sécrétoire associé à la senescence)
Sca-1 : Stem-cell antigen 1
SCF : Stem cell factor
SDF-1 : Stromal derived factor 1
Sr : Strontium
SVF : Sérum de veau fœtal
T-bet : T-box 21
tBHP : Ter-butyl hydroperoxyde
TBS : Tris buffer saline
TCR : T-cell receptor
TGF- β : Transforming growth factor β
Th : Lymphocyte T helper
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF α : Tumor necrosis factor α
TRAP : Tartrate-resistant acide phosphatase
Treg : Lymphocyte T régulateur
TT : Toxine tétanique
UV : Ultraviolets

Liste des figures

Figure 1: Schéma de désintégration du ⁹⁰ Sr.....	24
Figure 2: Distribution des essais nucléaires entre les années 1945 et 1980	25
Figure 3: Modèles de biocinétique du Sr.....	28
Figure 4: Taux d'absorption intestinal de Sr chez l'homme	29
Figure 5: Répartition du ⁹⁰ Sr dans les os chez la souris.....	30
Figure 6: Architecture des os longs.....	39
Figure 7: Différenciation ostéoblastique à partir des CSM	41
Figure 8: Différenciation des ostéoclastes	43
Figure 9: Etapes de la croissance endochondrale et composition de la plaque de croissance	44
Figure 10: Etapes du remodelage osseux	46
Figure 11: Les compartiments de l'hématopoïèse.....	47
Figure 12: Les cytokines impliquées dans le processus d'hématopoïèse	50
Figure 13: Les organes lymphoïdes primaires et secondaires.....	53
Figure 14: Différenciation des lymphocytes T.....	56
Figure 15: Etapes de la lymphopoïèse B	58
Figure 16: Etapes clés de la réponse immunitaire adaptative.....	61
Figure 17: Désintégration du ⁹⁰ Sr dans l'os	62
Figure 18: Multipotence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM-MO).....	64
Figure 19: La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	66
Figure 20: Les modèles de niche	71
Figure 21: Le cycle du glutathion	76
Figure 22: Le système Nfr2/Keap1	78
Figure 23: Résumé des sources et des atteintes de l'ADN.....	80
Figure 24: Les voies de réparation des cassures double brin	83
Figure 25: Les différents types de mort cellulaire	85
Figure 26: les deux voies de l'apoptose	86
Figure 27: Les différents types de nécrose	88
Figure 28 : Le mécanisme d'autophagie.....	89
Figure 29: Les causes de la sénescence cellulaire	90
Figure 30: Les voies moléculaires de la sénescence	93
Figure 31: Les principaux rôles du SASP	95
Figure 32: Protocole de contamination pour le modèle <i>in vivo</i> effet-dose	101
Figure 33: Protocole de contamination pour le modèle <i>in vitro</i>	103
Figure 34: Récapitulatif des prélèvements chez les animaux	105
Figure 35: Image représentative de l'immunomarquage des foci γ -H2AX.....	125
Figure 36: Quantification des foci γ -H2AX dans les CSM-MO de rat	125
Figure 37: Quantification des foci γ -H2AX dans les MS5	126
Figure 38: Les protéines de la réparation de l'ADN	127

Figure 39: Production de ERO par les MS5.....	127
Figure 40: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes dans les MS5.....	128
Figure 41: Niveau d'expression génique de <i>p53</i> et <i>p21</i> dans les MS5.....	129
Figure 42: Expression protéique de p21 dans les MS5.....	130
Figure 43: Image représentative de l'immunomarquage p21.....	130
Figure 44: Quantification des MS5 p21 positives.....	130
Figure 45: Activité SA- β galactosidase.....	131
Figure 46: Coloration des CFU-F au May-Grünwald Giemsa.....	132
Figure 47: Prolifération des MS5.....	132
Figure 48: Stades du cycle cellulaire par cytométrie de flux.....	133
Figure 49: Répartition des MS5 dans les phases du cycle cellulaire.....	134
Figure 50: Fraction cellulaire en apoptose.....	135
Figure 51: Cytotoxicité dans les MS5.....	135
Figure 52: Image représentative de la différenciation adipocytaire.....	136
Figure 53: Quantification de la différenciation adipocytaire.....	136
Figure 54: Niveau d'expression génique des marqueurs de l'adipogénèse.....	137
Figure 55: Nombre de LTC-IC formés.....	138
Figure 56: Nombre de CFC/LTC-IC.....	138
Figure 57: Les CFC.....	138
Figure 58: Nombre de CFU-G et BFU-E formés.....	139
Figure 59: Dosage extracellulaire des cytokines impliquées dans la différenciation des CFU-G.....	140
Figure 60: Profil de production protéique intracellulaire des MS5.....	141
Figure 61: Dosage de cytokines extracellulaires.....	141
Figure 62: Suivi des naissances.....	142
Figure 63: Sexe- <i>ratio</i>	143
Figure 64: Suivi du poids des animaux.....	143
Figure 65: Suivi de la concommation hydrique des animaux.....	144
Figure 66: Suivi de l'ingestion de ⁹⁰ Sr par les animaux.....	144
Figure 67: Contrôle de la contamination des animaux.....	145
Figure 68: Evolution de la dose cumulée au corps entier.....	146
Figure 69: Evolution de la dose cumulée au squelette.....	146
Figure 70: Suivi des paramètres sanguins.....	148
Figure 71: Concentration plasmatique des isotypes d'immunoglobulines circulantes.....	149
Figure 72: Niveau d'expression génique des marqueurs de l'équilibre Th1/Th2 et Treg dans la rate.....	151
Figure 73: Concentrations spléniques des cytokines impliquées dans l'équilibre Th1/Th2.....	152
Figure 74: Niveau d'expression génique des marqueurs de la formation et de la résorption osseuse.....	154
Figure 75: Concentrations plasmatiques des marqueurs de la résorption et de la formation osseuse.....	156
Figure 76: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes et de Nrf2 dans la moelle osseuse...	158
Figure 77: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes et de Nrf2 dans le fut fémoral.....	160
Figure 78: Niveau d'expression génique des marqueurs de la sénescence dans la moelle osseuse.....	161

Figure 79: Niveau d'expression génique des marqueurs de la sénescence dans le fut fémoral	162
Figure 80: Mécanisme d'action général du ⁹⁰ Sr <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	186

Liste des tables

Tableau 1: Liste des principaux facteurs produits par les CSM.....	64
Tableau 2: Les principaux facteurs du SASP	94
Tableau 3: Liste des primers utilisés pour le modèle <i>in vitro</i>	110
Tableau 4: Liste des primers utilisés pour le modèle <i>in vivo</i>	111
Tableau 5: Composition des gels pour le western blot	113
Tableau 6: Anticorps utilisés pour le western blot	113
Tableau 7: Etapes de passage au VIP.....	118

AVANT PROPOS

A la suite des grandes catastrophes nucléaires tels que l'accident de Tchernobyl en 1986 ou encore l'accident de Fukushima plus récemment, de grandes quantités de radionucléides sont rejetées dans l'environnement. Parmi les radioéléments rejetés, le césium 137 (^{137}Cs) et le strontium 90 (^{90}Sr) sont parmi les plus dangereux du fait de leur longue demi-vie, respectivement 30 et 29 ans. En effet, aujourd'hui encore, les populations vivant sur les territoires contaminés ingèrent quotidiennement de faibles quantités de ces radionucléides qui s'incorporent facilement dans la chaîne alimentaire. Le programme ENVIRHOM lancé en 2001 par l'IRSN a pour but d'étudier les effets d'une exposition chronique à de faibles concentrations de radionucléides sur les écosystèmes et sur la santé de l'homme. Le LRTOX s'intéresse plus particulièrement aux effets sur la santé de l'Homme, entre autres lors des situations post-accidentelles afin d'apporter des éléments de réponse mécanistiques aux études épidémiologiques.

En effet, les études réalisées au niveau des populations vivant sur les territoires contaminés ont permis de mettre en évidence des atteintes au niveau du système immunitaire notamment avec des diminutions dans la quantité de lymphocyte T et d'immunoglobulines, mais également au niveau hématopoïétique par l'augmentation de la mortalité par leucémies. De même, au niveau de la physiologie osseuse, des altérations du processus de remodelage osseux ont également été observées. Les études expérimentales réalisées à la suite de ces catastrophes et permettant de mieux comprendre le comportement de ces radionucléides sont peu nombreuses et ont été menées avec de fortes concentrations en radioéléments souvent administrées en injection unique. Or, l'exposition des populations aux radionucléides est une exposition chronique avec de faibles concentrations de radioéléments. La représentativité de ces études d'exposition aiguë à forte concentration est donc limitée. Cependant, elles ont toutefois permis d'améliorer la compréhension quant à la biocinétique de ces éléments.

Le but de ce travail de thèse est de comprendre quels sont les mécanismes d'action d'un radioélément particulier, le ^{90}Sr , sur le système immunitaire à la suite d'une exposition chronique. Ce travail est basé sur une précédente étude *in vivo* menée au LRTOX, dans laquelle des souris ont été contaminées *via* l'eau de boisson à une concentration de 20 kBq.L^{-1} ($100 \text{ Bq/animal/jour}$) de ^{90}Sr dès le stade *in utero*. Cette étude a permis de démontrer une augmentation de la résorption osseuse chez les souris contaminées, mais également une diminution de paramètres immunitaires lors d'une expérience de vaccination.

Cette thèse a donc été menée à la fois sur un modèle *in vitro* dans lequel une lignée de cellules stromales, les cellules MS5 ont été contaminées directement par le milieu de culture par deux concentrations de ^{90}Sr , 1 et 10 kBq.mL^{-1} . Ce modèle permettra de mieux comprendre les effets de la contamination sur une population cellulaire particulière, les cellules stromales de la moelle osseuse qui ont un rôle clé à la fois dans la formation du tissu osseux, mais également dans la régulation de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Le deuxième modèle

utilisé est un modèle *in vivo* d'effet-dose dans lequel des souris sont contaminées par l'eau de boisson à différentes concentrations de ^{90}Sr , 4, 20 et 100 kBq.L⁻¹ dès le stade *in utero*. Ce deuxième modèle permet de mimer la situation des populations sur les territoires contaminés et permet d'une part de confirmer les résultats précédemment obtenus mais également d'aller plus loin en étudiant une gamme de concentrations ingérées et en observant les mécanismes d'action *in vivo* du ^{90}Sr .

Dans ce manuscrit, une partie introductive décrivant l'ensemble des paramètres étudiés sera abordée, suivie du chapitre sur le matériel et les méthodes utilisées au cours de ce travail et des résultats obtenus, tout d'abord sur le modèle *in vitro* puis sur le modèle *in vivo*. Enfin, dans la dernière partie, les résultats pour chacun des modèles seront discutés de façon générale afin de replacer cette étude dans un contexte plus large. De même, les perspectives de ce travail y seront abordées.

INTRODUCTION

1. Le Strontium 90

1.1. Généralités

1.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le strontium (Sr) a été découvert dans une mine de plomb de la ville de Strontian en Ecosse en 1787. Il fait partie de la famille des alcalino-terreux et ses propriétés physico-chimiques sont analogues à celles du calcium (Ca). A l'état naturel, le Sr présente quatre isotopes stables : ^{88}Sr (82,53%), ^{86}Sr (9,87%), ^{87}Sr (7,04%) et ^{84}Sr (0,56%). Les principaux minerais de strontium sont la strontianite (SrCO_3) et la célestite (SrSO_4). A cause de l'érosion des sols et des roches, il est retrouvé dans les eaux de surface à des concentrations souvent inférieures à 1 mg.L^{-1} (ATSDR 2004) et à l'état de trace dans l'eau de mer. Pour l'homme, l'exposition au Sr se fait essentiellement par les apports alimentaires. Le Sr ne possède pas de toxicité chimique, cependant une valeur seuil de 18 mg.L^{-1} dans les eaux de boisson est recommandée par l'ANSES (Saisine n°2012-SA-0262).

1.1.2. Utilisations du Strontium

Le Sr est utilisé en industrie sous forme de carbonate de strontium dans les peintures de revêtement de navires ou de fuselages d'avion en tant qu'anti-corrosif. Il est également utilisé en pyrotechnie comme colorant rouge vif pour les feux d'artifice ou encore pour les signaux de détresse marins ou les fusées militaires. Sous forme d'hydroxyde de Sr, celui-ci est utilisé dans l'industrie sucrière lors de l'étape de raffinement du sucre. Le Sr présente également une application médicale. En effet, le ranélate de Sr a longtemps été utilisé comme traitement des cas d'ostéoporose car il favorise l'ostéogénèse. Cependant, de récentes études ont montré que celui-ci entraîne une augmentation du risque de thrombose veineuse ainsi que de survenue d'infarctus du myocarde (Cooper *et al.* 2014; Reginster 2014). L'agence européenne du médicament (EMA) recommande désormais la suspension du traitement chez les patients ayant des antécédents de maladies cardiovasculaires (Rapport EMA/84749/2014; Reginster *et al.* 2015).

1.1.3. Propriétés radioactives

Le strontium radioactif est un produit purement artificiel. Parmi les 16 isotopes radioactifs, les plus importants sont les isotopes 85, 89 et 90. Le ^{85}Sr est un produit de cyclotron, c'est un émetteur γ ayant une demi-vie de 65 jours qui a longtemps été utilisé pour l'imagerie médicale en tant que traceur. Aujourd'hui il est remplacé par le $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Le ^{89}Sr et le ^{90}Sr sont quant à eux produits dans les réacteurs nucléaires et sont issus du processus de fission des noyaux d'uranium 235, 238 (^{235}U , ^{238}U) ou de plutonium 239 (^{239}Pu). Ce sont des émetteurs β^- ayant une

demi-vie de 50 jours et 29 ans respectivement. Le ^{90}Sr résulte de la chaîne de fission du brome 90 (^{90}Br). Par désintégration β^- (0,54 MeV), le ^{90}Sr va conduire à l'yttrium 90 (^{90}Y), également émetteur β^- (2,28 MeV) qui lors de sa désintégration conduit à un élément stable, le zirconium 90 (^{90}Zr) (**Figure 1**).

Dans la matière, l'émission β^- du ^{90}Sr a un parcours de quelques micromètres (environ 200 μm), l'énergie issue de la désintégration successive du ^{90}Sr puis du ^{90}Y est donc déposée à proximité du site d'émission. Du fait de sa longue demi-vie, le ^{90}Sr constitue le radioisotope le plus dangereux lorsqu'il est retrouvé dans l'environnement.

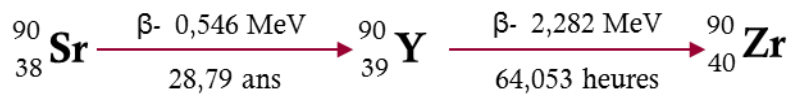


Figure 1: Schéma de désintégration du ^{90}Sr

1.2. Principales sources de ^{90}Sr dans l'environnement

La dispersion du ^{90}Sr dans l'environnement représente l'une des nombreuses conséquences des catastrophes nucléaires. Les isotopes les plus significatifs pour la santé humaine rejetés à la suite de ces catastrophes sont, d'une part les iodes radioactifs (^{131}I), des éléments ayant une courte demi-vie (8 jours ou moins) mais qui s'incorporent facilement dans l'organisme, surtout au niveau de la thyroïde (Davis *et al.* 2004; Zablotska *et al.* 2011). D'autre part, avec le ^{90}Sr , le césium 137 (^{137}Cs) représente l'autre radioélément massivement rejeté en cas d'accident et persiste dans l'environnement à long terme. Il fait également partie des sous-produits générés au cours de la fission de l'uranium dans les réacteurs nucléaires. Sa demi-vie de 30 ans et son rayonnement γ très pénétrant contribuent à sa dangerosité lorsqu'il est retrouvé dans l'environnement.

1.2.1. Les rejets des effluents liquides des centrales nucléaires

Dans les années 1950, la centrale de Mayak constituait l'un des principaux sites de production de plutonium et d'armes nucléaires de l'ex-URSS dans la région de Tchelyabinsk, entre les villes de Kyshtym et Kasly. De 1949 à 1956 les manques dans la gestion des déchets radioactifs ont conduit au rejet d'environ 10^{17} Bq d'effluents radioactifs dans la rivière Techa, dont $1,2 \cdot 10^{16}$ Bq de ^{90}Sr , cette rivière constituant le principal point d'approvisionnement en eau pour les populations environnantes. Ceci a donc conduit à la contamination des populations essentiellement *via* ingestion d'eau contaminée mais aussi par irradiation externe, du fait de l'émission γ des éléments déposés dans les sédiments. Un pic de rejets entre 1949 et 1951 a contribué non seulement à une contamination massive de la rivière mais également à celle des territoires aux

alentours, par des débordements de la rivière ou encore par l'utilisation de l'eau pour l'usage courant (arrosage), exposant ainsi les populations *via* l'ingestion d'aliments contaminés.

1.2.2. Les essais nucléaires atmosphériques

De 1945 à 1980, 502 tests nucléaires atmosphériques ont été réalisés par les Etats-Unis, l'ex-URSS, le Royaume Uni, la France et la Chine avec un pic d'activité entre 1954 et 1958 puis entre 1961 et 1962 (Bennett 2002) (**Figure 2**). Ces explosions ont conduit à la dispersion d'environ $6,22 \cdot 10^{17}$ Bq de ^{90}Sr dans l'atmosphère, 60 % de l'activité totale ayant été déposée dans l'hémisphère Nord (Mück *et al.* 2001).

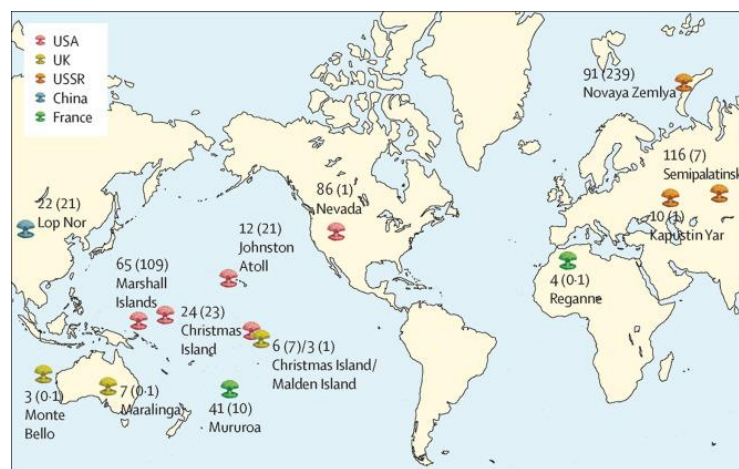


Figure 2: Distribution des essais nucléaires entre les années 1945 et 1980

Chaque chiffre représente le nombre de tests réalisés au niveau de chacun des sites. Les chiffres entre parenthèses représentent l'énergie totale produite par les explosions, exprimée en mégatonnes de trinitrotoluène (TNT).
D'après Simon & Bouville 2015

1.2.3. Les accidents nucléaires

1.2.3.1. L'accident de Kyshtym

En Septembre 1957, le système de refroidissement de l'un des réservoirs de déchets de la centrale de Mayak tomba en panne, provoquant une violente explosion ayant conduit à la contamination d'une surface de 800 km² essentiellement par du ^{137}Cs et du ^{90}Sr . Les rejets de ^{90}Sr ont été estimés à $1,2 \cdot 10^{16}$ Bq.

1.2.3.2. L'accident de Tchernobyl

L'un des accidents les plus graves dans l'histoire de l'industrie nucléaire est sans doute l'accident de Tchernobyl en Ukraine, le 26 Avril 1986. Cette catastrophe est le résultat d'une erreur humaine ayant provoqué une augmentation incontrôlée de la puissance du réacteur n°4, conduisant à son explosion et au relargage de nombreux radionucléides dans l'environnement. L'accident de Tchernobyl est classé 7 sur les 8 niveaux de l'échelle internationale des évènements nucléaires (échelle INES) et il représente le plus grave accident nucléaire jamais répertorié à ce jour. Immédiatement après l'accident, 600 personnes sont intervenues en urgence pour éteindre les incendies et ont été fortement exposées aux radiations provoquées par l'accident. Au total, 600 000 personnes appelées les « liquidateurs », ont été employées pour la construction du sarcophage et pour la décontamination de la centrale et des territoires environnants. Les estimations de la dose d'irradiation reçue par les liquidateurs sont comprises entre 10 et 1000 mSV. La zone d'exclusion s'étend sur plus de 2044 km² et plus de 120 000 personnes ont été évacuées après la catastrophe. Les rejets atmosphériques de ⁹⁰Sr sont estimés à 8.10¹⁵ Bq et ceux de ¹³⁷Cs à 8.10¹⁶ Bq (UNSCEAR 2011).

1.2.3.3. L'accident de Fukushima

Au Japon, le 11 Mars 2011, un important séisme de magnitude 9 suivi d'un tsunami a entraîné la perte du refroidissement du cœur de 3 réacteurs de la centrale de Fukushima-Daiichi, conduisant à 4 explosions. Plusieurs semaines suivant l'accident, des rejets atmosphériques massifs de radionucléides ont eu lieu conduisant à l'évacuation de 80 000 personnes dans un périmètre de 20 à 50 km autour de la centrale. Les radionucléides ont aussi été rejetés dans l'océan, entraînant une contamination des écosystèmes essentiellement par du ¹³⁷Cs. On estime cependant les rejets de ⁹⁰Sr à environ 1,39.10¹⁴ Bq (Kavasi *et al.* 2015).

1.3. Biocinétique

1.3.1. Voies d'exposition

Les principales caractéristiques du Sr sont d'une part son analogie avec le Ca et d'autre part son importante solubilité. Celui-ci s'incorpore donc facilement dans la chaîne alimentaire ainsi que les écosystèmes. Les concentrations de ⁹⁰Sr les plus importantes ont notamment été mesurées dans les produits laitiers, l'eau et les champignons (de Ruig & van der Struijs 1992; Hoshi *et al.* 1994). Les populations sont essentiellement contaminées *via* l'ingestion d'aliments et d'eau contenant du ⁹⁰Sr. Par ailleurs, la consommation moyenne de ⁹⁰Sr pour les populations vivant autour des territoires contaminés dans la zone de Tchernobyl a été estimée à partir de la

composition d'un bol alimentaire moyen et conduit à une activité journalière située entre 10 et 100 Bq/jour (Handl *et al.* 2003).

1.3.2. Accumulation dans l'organisme

1.3.2.1. Les modèles de biocinétique

En 1993, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a établi un modèle de biocinétique du Sr basé sur la voie principale d'exposition, l'ingestion, par analogie avec la biocinétique du Ca (ICRP 67 1993). Cependant, ce modèle ne tient compte ni du sexe, ni de l'âge des individus exposés. Le modèle de la CIPR a récemment été complété par des études menées par Shagina *et al.* (2015) à partir des données de dosimétrie des habitants de la rivière Techa. Cette cohorte se compose de 20 000 personnes, suivies sur une durée de 60 ans et représente une base de données importante concernant la contamination par le ^{90}Sr chez l'homme. Les mesures de la concentration de ^{90}Sr dans l'os, les dents ainsi que les données de dosimétrie au corps entier au sein de la cohorte ont permis d'établir plusieurs modèles de biocinétique. Les différents modèles prennent en compte tout d'abord l'âge et le genre des individus (essentiellement pour le pool de Sr stocké dans l'os) (**Figure 3 A**) et permettent également de modéliser le transfert de Sr dans le lait maternel (**Figure 3 B**) et au fœtus (**Figure 3 C**) (Shagina *et al.* 2015a; Shagina *et al.* 2015b; Shagina *et al.* 2015c).

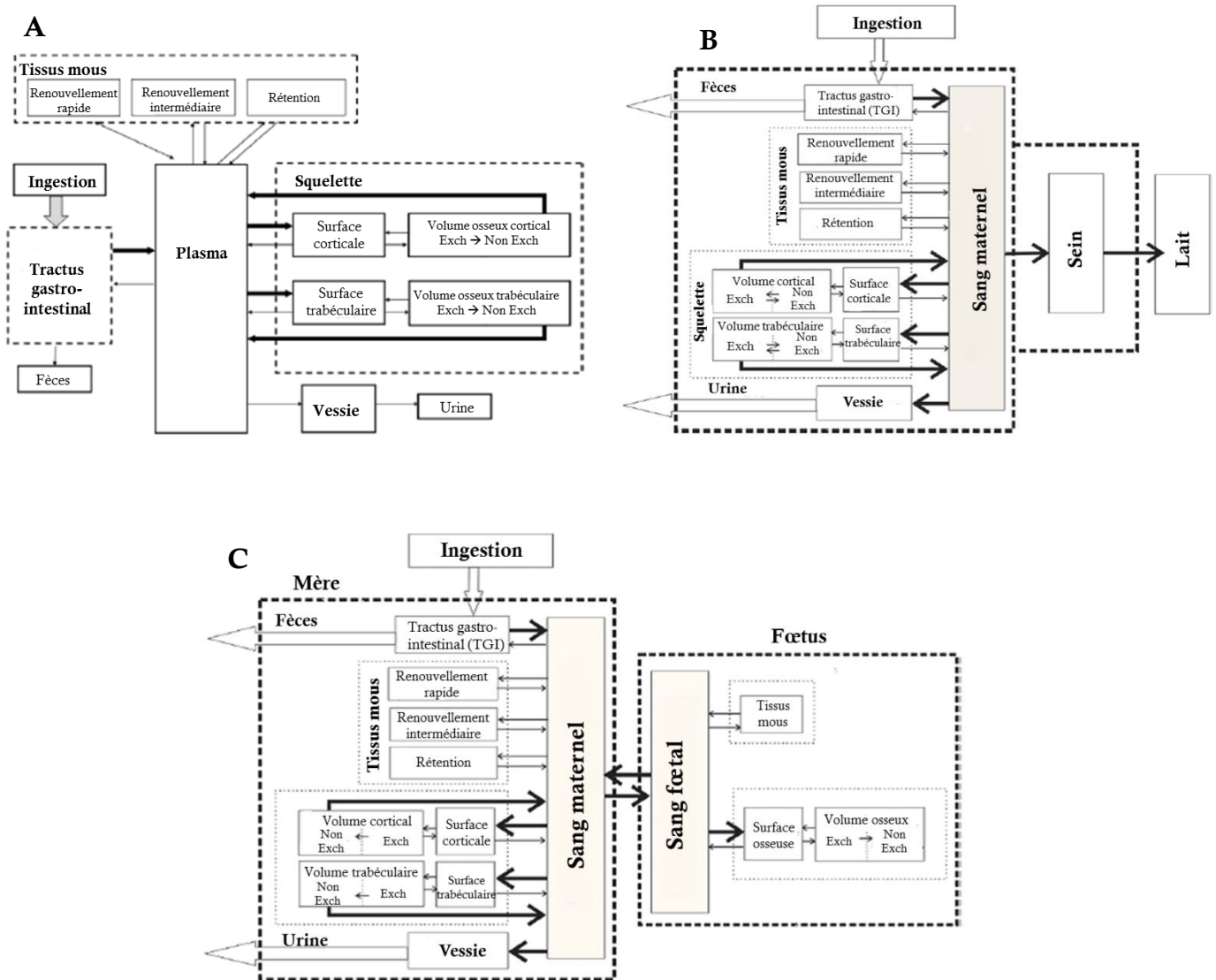


Figure 3: Modèles de biocinétique du Sr

- A. Modèle basé sur le modèle de biocinétique de la CIPR 67. Les flèches en gras représentent les paramètres qui diffèrent en fonction de l'âge et du genre. *D'après Shagina et al. 2015b*
- B. Modèle de biocinétique durant la période d'allaitement. Les flèches en gras représentent les taux de transfert modifiés entre les compartiments pendant la période d'allaitement. *D'après Shagina et al. 2015 c*
- C. Modèle de biocinétique durant la grossesse. Les flèches en gras représentent les taux tranfert modifiés entre les compartiments au cours des différents stades de la grossesse. *D'après Shagina et al. 2015 a*

Abréviations : Exch-Volume osseux échangeable ; Non-Exch-Volume osseux non échangeable

1.3.2.2. Absorption

Chez l'homme, lorsqu'il est ingéré, le Sr est majoritairement absorbé par le tractus gastro-intestinal. Cependant le taux d'absorption dépend de sa forme physico-chimique et de sa concentration dans les aliments (**Figure 4**). Ce taux d'absorption dépend également des concentrations en Ca, vitamine D, magnésium et phosphore apportés par l'alimentation. Toutefois, il est estimé qu'en moyenne 30 % du Sr est absorbé par l'intestin (ICRP 1993; Li *et al.* 2006).

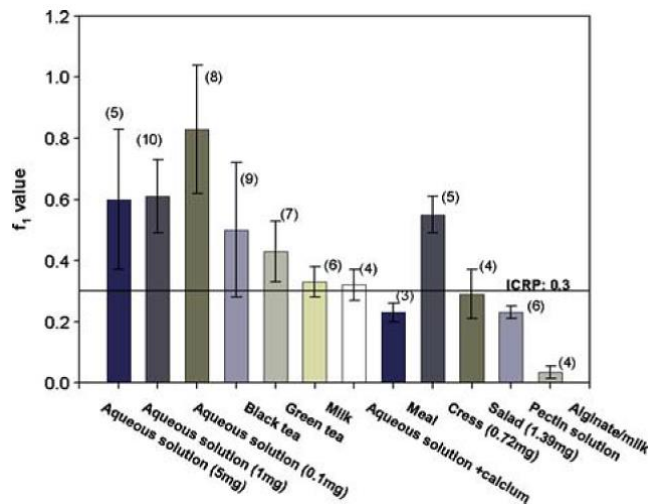


Figure 4: Taux d'absorption intestinal de Sr chez l'homme

Le taux d'absorption intestinal de Sr (f_1 value) dépend de la forme physico-chimique du Sr et de sa concentration dans les aliments. D'après Höllriegel *et al.* 2006.

1.3.2.3. Distribution

Comme déjà mentionné, le Sr possède des propriétés physico-chimiques qui s'apparentent à celles du Ca. Lorsqu'il passe la barrière intestinale, 99 % du Sr s'accumule au niveau du squelette et des dents. Celui-ci prend la place du Ca dans les cristaux d'hydroxyapatite qui sont à la base de la structure même de l'os. Son accumulation dans l'organisme est dépendante du métabolisme phosphocalcique. Plusieurs études de biocinétique menées chez la souris (Synhaeve *et al.* 2011; Malinovsky *et al.* 2013) ou chez le lapin (Jowsey *et al.* 1953) ont tout d'abord démontré que l'âge avait une influence sur l'incorporation. En effet, la distribution du Sr dans le squelette est différente en fonction de la période de contamination, si celle-ci a lieu à l'âge adulte ou dès le stade *in utero*. Les études ont montré que l'incorporation se fait plus rapidement pendant les premières semaines suivant la naissance, lorsque la croissance osseuse est importante, alors qu'à l'âge adulte, qui est une période essentiellement de remodelage osseux, le renouvellement de Ca

est plus lent. De plus, la distribution de Sr dans le squelette n'est pas homogène, les concentrations de Sr mesurées étant plus importantes dans les os longs que dans les os plats (**Figure 5**). Par ailleurs, au sein même de l'os, il semblerait que l'os cortical retienne plus le Sr que l'os trabéculaire (Shagina *et al.* 2003). Enfin, le sexe influence également l'incorporation de Sr puisqu'il est maintenant établi que les hormones sexuelles, et plus particulièrement les œstrogènes, jouent un rôle dans la régulation de la physiologie osseuse (Kalyan & Prior 2010; Johnston & Ward 2015; Park *et al.* 2016). L'accumulation de Sr est plus importante chez la femme que chez le l'homme.

Concernant le Sr non fixé au squelette, celui-ci se répartit entre les différents organes à raison de 0,05 % dans le cerveau, le foie, les reins et la vessie et pour moins de 0,09 % dans les muscles ou encore la peau.

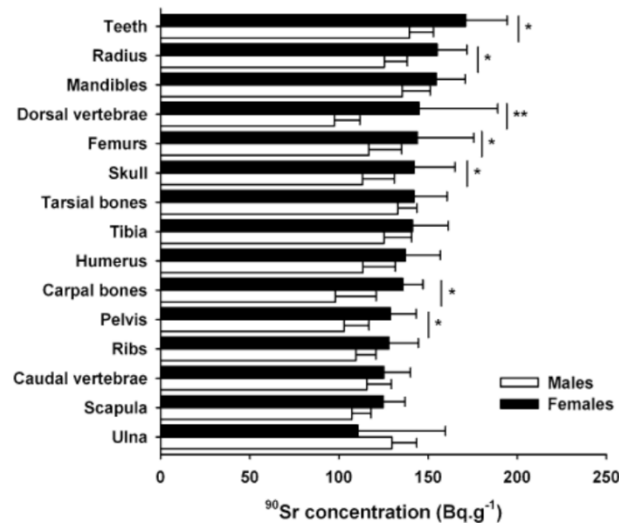


Figure 5: Répartition du ⁹⁰Sr dans les os chez la souris

L'accumulation de ⁹⁰Sr est plus importante chez la femelle (barres noires) que chez le mâle (barres blanches). Les valeurs sont exprimées en Bq.g⁻¹ d'os. D'après Synhaeve *et al.* 2011

1.3.2.4. Elimination

Selon le modèle établi par la CIPR, le Sr présent dans le plasma peut passer soit dans la vessie pour être éliminé par voie urinaire, soit dans l'intestin où il sera excrété *via* les fèces. Chez la femme en période d'allaitement, le taux de transfert du Sr du plasma vers le lait maternel a été estimé à 0,88 (Shagina *et al.* 2015c). Concernant le taux de transfert de la mère au fœtus au cours de la grossesse, celui-ci évolue en fonction de la période de la grossesse et le taux de Sr passant du sang maternel vers le sang fœtal augmente de 0,6 à 0,94 à partir de 30 semaines de gestation (Shagina *et al.* 2015a).

1.4. Les effets sur la santé

Les effets retrouvés chez les individus exposés au ^{90}Sr sont essentiellement de nature hématopoïétique et immunitaire mais des atteintes au niveau du tissu osseux sont également observées du fait de son rôle d'organe de stockage.

Etant donné l'absence de toxicité chimique, le ^{90}Sr présente essentiellement une radiotoxicité. Dans ce cas, concernant les effets des rayonnements ionisants, on distingue les effets de type déterministe et ceux de type stochastique. Les effets déterministes se caractérisent par leur apparition certaine chez tous les individus ayant été exposés, en général lors d'expositions uniques à des doses élevées (plusieurs Gy), ce sont des effets à seuil. Ils se déclarent rapidement (entre quelques jours et quelques mois) et leur gravité varie avec la dose absorbée (Hamada & Fujimichi 2014). Au contraire, à plus long terme (dizaines d'années) on parle d'effets stochastiques ou aléatoires pour lesquels seule la probabilité de survenue des effets est dose-dépendante. Dans ce cas, les effets observés chez les individus peuvent survenir avec la même gravité malgré une exposition à des doses d'irradiation différentes (Hamada & Fujimichi 2014).

1.4.1. Données épidémiologiques

1.4.1.1. Les effets cancéreux

Les études épidémiologiques sur les conséquences sanitaires des accidents nucléaires tels que Tchernobyl, ou encore sur les survivants de la bombe atomique (ex : Hiroshima, Nagasaki) sont nombreuses et accordent un intérêt particulier à l'apparition d'effets cancéreux. Des corrélations ont tout d'abord été prouvées entre l'augmentation de la survenue de cancers de la thyroïde et l'ingestion d'ides radioactifs, ^{131}I , à la suite de l'accident de Tchernobyl (Cardis & Hatch 2011) ou à la suite des essais de la bombe atomique (Little 2009; Simon & Bouville 2015).

Plus généralement, la plupart des études concernant les effets cancéreux à la suite des catastrophes nucléaires prennent essentiellement en compte l'irradiation externe aiguë générée par le nuage radioactif au moment de l'accident. Plusieurs travaux ont prouvé un lien de causalité entre l'exposition aux radiations et l'apparition de leucémies dans la cohorte des liquidateurs de la centrale de Tchernobyl (Ivanov *et al.* 2012; Zablotska *et al.* 2013; Gluzman *et al.* 2015). Cependant, d'autres études plus spécifiques d'une contamination interne à long terme par de faibles concentrations de radionucléides ont été menées. Celles-ci mettent en évidence des effets au niveau de la moelle osseuse plus particulièrement, puisque avec la thyroïde, la moelle osseuse est l'un des organes les plus radiosensibles (UNSCEAR 2011). En fonction de la cohorte étudiée et de l'âge auquel les individus ont été exposés, les résultats quant à l'apparition de leucémies sont très variables. En effet, chez des personnes exposées au cours de l'enfance à la suite de l'accident

de Tchernobyl, aucun lien de causalité entre l'exposition et l'augmentation de l'incidence de leucémies à l'âge adulte n'a été clairement démontré (Davis *et al.* 2006; Howe 2007). Concernant les individus exposés *in utero*, les résultats sont contradictoires. Certaines démontrent une augmentation de l'apparition de leucémies à l'âge adulte en lien avec une exposition *in utero* à la suite de l'accident de Tchernobyl (Petridou *et al.* 1996; Busby 2009), d'autres non (Michaelis *et al.* 1997; Ivanov *et al.* 1998). Cependant ces études ne sont pas spécifiques d'un radionucléide donné et beaucoup de facteurs individuels ne sont pas pris en compte. Par ailleurs, un effet de l'irradiation externe (causée par le dépôt de radioéléments dans les sols) peut aussi intervenir pour expliquer la survenue de ces effets. Seules les données des habitants de la rivière Techa permettent d'avoir une idée plus précise des effets cancéreux causés par une contamination à long terme majoritairement par le ^{90}Sr , mais non exclusive de ce radionucléide. En effet, les travaux menés sur cette cohorte ont permis de mettre en évidence une augmentation de la mortalité par leucémies et cancers solides chez les personnes directement exposées entre 1949 et 1956 (Kossenko 1996; Schonfeld *et al.* 2013). Par ailleurs, une étude a récemment démontré un lien entre l'augmentation des leucémies chez certains de ces individus en fonction de la dose cumulée à la moelle osseuse (Krestinina *et al.* 2013). L'apparition de cancers n'est pas le seul effet observé, d'autres effets de type non-cancéreux ont également été relevés.

1.4.1.2. Les effets non cancéreux

Les études sur les effets cancéreux à la suite des catastrophes nucléaires montrent une réponse dose-dépendante entre la probabilité de survenue des cancers et la dose à laquelle les populations ont été exposées. Mais ceci est discuté dans les cas d'expositions aux faibles doses de radionucléides. Les résultats des études portant sur les effets non cancéreux d'une exposition à long terme sont en effet plus discordants, notamment par l'absence de linéarité entre l'exposition aux radionucléides et la réponse physiologique, mais aussi par la complexité des expositions (*cf.* définition des effets déterministes et stochastiques).

Concernant les populations ayant survécu aux bombes atomiques d'Hiroshima et Nagasaki, une augmentation de la survenue de maladies cardiovasculaires a été mise en évidence (Little 2009). De même, dans cette cohorte, une immuno-sénescence se traduisant par une diminution de la fonction des lymphocytes T, de la production de lymphocytes T helper (Th) et d'interleukine 2 (IL-2) et par l'augmentation de la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires a été observée (Kusunoki & Hayashi 2008; Kusunoki *et al.* 2010). Mais les résultats obtenus dans cette cohorte proviennent essentiellement d'une exposition à une irradiation externe flash, avec une composante neutrons et non de contamination interne, ou du moins minoritaire.

A la suite de l'accident de Tchernobyl, les effets sur la santé se sont essentiellement manifestés au niveau du système immunitaire. En effet, il avait été observé chez les populations exposées juste après l'accident, des déficiences en lymphocytes T ainsi que des modifications des concentrations d'IgG et IgM chez les enfants vivant sur les territoires contaminés (Yarilin *et al.* 1993; Titov *et al.* 1995). Des atteintes du système hématopoïétique ont également été observées chez des enfants nés avant ou après l'accident et vivant sur les territoires contaminés. Ces atteintes se traduisent par une diminution du nombre de globules rouges, de globules blancs ainsi que du nombre de plaquettes et de l'hémoglobine. Ces atteintes sont corrélées avec la contamination des sols (Stepanova *et al.* 2008) ou avec la mesure de la contamination corporelle (Lindgren *et al.* 2015). Concernant la cohorte de la rivière Techa, les effets observés sont surtout de nature hématopoïétique. Chez une partie des individus il a été mis en évidence une inhibition partielle de l'hématopoïèse accompagnée d'une diminution de la cellularité dans le sang périphérique (Akleyev *et al.* 2010a; Akleyev *et al.* 2010b). Par ailleurs, une atteinte de la physiologie osseuse a également été observée et se traduit par une diminution du taux de remodelage osseux (Tolstykh *et al.* 2011). Des analyses cytogénétiques dans les lymphocytes isolés à partir de prélèvements sanguins chez des personnes exposées ont montré une augmentation des translocations chromosomiques (Akleyev *et al.* 1995; Bauchinger *et al.* 1998) et des aberrations chromosomiques telles que les chromosomes dicentriques (Vozilova *et al.* 2013).

Comme pour les effets cancéreux, toutes les études menées sur les différentes cohortes ne permettent pas d'attester d'un effet spécifique du ^{90}Sr . Pour la plupart de ces études, les facteurs individuels tels que le mode de vie (consommation d'alcool, tabagisme, traitements médicaux, ...), l'exposition à d'autres facteurs environnementaux (pollution de l'air, pesticides,...) ou à d'autres radionucléides persistants (^{137}Cs) ne sont pas pris en compte. Le ^{90}Sr contribue en partie à la survenue de ces effets mais n'est probablement pas le seul responsable. Afin de déterminer quel est son rôle exact, il faut se tourner vers les études expérimentales, que ce soit chez l'animal ou même *in vitro*.

1.4.2. Etudes expérimentales

La plupart des études sur le ^{90}Sr menées en laboratoire s'étendent des années 1960 à 1980. Celles-ci étaient initialement réalisées pour mieux comprendre les effets d'une incorporation de ^{90}Sr sur la santé de l'homme, à la suite des rejets causés par les essais nucléaires atmosphériques. Puis, à partir de l'accident de Tchernobyl en 1986, les études de type « contamination chronique » ont fait leur apparition afin de modéliser au mieux la situation des populations vivant sur les territoires contaminés.

1.4.2.1. Chez l'animal

1.4.2.1.1. Contamination aiguë

Plusieurs études ont été menées sur le chien Beagle, en injectant par voie intraveineuse ou intrapéritonéale du $^{90}\text{SrCl}_2$ à forte concentration (de l'ordre du MBq.kg^{-1}), les effets obtenus étant semblables d'une étude à l'autre. Globalement, il a été montré une augmentation de la mortalité chez les animaux contaminés. Cette mortalité est liée à l'apparition de troubles hématopoïétiques (Nilsson & Book 1987) ou encore une augmentation de la survenue d'ostéosarcomes proportionnellement à la dose cumulée au squelette, que ce soit après injection unique ou multiple (Thurman *et al.* 1971). D'autres effets tels que des hémangiosarcomes ainsi que des leucémies myéloïdes ont été mises en évidence chez les chiens contaminés (Dougherty *et al.* 1972; Finkel *et al.* 1972; Thurman *et al.* 1973). De même, dans les années 1970, des travaux ont démontré l'apparition d'ostéosarcomes et d'hémangiosarcomes après inhalation de ^{90}Sr à des concentrations comprises entre 137 kBq.kg^{-1} et $3,5 \text{ MBq.kg}^{-1}$ (Benjamin *et al.* 1975).

D'autres modèles animaux ont aussi été utilisés. Une étude sur le minipig, contaminé par injection intraveineuse de $^{90}\text{SrCl}_2$ à $2,36 \text{ MBq.kg}^{-1}$ a montré une augmentation de la survenue d'ostéosarcomes localisés à la mandibule et à la boîte crânienne (Howard *et al.* 1969). De même, des travaux chez les lapins contaminés par injection aiguë de $^{90}\text{SrCl}_2$ à des concentrations comprises entre $18,5 \text{ MBq.kg}^{-1}$ et 37 MBq.kg^{-1} ont été décrites comme conduisant à une augmentation de la mortalité. Les facteurs associés à la mortalité sont des troubles hématopoïétiques tels que l'anémie ou la leucopénie, symptômes caractéristiques d'un syndrome hématopoïétique lié à une irradiation à forte dose, ainsi que l'apparition de multiples ostéosarcomes (Owen *et al.* 1957).

Chez le rat, une étude par injection unique de 300 à 740 kBq.g^{-1} de $^{90}\text{SrCl}_2$ a démontré la survenue de troubles hématopoïétiques tels qu'une leucopénie précoce, une neutropénie, une réticulopénie ainsi qu'une anémie observée un mois après l'injection (Galle 1997).

Enfin, une étude plus récente sur des souris C57BL/6 contaminées par injection caudale avec 200 kBq de $^{90}\text{SrCl}_2$ a démontré une atteinte du système immunitaire. Ceci se traduit par une apoptose des lymphocytes B et T ainsi que par une atrophie des organes lymphoïdes 30 jours après l'injection (Ghandhi *et al.* 2015). Par ailleurs, cette étude a permis de montrer un effet du ^{90}Sr directement sur la régulation des gènes en identifiant 1180 gènes comme étant sous exprimés tout au long de l'expérimentation. Une analyse détaillée de ces gènes a démontré leur implication dans le développement des lymphocytes B et dans le maintien de la stabilité des ARN.

L'ensemble des résultats issus de ces études de contamination aiguë a permis de mieux comprendre le comportement du ^{90}Sr lorsqu'il rentre dans l'organisme, en identifiant clairement le squelette comme organe principal d'accumulation. Cependant, bien que des effets délétères aient été démontrés, les modèles décrits ne sont pas adaptés aux situations d'exposition des populations vivant sur les territoires contaminés. De plus, ces études ont essentiellement évalué l'induction de cancers sans regarder les effets non-cancéreux (sauf pour les troubles hématopoïétiques). D'autres études ont donc été menées en diminuant les concentrations de ^{90}Sr administrées et en augmentant le temps d'exposition des animaux.

1.4.2.1.2. Contamination chronique

Contrairement aux études menées sur la toxicité aiguë du ^{90}Sr , réalisées par injection ou par inhalation, les études concernant la contamination chronique se font essentiellement par ingestion d'aliments ou d'eau supplémentés en ^{90}Sr .

Les travaux de Dungworth (Dungworth *et al.* 1969) menés sur un modèle de chiens Beagles contaminés pendant une durée de 1,5 ans ont montré la survenue de troubles hématopoïétiques en réponse à des concentrations de ^{90}Sr comprises entre 1,1 et 444 kBq.jour⁻¹. Les atteintes observées sont des syndromes myéloprolifératifs, dont la gravité varie de façon dose-dépendante, et des anémies. D'autres études (Book *et al.* 1982; White *et al.* 1993) ont aussi montré une augmentation de la mortalité de chiens Beagles contaminées *via* l'alimentation durant 1,5 années par des concentrations de ^{90}Sr comprises entre 0,740 kBq et 1,332 MBq.jour⁻¹, ceci ayant été observé pour les plus fortes concentrations ingérées. Par ailleurs, des tumeurs osseuses dose-dépendantes et une augmentation du nombre de tumeurs par animal proportionnellement à la dose cumulée au squelette ont aussi été montrées. Ces études ont également démontré la prévalence des tumeurs osseuses dans les os longs, où le ^{90}Sr s'accumule de façon préférentielle.

Chez le minipig, des études de contamination parentale avec des concentrations de ^{90}Sr variant de 37 à 114,7 MBq.jour⁻¹, suivie de la contamination de la descendance (4,6 à 11,5 MBq. jour⁻¹) sur des périodes allant jusqu'à 11 ans, ont montré une apparition de troubles hématopoïétiques et de tumeurs osseuses dans les deux générations (Clarke *et al.* 1970; Howard & Jannke 1970).

Dans un modèle de rats contaminés à l'âge adulte avec de l'eau de boisson supplémentée en ^{90}Sr durant 37 jours (29 MBq en activité de ^{90}Sr totale cumulée), il a été observé une augmentation de la mortalité des animaux en association avec l'apparition d'ostéosarcomes, surtout au niveau des os longs. De même, une légère modification de la densité osseuse a pu être mise en évidence (Hopkins *et al.* 1966). D'autres travaux ont rapporté une augmentation de 6,1 % de la fréquence

des leucémies myéloïdes chez des rats ayant reçu de façon chronique une concentration totale de ^{90}Sr de $370 \text{ kBq}\cdot\text{kg}^{-1}$ par l'eau de boisson (Galle 1997).

L'ensemble de ces études démontre l'apparition de nombreux effets déterministes lorsque les animaux sont contaminés sur le long terme (plusieurs années pour le chien Beagle). Cependant le choix des concentrations de ^{90}Sr est discutable, notamment sur la représentativité de la situation des territoires contaminés.

Plus récemment, une étude du laboratoire a été menée sur des souris Balb/c sur une durée de 24 semaines, en contaminant les animaux dès le stade *in utero* avec du ^{90}Sr dans l'eau de boisson à une concentration de $20 \text{ kBq}\cdot\text{L}^{-1}$ (représentant environ $4 \text{ kBq}/\text{kg}/\text{jour}$ ou $100 \text{ Bq}/\text{animal}/\text{jour}$). Les résultats obtenus n'ont pas montré d'effets au niveau hématopoïétique ni d'ostéosarcomes. Cependant, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la résorption osseuse sans modification de la minéralisation de l'os ont été observés (Synhaeve *et al.* 2014). Dans une autre étude, les animaux contaminés à $20 \text{ kBq}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{90}Sr ont été vaccinés contre la Toxine Tétanique (TT) ou contre l'hémocyanine de l'ormeau géant (Keyhole Lympet Hemocyanin, KLH). Les résultats ont démontré une modification de la balance Th1/Th2 et Treg associée à une diminution d'immunoglobulines G (IgG) dirigées contre la TT chez les animaux contaminés (Synhaeve *et al.* 2016).

L'ensemble des études de contamination chronique par le ^{90}Sr démontre que celui-ci présente des effets même à des doses faibles. Ils suggèrent que les effets observés chez les individus des différentes cohortes (rivière Tetcha, habitants de Tchernobyl) peuvent en partie s'expliquer par l'ingestion de ^{90}Sr à long terme.

1.4.2.2. Etudes *in vitro*

Les études utilisant des modèles *in vitro* sont peu nombreuses, la plupart utilisent le ^{90}Sr en tant que source extérieure d'irradiation β - sur des cultures de lymphocytes humains obtenus à partir de prélèvement sanguins.

Des études réalisées par irradiation à faible débit de dose (environ $0,2 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) et avec des doses d'irradiation allant de 0,2 à 5 Gy (de Oliveira *et al.* 2001) ou de 0,138 à 2,76 Gy (Vulpis & Scarpa 1986) ont montré une augmentation des aberrations chromosomiques (chromosomes acentriques, dicentriques) en fonction de la dose d'irradiation utilisée ainsi que l'apparition de dommages à l'ADN dès 0,2 Gy d'irradiation. De même, d'autres études utilisant des doses d'irradiation comprises entre 0,3 et 3 Gy (Hall & Wells 1988; Mill *et al.* 1996) ont démontré la formation de micro-noyaux dérivant pour la plupart de chromosomes acentriques.

Globalement, ces études mettent en évidence les effets d'une irradiation β sur l'ADN des cellules en culture. Cependant, aucune expérimentation de contamination directe par le ^{90}Sr *in vitro* (directement dans le milieu de culture) n'a été réalisée auparavant. Par ailleurs, il y a un réel manque de données expérimentales concernant les éventuelles atteintes fonctionnelles des cellules (altération de la prolifération cellulaire, modifications du profil sécrétoire, cytotoxicité,...) et qui permettraient au moins en partie d'expliquer les résultats obtenus chez l'animal ou encore ceux observés chez l'homme sur les territoires contaminés.

1.5. Objectifs de la thèse

Les données de biocinétique concernant le ^{90}Sr précédemment décrites ont clairement identifié le squelette comme site principal d'accumulation de ce radionucléide. Par ailleurs, les précédentes études du laboratoire ont permis de mettre en évidence les effets d'une contamination chronique par le ^{90}Sr à la fois sur le système immunitaire et sur la physiologie osseuse. Cependant, les mécanismes d'action qui permettent de comprendre ces effets ne sont pas encore élucidés. Le but de ce travail est donc de comprendre quels sont les mécanismes du ^{90}Sr au niveau de son lieu principal de stockage pouvant expliquer les résultats obtenus au laboratoire.

2. Les systèmes physiologiques pouvant être impactés par le ^{90}Sr

2.1. La physiologie osseuse

Le squelette est la charpente du corps humain, il se compose chez l'homme adulte de 206 os et représente environ 20 % du poids total du corps. Il possède à la fois un rôle de soutien et un rôle protecteur pour les organes vitaux internes. Il est également le principal organe de stockage du Ca (99 % du Ca de l'organisme est renfermé dans le squelette) et du phosphore (P), il possède donc également un rôle métabolique important. De plus, il est le siège de l'hématopoïèse qui se déroule dans la moelle osseuse. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, le ^{90}Sr après exposition est majoritairement stocké dans l'os qui devient alors le principal organe cible lors d'une contamination par ce radionucléide.

2.1.1. Généralités

2.1.1.1. Les différents types d'os et leur structure

Il existe 4 catégories d'os : les os longs, les os courts, les os plats et les os irréguliers. Les os longs résultent de la combinaison entre une formation endochondrale et membranaire, alors que les os plats résultent d'une formation uniquement membranaire (Clarke 2008). Les os longs sont composés d'une partie centrale appelée la diaphyse qui relie *via* les métaphyses ses deux extrémités, les épiphyses (**Figure 6 A**). La diaphyse renferme la moelle osseuse au sein de sa cavité.

L'os est une structure complexe composée de minéraux (jusqu'à 70 %), de matrice organique (jusqu'à 40 %), d'eau (jusqu'à 10 %) et de lipides (moins de 3 %). Le contenu minéral est majoritairement constitué de Ca et de P, complexés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. La fraction organique quant à elle, est composée à 90 % de collagène de type I (CollaI) mais également de protéines non collagéniques telles que l'ostéocalcine (OCN), l'ostéonectine, la fibronectine, la bone sialoprotéine (BSP), les bone morphogenetic proteins (BMP) et les facteurs de croissance (Florencio-Silva *et al.* 2015). Grâce à cette composition, l'os est à la fois un tissu solide et élastique.

2.1.1.2. Architecture

Au niveau histologique, il existe deux types d'os mature : l'os cortical ayant une structure dense et compacte et l'os trabéculaire présentant une structure en travées, les trabécules, plus lâche. L'os trabéculaire est présent surtout au niveau de la partie centrale des os plats et au niveau des épiphyses des os longs. L'os cortical au contraire, constitue la surface de tous les os et de la

diaphyse pour les os longs (Datta *et al.* 2008). Au total, il est estimé que le squelette se compose à 80 % d'os cortical et à 20 % d'os trabéculaire.

Le tissu osseux est constitué de la superposition d'unités de base, les ostéons, composés de lamelles concentriques de fibres de collagène. Dans l'os cortical, les lamelles sont organisées autour d'une cavité, le canal de Havers qui renferme en son centre des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses (**Figure 6 B**). Les ostéons forment un réseau dense et serré contrairement à l'os trabéculaire où les unités de base sont des semi-ostéons en forme de demi-lune, avec une ouverture sur la moelle.

Les unités de base de l'os sont encerclées par un tissu fibreux, le périoste, recouvrant la surface externe de l'os cortical, à l'exception de la partie articulaire des épiphyses recouvertes de cartilage. Le périoste est solidement attaché à l'os cortical par d'épaisses fibres de collagène, les fibres de Sharpey. L'endoste, au contraire est une structure membranaire qui recouvre la partie interne de l'os cortical, l'os trabéculaire et les canaux sanguins, appelés canaux de Volkman dans l'os cortical qui permettent de relier les ostéons (Clarke 2008). L'endoste renferme les cellules osseuses : les ostéoblastes et les ostéoclastes.

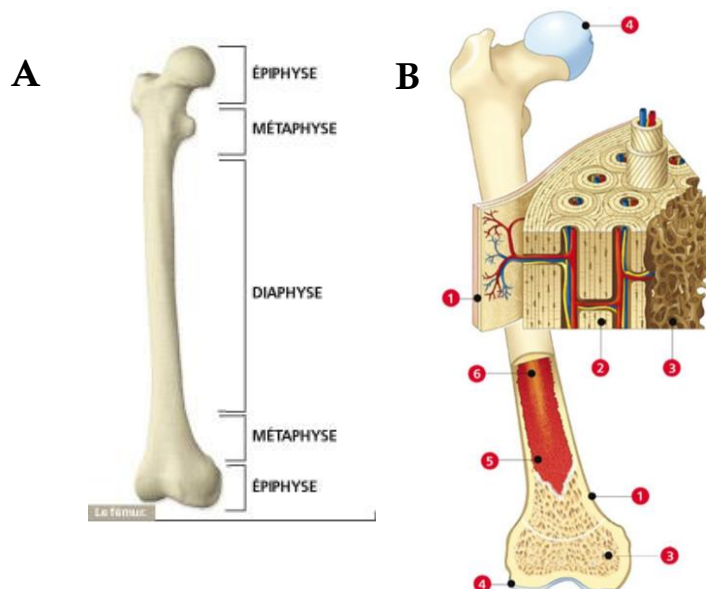


Figure 6: Architecture des os longs

- A. Structure générale d'un os long
 B. Vue d'un os en coupe :
- 1) Périoste
 - 2) Os cortical composé d'ostéons
 - 3) Os trabéculaire
 - 4) Cartilage articulaire
 - 5) Moelle rouge
 - 6) Moelle jaune, uniquement chez l'adulte

D'après lecorpshumain.fr

2.1.1.3. Les cellules osseuses

Les cellules osseuses prennent leur origine dans la moelle osseuse qui renferme deux grandes lignées cellulaires (dont le rôle sera décrit plus en détail dans un chapitre dédié) :

- Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) à l'origine des cellules sanguines et immunitaires
- Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) à l'origine des cellules adipeuses, cartilagineuses et osseuses.

Les principales lignées osseuses contribuant à l'équilibre de la physiologie de l'os sont les ostéoblastes et les ostéoclastes.

2.1.1.3.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes localisées à la bordure osseuse et représentent jusqu'à 6 % de la population cellulaire totale, ce sont les cellules responsables de la production de la matrice osseuse. Morphologiquement, ces cellules possèdent des caractéristiques de cellules sécrétrices comme un reticulum endoplasmique abondant, un appareil de Golgi très développé ainsi que de nombreuses vésicules de sécrétion (Florencio-Silva *et al.* 2015).

Ces cellules dérivent de la différenciation d'un pool de CSM qui s'engage vers la lignée ostéoprogénitrice grâce à l'activation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Transforming growth Factor β (TGF- β)/Bone Morphogenetic protein (BMP) (Datta *et al.* 2008). Ces deux voies de signalisation induisent l'activation du facteur de transcription Runt-related transcription factor 2 (Runx2). Runx2 est un membre de la famille des facteurs de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN Runt et son activation permet d'orienter les CSM vers la différenciation ostéoblastique tout en inhibant les voies adipocytaires et chondrocytaires. Grâce à son hétérodimérisation avec le facteur Co-activateur core binding factor b (Cbfb), Runx2 se lie à l'ADN et induit l'expression des gènes *Colla1*, ostéopontine (*Opn*) et ostéocalcine (*Ocn*) dans les cellules au stade pré-ostéoblastes. L'expression de ces gènes est nécessaire pour la production de matrice osseuse aux stades précoces de la différenciation ostéoblastique. Un autre facteur clé de la formation du tissu osseux, est le facteur de transcription Osterix (*Osx*). *Osx* appartient à la famille des facteurs de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc et est activé par la voie de signalisation médiée par les BMP, mais pourrait également être une cible de Runx2 (Datta *et al.* 2008). Ce facteur de transcription est exprimé dans les pré-ostéoblastes et contribue à leur différenciation en ostéoblastes immatures. En effet, la liaison de *Osx* à l'ADN permet d'activer l'expression des gènes codant la phosphatase alcaline (*Alp*) et le collagène I (*Colla1*). Une fois qu'un pool de pré-ostéoblastes exprimant *Runx2*, *Osx*, *Colla1* et *Alp* est créé, les cellules

deviennent cuboïdes, acquièrent une activité ALP et une capacité de sécrétion de protéines matricielles. Ce sont les ostéoblastes immatures. Le passage vers les ostéoblastes matures se caractérise par une forte expression de protéines de la matrice osseuse (BSP, OCN, Col1aI) (Capulli *et al.* 2014) (**Figure 7**). Une fois la matrice secrétée, les ostéoblastes se retrouvent emmurés dans cette même matrice et à ce stade leur devenir est multiple. Ils peuvent soit entrer en apoptose, soit continuer leur différenciation pour devenir des ostéocytes ou des cellules bordantes (**Figure 7**). Les ostéocytes sont des cellules étoilées qui représentent le stade de différenciation terminale des ostéoblastes avec une activité sécrétrice nettement moins importante que ces derniers. Ils constituent environ 90 % des cellules osseuses adultes et permettent le maintien de la structure et du métabolisme osseux. Les cellules bordantes quant à elles, sont des cellules aplaties sans activité métabolique spécifique recouvrant la surface de l'os. Leur rôle n'est pas encore bien défini, mais elles pourraient servir à éviter l'interaction directe entre la matrice osseuse et les ostéoclastes afin d'empêcher une résorption excessive (Capulli *et al.* 2014).

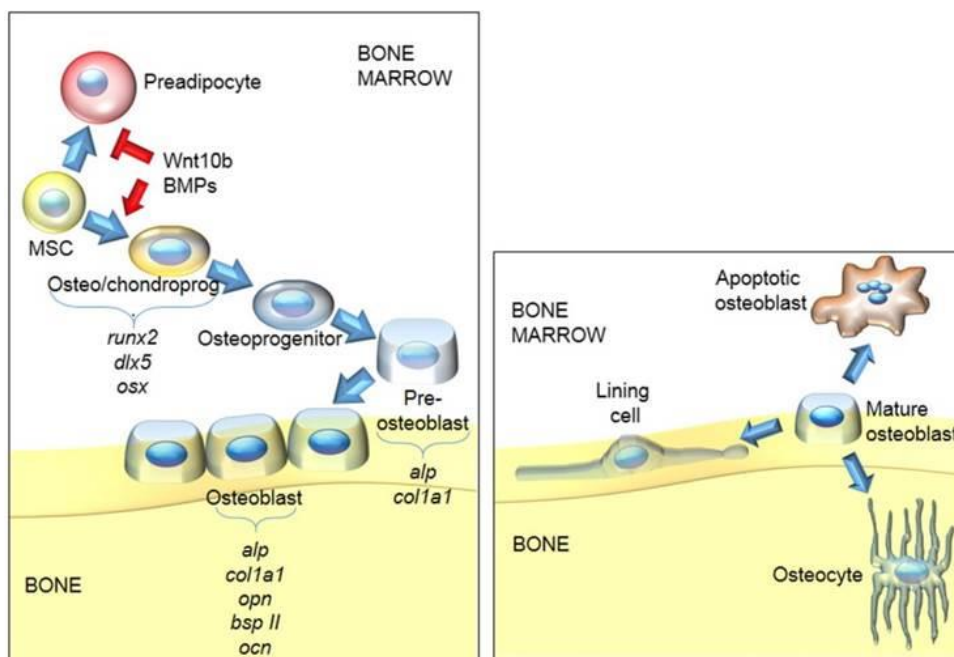


Figure 7: Différenciation ostéoblastique à partir des CSM

La différenciation des ostéoblastes se fait progressivement à partir des CSM grâce à l'expression de facteurs de transcription spécifiques. L'ostéoblaste mature pourra devenir une cellule bordante (lining cell), un ostéocyte ou entrer en apoptose (apoptotic osteoblast). D'après Capulli *et al.* 2014

2.1.1.3.2. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées issues de la lignée hématopoïétique. Ils résultent de la fusion cytoplasmique de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocyttaire colonisant la moelle osseuse. Le Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand (RANKL) et le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) sont les facteurs nécessaires à l'ostéoclastogenèse. Ces deux cytokines sont produites essentiellement par les cellules stromales et les ostéoblastes et permettent d'activer l'expression de gènes et de facteurs de transcription dans les ostéoclastes (Nakashima *et al.* 2012). M-CSF se lie à son récepteur, cFMS, présent sur les précurseurs d'ostéoclastes et induit leur prolifération tout en inhibant leur apoptose. De même, RANKL se lie à son récepteur RANK également présent sur la membrane des précurseurs ostéoclastiques et permet le contrôle direct du processus de différenciation. Un autre facteur, l'ostéoprotégérine (OPG) aussi produit par les ostéoblastes et les cellules stromales peut se lier à RANKL empêchant la liaison avec RANK et donc la différenciation des ostéoclastes. Le système RANK/RANKL/OPG est un médiateur clé de l'ostéoclastogenèse (Florencio-Silva *et al.* 2015) (**Figure 8**). Les ostéoclastes activés sont des cellules polarisées qui se lient aux peptides de la matrice osseuse *via* des récepteurs aux intégrines. Le récepteur le plus important étant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ qui facilite la résorption de la matrice par la liaison avec l'OPN et la BSP. Dans les ostéoclastes matures, la zone en contact avec la matrice présente des bords en dentelle. C'est à travers cette bordure que sont secrétés des ions H^+ *via* des canaux chlorure et H^+ -ATPases provoquant ainsi l'exocytose de vésicules acides. Au contact de la matrice, il y aura une réorganisation du cytosquelette des ostéoclastes pour former un anneau d'actine permettant de sceller la zone d'attache à la matrice. Contrairement aux autres cellules, les ostéoclastes forment des podosomes lorsqu'ils se lient à la matrice, ceci permettant d'augmenter la surface de liaison en comparaison avec une simple adhésion focale (Florencio-Silva *et al.* 2015).

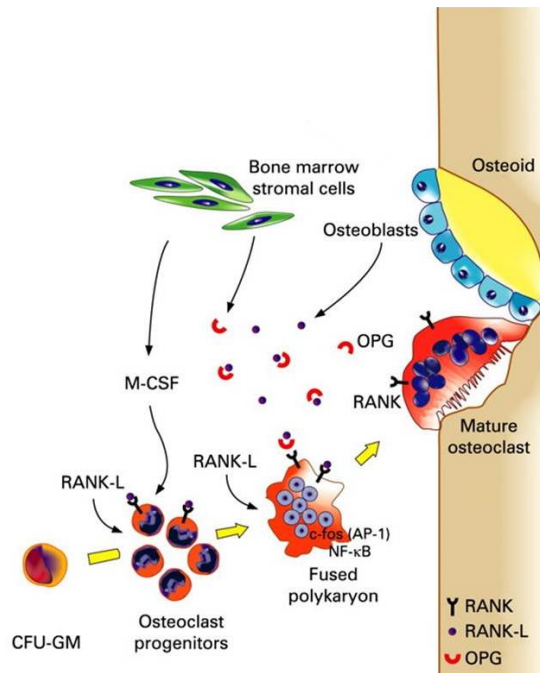


Figure 8: Différenciation des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules polynucléées qui se différencient à partir de progéniteurs monocytaires (CFU-GM) et se caractérisent par l'expression du récepteur RANK à leur surface.
D'après Tilg *et al.* 2008

2.1.2. La croissance osseuse et le remodelage osseux

L'os est un tissu en perpétuel remaniement et tout au long de la vie d'un individu, deux phases se distinguent. Tout d'abord, la phase de croissance osseuse au cours de l'enfance et de l'adolescence pendant laquelle l'os croît longitudinalement à partir d'une zone appelée plaque de croissance. A l'âge adulte, le tissu osseux est en phase de remodelage afin de préserver la force mécanique du tissu. Ce phénomène résulte d'un équilibre entre les processus de formation et de résorption osseuse.

2.1.2.1. La croissance osseuse

Dans le squelette, le développement osseux résulte de deux processus distincts, l'ossification intramembranaire et l'ossification endochondrale.

L'ossification intramembranaire a lieu dans les os plats et implique la différenciation directe des cellules mésenchymateuses embryonnaires en ostéoblastes qui produisent de la matrice osseuse. Dans le reste du squelette, le phénomène d'ossification endochondrale permet progressivement le remplacement du cartilage embryonnaire par du tissu osseux (Mackie *et al.* 2011). Ce phénomène requiert un équilibre à la fois spatial et temporel entre la production et la dégradation de matrice extracellulaire, de la prolifération et l'apoptose des chondrocytes ainsi que des processus de

minéralisation et de vascularisation (Mackie *et al.* 2011). Le cartilage provient de la condensation de cellules mésenchymateuses qui se différencient en chondrocytes. Les chondrocytes sont responsables de la production de matrice cartilagineuse composée en partie de collagène de type II et de proteoglycanes (**Figure 9 A**). Une fois le cartilage formé, les chondrocytes prolifèrent rapidement puis les plus centraux commencent leur maturation et deviennent hypertrophiques. Progressivement, dans le cartilage hypertrophique apparaît le centre primaire d'ossification caractérisé par une invasion vasculaire (**Figure 9 B**). Ces vaisseaux permettent aux progéniteurs d'ostéoclastes et d'ostéoblastes d'arriver jusqu'à l'ébauche osseuse pour y éliminer le cartilage et y produire de la matrice osseuse (Long & Ornitz 2013). Dans cette zone, les lacunes formées après apoptose des chondrocytes hypertrophiques seront remplacées par du tissu osseux et de la moelle osseuse (**Figure 9 C**). L'expansion de la moelle osseuse vers les épiphyses conduit à une disposition des chondrocytes en colonnes formant la plaque de croissance (**Figure 9 D**). Celle-ci est composée de chondrocytes actifs (près de la zone d'ossification secondaire) et inactifs (**Figure 9 F**). A la fin de la croissance, seul reste le cartilage articulaire situé au niveau des épiphyses (**Figure 9 E**).

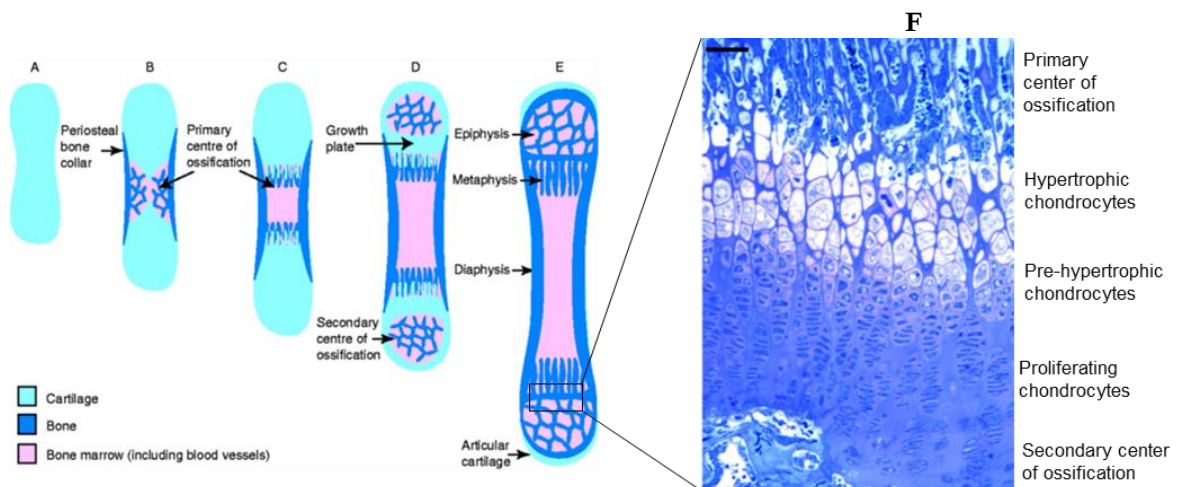


Figure 9: Etapes de la croissance endochondrale et composition de la plaque de croissance

La croissance endochondrale se traduit par le remplacement progressif du tissu cartilagineux par du tissu osseux et de la moelle osseuse à partir du centre primaire d'ossification (Etapes A à E). La plaque de croissance (F) sépare le centre primaire d'ossification du centre secondaire. Elle se constitue de chondrocytes prolifératifs, pré-hypertrophiques et hypertrophiques. *D'après Mackie et al. 2011*

2.1.2.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux permet de maintenir l'équilibre du tissu. Il a trois fonctions principales qui sont le maintien de l'homéostasie phosphocalcique, la réponse aux stress mécaniques et enfin la réparation de lésions survenant tout au long de la vie. Il est estimé que 5 à 10 % du squelette est remplacé chaque année chez l'homme (Sims & Martin 2014). Le remodelage se fait par des structures anatomiques appelées unités multi-cellulaires de base (Basic Multicellular Unit, BMU) constituées d'ostéoclastes, d'ostéoblastes, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses. La plupart des sites de remodelage sont distribués au hasard au sein du squelette, cependant il peut exister des zones ciblées, en cas de fracture par exemple.

La phase d'initiation du remodelage consiste en la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes et dure environ 3 semaines (**Figure 10**). Elle est régulée par plusieurs facteurs tels que RANKL, OPG, l'interleukine 1 et 6 (IL-1 et IL-6), l'hormone parathyroïde (PTH), la vitamine D et la calcitonine. Par la sécrétion d'ions H^+ au niveau du site de résorption, les ostéoclastes contribuent à abaisser le pH à 4,5 favorisant par la suite le processus de déminéralisation. Les lysosomes excrétés par les ostéoclastes contiennent des enzymes telles que la Tartrate-Resistant Acide Phosphatase (TRAP), la cathepsine K, et la métalloprotéase 9 (MMP-9). Ces enzymes digèrent la matrice organique de l'os, provoquant la formation de lacunes appelées lacunes de Howship (Clarke 2008; Florencio-Silva *et al.* 2015). Une fois la phase de résorption complète, les ostéoclastes sont éliminés par apoptose et les ostéoblastes s'activent progressivement, c'est une phase de transition. Lors de la résorption, les éléments piégés dans la matrice osseuse tels que les ostéocytes, les facteurs de croissance comme le TGF β , les Insulin-like Growth Factors (IGF) ou encore les BMP sont libérés dans les lacunes de Howship. Ces facteurs permettent le recrutement, la différenciation et l'activation des ostéoblastes pour former de l'os. C'est l'étape finale qui dure de 4 à 6 mois (**Figure 10**). Au-delà des facteurs solubles impliqués dans la régulation du système, l'interaction entre les ostéoclastes et les ostéoblastes *via* des molécules de contact a également été démontrée comme intervenant dans ce processus. Ces molécules sont l'EphrinB2 (EphB2), protéine transmembranaire présente à la surface des ostéoclastes et son récepteur EphrinB4 (EphB4) présent sur les ostéoblastes (Kular *et al.* 2012). Chez la femme, les œstrogènes jouent aussi un rôle important dans le phénomène de remodelage osseux, en effet leur diminution au cours de la ménopause engendre une résorption massive de l'os conduisant à l'ostéoporose. Cependant les mécanismes d'action de cette hormone ne sont pas encore bien élucidés (Khosla *et al.* 2012).

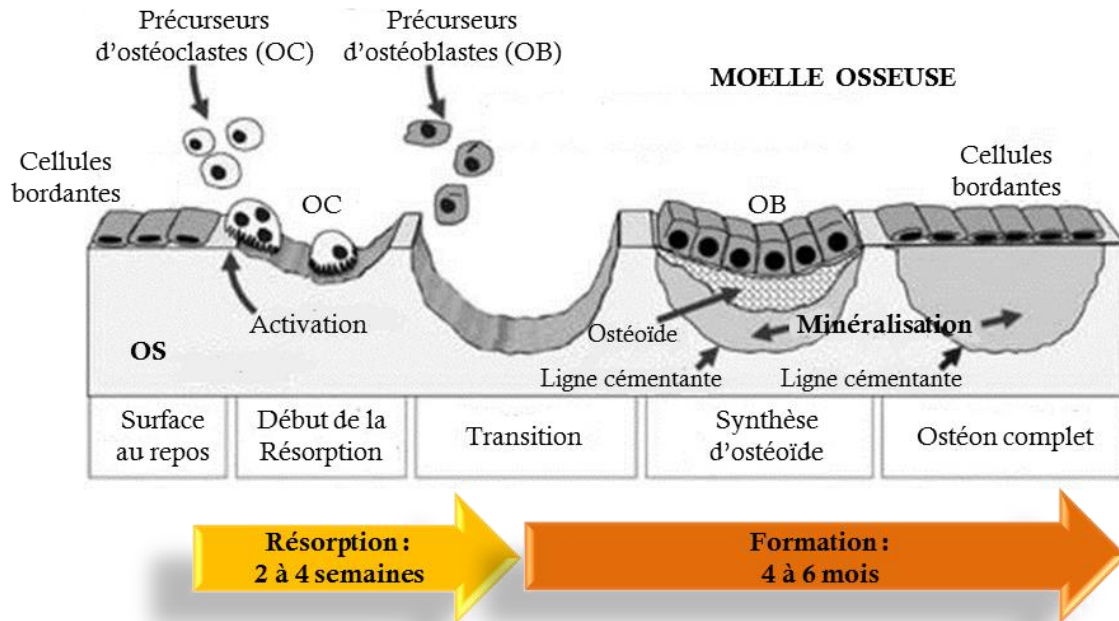


Figure 10: Etapes du remodelage osseux

Le remodelage osseux comporte deux phases. La première est une phase de résorption qui dure 2 à 4 semaines (flèche jaune) au cours de laquelle les ostéoclastes dégradent le tissu osseux. La deuxième phase plus longue s'étend de 4 à 6 mois, c'est la phase de formation (flèche orange) au cours de laquelle les ostéoblastes synthétisent la nouvelle matrice osseuse. *D'après Keamw & Kallmes 2008*

2.1.3. Effets d'une irradiation sur l'os

Les effets d'une irradiation sur l'os sont en majorité observés à la suite des traitements de tumeurs par radiothérapie. En effet, sauf dans les cas de traitement de métastases osseuses pour lequel l'os est l'organe ciblé, le tissu osseux fait généralement partie des tissus sains situés à proximité de la tumeur et pouvant être irradiés. Des études à la fois expérimentales et épidémiologiques ont clairement identifié des atteintes de l'os en réponse à ces traitements. Elles ont démontré chez certains patients une diminution de la densité osseuse (perte de la minéralisation) augmentant ainsi le risque de fractures (Green & Rubin 2014). Cette diminution de la minéralisation osseuse est en général accompagnée d'une augmentation de tissu adipeux dans le compartiment médullaire (Gimble & Nuttall 2004). L'ostéonécrose mais également l'augmentation du risque d'ostéoporose ont été mises en évidence comme conséquences dans les mois suivant l'irradiation du tissu osseux (Kwon *et al.* 2008; İğdem *et al.* 2010). Des études plus mécanistiques ont démontré qu'après irradiation, les CSM de la moelle osseuse peuvent perdre leur capacité à se différencier en ostéoblastes (Wang *et al.* 2016). Enfin, une irradiation du tissu osseux conduit inévitablement à une atteinte du compartiment hématopoïétique, situé au sein de la moelle osseuse.

2.2. Le système hématopoïétique

2.2.1. Généralités

L'hématopoïèse est le processus physiologique à travers lequel les cellules sanguines et immunitaires se forment à partir d'un progéniteur commun, la cellule souche hématopoïétique (CSH) dont les propriétés seront décrites dans un chapitre dédié. Chez l'homme, le compartiment hématopoïétique se situe au niveau de la moelle osseuse des os longs et courts (Szilvassy 2003). Chez la souris, la rate est également un compartiment hématopoïétique en plus du tissu osseux. Au sein même du tissu hématopoïétique il existe quatre compartiments cellulaires : les CSH, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (Borghesi 2014) (**Figure 11**). Chaque compartiment se distingue par son niveau de différenciation. L'hématopoïèse est contrôlée par un microenvironnement spécifique, fourni par les CSM de la moelle osseuse et fait intervenir de nombreux facteurs dont des molécules d'adhésion mais aussi des cytokines et des facteurs de croissance.

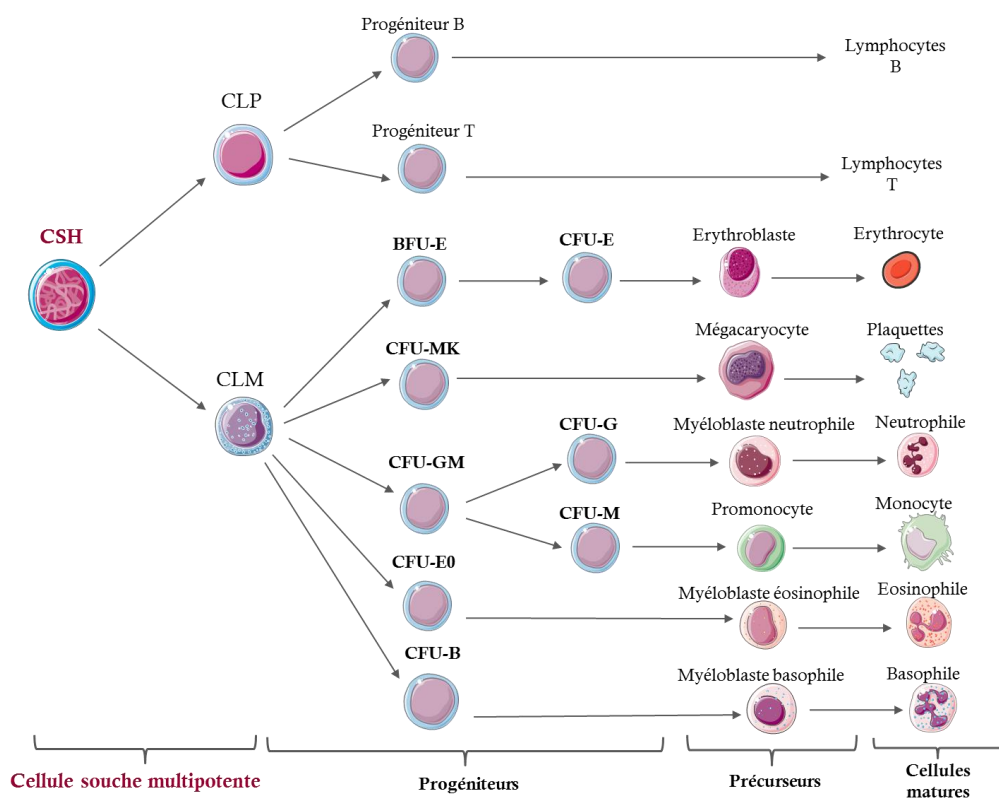


Figure 11: Les compartiments de l'hématopoïèse

Le système hématopoïétique se compose de 4 compartiments, chaque compartiment se caractérise par un stade de différenciation plus ou moins avancé.

Abréviations : CSH-Cellule souche hématopoïétique ; CLM –Progéniteur myéloïde commun ; CLP - Progéniteur lymphoïde commun ; CFU-Colony Forming Unit ; BFU-Burst Forming Unit ; GM-Granulo Macrophagique ; G-Granuleuse ; M-Macrophagique ; MK-Mégacaryocyttaire ; Eo-Eosinophile ; B-Basophile ; E-Erythroïde

2.2.2. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus continu tout au long de la vie. En effet, à part pour les lymphocytes, toutes les cellules sanguines circulantes ont une durée de vie limitée (environ 120 jours pour les érythrocytes, 12 h pour les neutrophiles ou encore 14 jours pour les plaquettes). L'hématopoïèse est donc le processus physiologique qui permet le renouvellement permanent des cellules sanguines. Il a été estimé que chaque jour 350 milliards de cellules sont produites au cours de l'hématopoïèse chez l'adulte (Dingli & Pacheco 2010).

2.2.2.1. Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques

La différenciation des CSH dans la moelle osseuse conduit tout d'abord à la formation de progéniteurs hématopoïétiques précoces à l'origine soit de la lignée myéloïde (CMP) soit de la lignée lymphoïde (CLP), chacun est caractérisé par l'expression de molécules de surface spécifiques (Borghesi 2014). Le CLP est à l'origine des progéniteurs B ou T. Les progéniteurs B se différencient en lymphocytes B et terminent leur différenciation dans la moelle osseuse et leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires. Les progéniteurs T quant à eux, sont à l'origine des lymphocytes T, dont la maturation finale a lieu dans le thymus (Borghesi 2014; Miyazaki *et al.* 2014).

Concernant la lignée myéloïde, les progéniteurs issus de la différenciation du CMP ont une capacité de différenciation limitée à quelques lignées cellulaires mais possèdent un fort pouvoir clonogénique (Szilvassy 2003). Ces progéniteurs sont appelés Colony Forming Cells (CFC), Colony Forming Unit (CFU) ou Burst Forming Unit (BFU) en référence à leur capacité à former des colonies lorsqu'ils sont mis en culture en milieu semi-solide en présence de facteurs de croissance spécifiques (Bradley & Metcalf 1966). Ces progéniteurs sont capables de régénérer l'hématopoïèse à court et moyen terme mais ne peuvent pas reconstituer une hématopoïèse complète à long terme. Plusieurs progéniteurs ont été caractérisés parmi lesquels les CFU-GEMM capables de générer des colonies de granulocytes, macrophages, mégacaryocytes et cellules érythroïdes, les CFU-GM à l'origine des colonies de granulocytes et macrophages et enfin les BFU-E à l'origine de la lignée érythrocytaire (Dingli & Pacheco 2010). Les progéniteurs se différencient ensuite en précurseurs, reconnaissables par leurs caractéristiques morphologiques. La maturation des précurseurs aboutit aux cellules sanguines circulantes matures qui sont les basophiles, les éosinophiles, les neutrophiles, les monocytes, les plaquettes et les hématies.

2.2.2.2. La régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus régulé par le microenvironnement créé au sein de la niche hématopoïétique dans la moelle osseuse par toutes les cellules qui la composent (CSM et ostéoblastes). La régulation par les composants cellulaires et les molécules d'adhésion sera décrite dans un chapitre dédié. Dans cette partie, seule la régulation par les cytokines sera abordée. En effet, en plus de la régulation par les composants cellulaires de la moelle osseuse, l'hématopoïèse est également contrôlée par de nombreux facteurs solubles pouvant agir selon deux modèles (Rieger *et al.* 2009; Endeley *et al.* 2014). Ces cytokines peuvent soit agir directement sur les progéniteurs en induisant le choix du lignage, soit elles peuvent contribuer à la formation d'un microenvironnement sélectif au sein duquel seule la prolifération de certains types de progéniteurs est amplifiée. Cependant, ce rôle n'est pas encore bien défini (Endeley *et al.* 2014). La transduction du signal de ces cytokines est médiée pour la plupart d'entre elles par des récepteurs de type tyrosine kinase. Parmi les cytokines impliquées, la thrombopoïétine (TPO), l'érythropoïétine (EPO), le granulocyte, macrophage et granulocyte-macrophage stimulating factors (G-CSF, M-CSF et GM-CSF), le stem cell factor (SCF), le Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-l), les interleukine 1, 3, 5 et 6 (IL-1, IL-3, IL-5 et IL-6) sont celles ayant une action prépondérante (**Figure 12**). Elles sont secrétées par de nombreuses variétés de cellules au sein de l'organisme et agissent à différents stades du processus d'hématopoïèse (Metcalf 2008). Ainsi, l'EPO est une cytokine produite par les cellules rénales et a une action au cours de la différenciation érythrocytaire (Souma *et al.* 2015). La TPO, produite en majorité par le foie, stimule la prolifération des mégacaryocytes et leur transformation en plaquettes mais peut également stimuler la prolifération des autres lignées par synergie avec les autres facteurs hématopoïétiques (de Graaf & Metcalf 2011). Le G-CSF, quant à lui, est produit par les macrophages, les cellules endothéliales, les lymphocytes T ou encore les fibroblastes en réponse à un stress comme l'irradiation par exemple, et permet la différenciation et la prolifération de la lignée granulocytaire (Singh *et al.* 2012; Bendall & Bradstock 2014). Le GM-CSF induit la différenciation de toute la lignée myéloïde en agissant sur la cellule dès le stade de CMP (Metcalf 2008). Enfin, le Flt3-l joue un rôle clé dans la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques très précoces et peut être comme indicateur de l'atteinte à la moelle osseuse en cas d'accident radiologique (Bertho *et al.* 2001).

L'homéostasie du tissu hématopoïétique est maintenue grâce à l'action de cytokines inhibitrices agissant en parallèle des facteurs stimulant la prolifération et la différenciation des CSH. Parmi les facteurs inhibant l'hématopoïèse, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires interviennent dont l'Interféron- γ (IFN- γ), le Transforming Growth Factor β (TGF β), le Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF α). Ces cytokines agissent

à différentes stades de l'hématopoïèse. En effet, l'IFN- γ est produit par les lymphocytes T et les cellules Natural Killer (NK) au cours de la réponse immunitaire ou encore par les cellules stromales. Son action a tout d'abord été montrée *in vitro* à travers l'inhibition de la formation de colonies à partir de progéniteurs précoces. L'IFN- γ peut agir directement sur les CSH en diminuant leur prolifération et leur auto-renouvellement ou à travers l'inhibition de l'activité de la TPO (de Bruin *et al.* 2014). De même, le TGF β a une action inhibitrice lorsqu'il se lie sur ses récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinases présents sur les progéniteurs précoces. Cette liaison active des voies de signalisation menant à l'inhibition de la transcription de gènes impliqués directement dans la prolifération des CSH mais également dans ceux codant les récepteurs à de nombreuses cytokines (SCF, IL-1 et 3, G-CSF ou GM-CSF) (Vaidya & Kale 2015). Le TNF α est également capable d'inhiber la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, en induisant leur apoptose, mais à des stades de différenciation plus avancés (Allen *et al.* 1999; Mizrahi & Nadir 2014). Enfin, le MIP-1 α produit par les macrophages, est une chimiokine capable également d'inhiber la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques à la fois *in vitro* et *in vivo* et sa production est régulée par d'autres cytokines inhibitrices telles que le TNF α et l'IFN- γ (Cook 1996; Dürig *et al.* 1998).

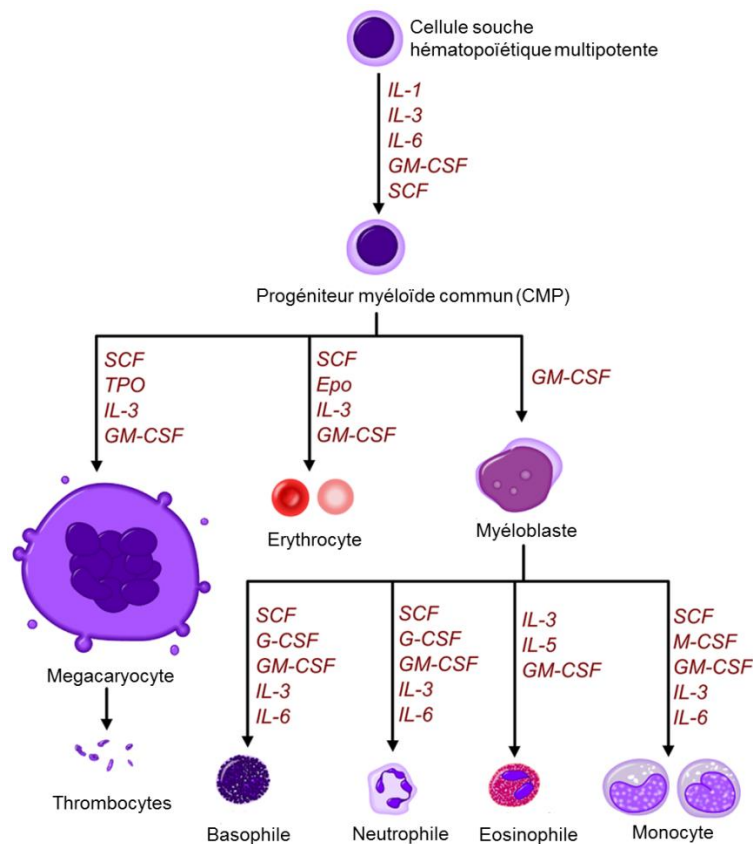


Figure 12: Les cytokines impliquées dans le processus d'hématopoïèse

Adapté d'après Harvey F. Lodish 2003

2.2.2.3. Effets de l'irradiation sur l'hématopoïèse

Du fait de sa hiérarchisation, le compartiment hématopoïétique fait partie des tissus les plus radiosensibles en cas d'irradiation accidentelle (survivants aux essais de la bombe nucléaire, (Iwanaga *et al.* 2011) ou thérapeutique (Mauch *et al.* 1995). C'est en effet le premier organe dans lequel apparaissent les premiers effets délétères liés à la mortalité cellulaire, en fonction de la dose d'irradiation. Le système hématopoïétique se compose de cellules à différents stades de différenciation et donc de radiosensibilité (Oriya *et al.* 2008; Kengo *et al.* 2013). L'atteinte des CSH constitue l'atteinte la plus délétère puisque ces cellules sont nécessaires pour le maintien de l'hématopoïèse à long terme. Du fait de leur état quiescent et de leur faible taux de prolifération, les CSH sont parmi les populations cellulaires les plus radiorésistantes. Cependant, elles sont tout de même susceptibles de cumuler des mutations tout au long de la vie d'un individu, en cas d'irradiation répétée par exemple (Mohrin *et al.* 2010). En général, les conséquences d'une irradiation au niveau de la moelle osseuse se traduisent par une suppression totale ou partielle de l'hématopoïèse (Mauch *et al.* 1995), ceci s'expliquant par une augmentation de l'apoptose des progéniteurs aux différents stades de différenciation (Drouet *et al.* 2008; Mohrin *et al.* 2010). De plus, il a été récemment montré en réponse à une irradiation corps entier une induction de la sénescence précoce des CSH permettant également d'expliquer la suppression de l'hématopoïèse (Wang *et al.* 2006; Shao *et al.* 2014). Enfin, l'hématopoïèse étant le processus au cours duquel les cellules immunitaires sont produites, l'irradiation de ce compartiment peut également engendrer des atteintes au niveau du système immunitaire.

2.3. Le système immunitaire

2.3.1. Généralités

Le système immunitaire est le système biologique de l'organisme capable de distinguer le « soi » du « non soi ». Il existe deux grands types d'immunité, l'immunité innée et l'immunité acquise ou adaptative. L'immunité innée permet d'assurer la réponse immédiate lors d'une agression de l'organisme par un pathogène, cette réponse est médiée par les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules natural killer (NK) (Akira *et al.* 2006; Akira 2009). L'immunité acquise quant à elle, assure l'élimination du pathogène dans la phase terminale de l'infection et permet d'assurer la mémoire immunitaire, elle est médiée par les lymphocytes B et T (Chaplin 2010). Dans chacun de ces deux mécanismes, les cytokines jouent un rôle prépondérant, elles permettent la différenciation de chaque type de cellule immunitaire et assurent également le recrutement des acteurs de la réponse immune pour l'élimination du pathogène.

2.3.2. Les cellules de l'immunité

Les cellules de l'immunité, les leucocytes, prennent leur origine dans les organes lymphoïdes dont il existe deux types : les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les organes lymphoïdes primaires sont la moelle osseuse et le thymus dans lesquels se fait la différenciation des leucocytes. Les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions), représentent les organes de stockage des leucocytes différenciés et sont également le lieu où se fait la réaction de réponse à l'antigène (**Figure 13**). Les leucocytes dérivent d'un même précurseur commun qui se différencie au cours de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. A part pour les lymphocytes, les leucocytes sont classés en fonction de leurs caractéristiques morphologiques après coloration histologique (Fonteneau 2002).

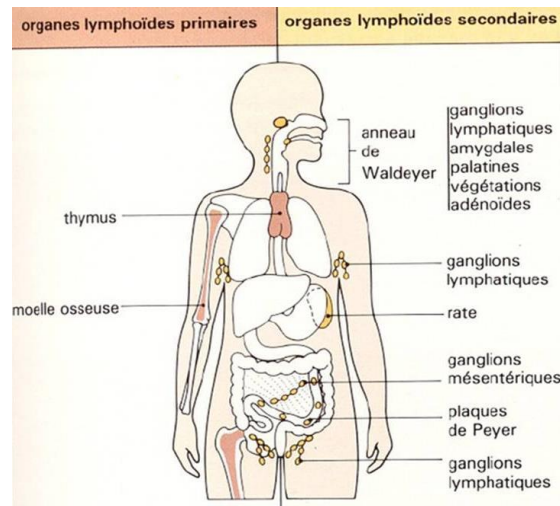


Figure 13: Les organes lymphoïdes primaires et secondaires

D'après Fonteneau 2002

2.3.2.1. Les granulocytes

Les granulocytes sont des cellules polynucléaires reconnaissables à leur noyau multilobé et à la présence de nombreux granules cytoplasmiques contenant des enzymes et des médiateurs pour la réponse inflammatoire. Ils représentent la majorité des leucocytes sanguins. Les granulocytes sont subdivisés en 4 sous-familles en fonction de leur structure : les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes.

2.3.2.1.1. Les neutrophiles

Les neutrophiles constituent la population granulocytaire majoritaire, ce sont des phagocytes capables de rapidement arriver sur le site de l'inflammation du fait de leur grande mobilité. Leur migration est contrôlée par chimiotactisme et grâce aux molécules d'adhésion comme les Intercellular Adhesion Molecule 1 et 2 (ICAM-1 et ICAM-2) ou encore les intégrines (Borregaard 2010). Une fois sur le site d'inflammation, ils vont amplifier le phénomène d'inflammation par relargage de facteurs présents dans les granules tels que le Tumor Necrosis Factor α (TNF α), les interleukines 1 β et 8 (IL-1 β et IL-8) et les récepteurs antagonistes aux interleukines (IL-ra), le TGF- β 1 ou directement par phagocytose (Borregaard 2010; Timár *et al.* 2013). Ils représentent les principaux acteurs dans la réponse immunitaire innée.

2.3.2.1.2. Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des cellules de très courte durée de vie générées en continu par les CSH dans la moelle osseuse (Berek 2016). Ils ont un rôle important dans la réponse inflammatoire générée par des infections parasitaires ou en réponse à un allergène. Ce sont des effecteurs tardifs

qui, lorsqu'ils sont activés (en particulier par l'action de l'Interféron γ) relarguent les substances cytotoxiques contenues dans leurs granules. Ces substances sont des protéines basiques majeures (PBM), des protéines cationiques éosinophiles (PCE), la peroxydase éosinophile et permettent la dégradation des agents pathogènes (Hogan *et al.* 2008). Les éosinophiles jouent également un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire par la sécrétion d'un large spectre de cytokines, facteurs de croissance et chémokines (Hogan *et al.* 2008).

2.3.2.1.3. Les basophiles et les mastocytes

Les basophiles et les mastocytes ont des fonctions communes et sont généralement associés à la réponse immunitaire générée par des parasites ou des allergènes, médiée par les lymphocytes T auxiliaires 2 (Th2) et l'immunoglobuline E (IgE) (Otsuka & Kabashima 2015). Les basophiles sont des cellules circulantes de courte durée de vie qui se différencient dans la moelle osseuse alors que les mastocytes ont une durée de vie plus longue et migrent dans les tissus vascularisés où ils terminent leur différenciation (Stone *et al.* 2010). Leur prolifération est sous la dépendance d'IL-3 mais également du stem-cell factor (SCF) pour les mastocytes (Wedemeyer *et al.* 2000). Lorsqu'ils sont stimulés, les basophiles et les mastocytes relarguent les facteurs contenus dans leurs granules permettant la médiation de la réponse immunitaire. Ces facteurs peuvent être l'histamine, le Platelet Activator Factor (PAF), les protéoglycanes ou encore les prostaglandines, spécifiques des granules mastocytaires (Wedemeyer *et al.* 2000).

2.3.2.2. Les monocytes et les macrophages

Les monocytes/macrophages représentent environ 5 % des leucocytes totaux dans le sang. Ce sont les effecteurs les plus importants de l'immunité innée. Ils jouent un rôle essentiel dans la réponse aux pathogènes car ils sont capables à la fois de générer et de réguler le processus d'inflammation. Ils ont également un rôle important pour le maintien de l'homéostasie tissulaire grâce à leur capacité de phagocytose des cellules sénescents et apoptotiques ou en cas de remodelage et de réparation des tissus après un dommage (Davies & Taylor 2015; Italiani & Boraschi 2015). Les macrophages sont de grands phagocytes distribués dans la plupart des tissus et dérivent de la différenciation des monocytes circulants. Cependant il semblerait que certaines catégories de macrophages soient capables d'auto-renouvellement et possèdent une origine autre que la moelle osseuse (Dey *et al.* 2015).

2.3.2.3. Les cellules lymphoïdes

Les lymphocytes sont les cellules centrales du système immunitaire capables de reconnaître les corps étrangers dans l'organisme. Cette reconnaissance se fait grâce à des récepteurs spécifiques présents à leur surface, les récepteurs aux antigènes. Il existe deux catégories de lymphocytes, les

B (LB) et les T (LT) qui se distinguent par leurs récepteurs de surface et par les clusters de différenciation (CD), déterminants pour leur fonction. Les LB et LT dérivent d'un même progéniteur lymphoïde commun (CLP), la lymphopoïèse se traduisant par la perte graduelle des capacités de différenciation de la cellule souche initiale (Osmond 1985; Rothenberg 2014).

2.3.2.3.1. Les lymphocytes T

Les LT sont responsables de la réponse immunitaire spécifique visant à détruire les cellules pathogènes (bactéries, cellules cancéreuses,...). Il existe plusieurs catégories de LT : les cytotoxiques (Tc), les auxiliaires ou helper (Th), les régulateurs (Treg) et les cellules NK. La structure est homologue d'un lymphocyte T à l'autre, ils possèdent le T-Cell Receptor (TCR) à leur surface, accompagné du cluster de différenciation CD3 ainsi que du CD4 (pour les LT non cytotoxiques, Th et Treg) ou du CD8 (pour les LTc) (Carpenter & Bosselut 2010; Naito & Taniuchi 2010). Dans ce chapitre seule la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ sera décrite.

Tous les LT dérivent de progéniteurs qui partent de la moelle osseuse et arrivent, *via* la circulation sanguine, jusqu'au thymus où ils vont proliférer activement et se différencier en acquérant les capacités de reconnaissance spécifiques des antigènes étrangers (Carpenter & Bosselut 2010). A ce stade, les LT sont appelés LT naïfs, qui par interaction avec les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) se différencient. C'est la nature de la liaison entre les CPA et les LT naïfs qui détermine la voie de différenciation des LT et donc le type de réponse immunitaire (O'Shea & Paul 2010). Les sous-populations de LT CD4⁺ résultantes, sont définies en se basant sur l'expression de facteurs de transcription et de cytokines spécifiques au cours de leur développement (**Figure 14**). En effet, les Th1 qui assurent la défense de l'organisme en activant des mécanismes inflammatoires, sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-box 21 (T-bet) et par la production d'interféron- γ (IFN- γ) (O'Shea & Paul 2010). Au contraire, les Th2 se caractérisent par l'expression du facteur de transcription GATA binding protein 3 (Gata-3) et la production d'interleukine-4 (IL-4) et présentent une spécificité d'action lors des réactions allergiques. Ils sont également impliqués dans la régulation de la production d'anticorps par les LB par la sécrétion de cytokines spécifiques (O'Shea & Paul 2010; Crotty 2015). Enfin, les Treg expriment le facteur de transcription Forkhead box P3 (FoxP3) et sont révélés par la production d'interleukine-10 (IL-10). Ils permettent le maintien de la tolérance immunitaire en régulant la prolifération des autres lymphocytes T et empêchent les réactions auto-immunes (Kaufman *et al.* 2015).

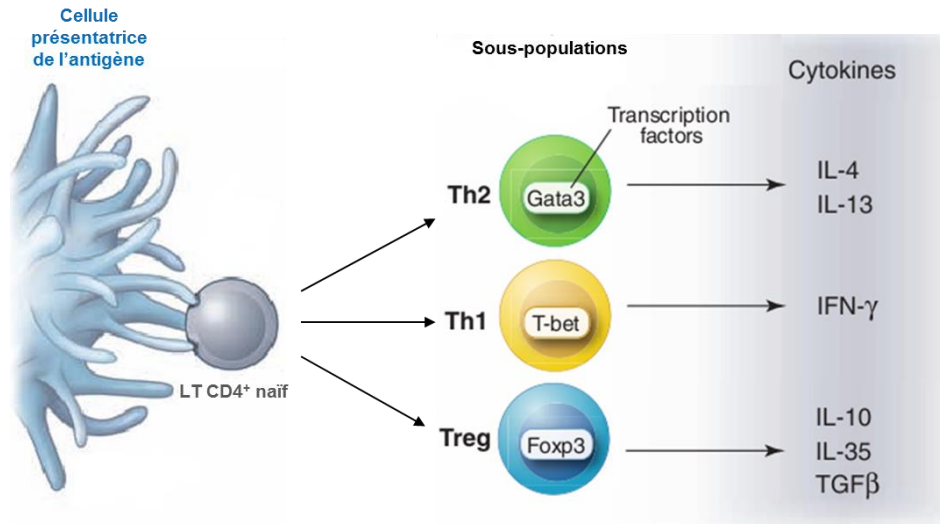


Figure 14: Différenciation des lymphocytes T

En fonction de la nature de la liaison entre la cellule présentatrice de l'antigène et le LT CD4⁺ naïf, les LT vont se différencier vers la voie Th1, Th2 ou Treg. Chaque sous-population se caractérise par l'expression de facteurs de transcription et par la sécrétion de cytokines spécifiques. *Adapté d'après O'Shea & Paul 2010*

2.3.2.3.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) jouent un rôle dans la réponse immunitaire humorale. Ces cellules sont capables de produire des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques et constituent la mémoire immunitaire après interaction avec un antigène. Il existe trois catégories de LB : les LB naïfs, les plasmocytes et les LB à mémoire (Hoffman *et al.* 2016). La différenciation des LB nécessite un microenvironnement particulier formé en partie par les cellules stromales dans la moelle osseuse (contacts intercellulaires, facteurs de croissance) (Melchers 2015; Hoffman *et al.* 2016), c'est un phénomène continu tout au long de la vie à partir des CSH et se compose de plusieurs étapes (**Figure 15**).

La première étape de ce processus est la perte de la capacité d'auto-renouvellement de la cellule souche qui se traduit par l'acquisition du récepteur au Flt3. A ce stade de progéniteur multipotent (PM), les protéines BMI-1 et Protein Regulator of Cytokinesis 1 (PRC-1) sont exprimées et permettent à la cellule de préserver son potentiel de différenciation lymphoïde tout en réprimant le potentiel myéloïde (Melchers 2015).

Les PM deviennent ensuite des progéniteurs lymphocytaires précoces qui à leur tour deviennent des cellules pro-B, caractérisées par l'expression du CD19 à leur surface et par la perte de la capacité à se différencier en LT (Medina *et al.* 2004). C'est l'interleukine 7 (IL-7) qui est responsable de cette transition. Le passage du stade pro-B à pré-B se fait par l'action du SCF et par l'expression des facteurs de transcription Early B-cell Factor 1 (EBF-1) et Paired box 5 (Pax5)

qui empêchent la sortie des cellules de la voie de différenciation B. Les LB matures (naïfs) se caractérisent par l'expression d'immunoglobulines (Ig) spécifiques à leur surface, les IgM et IgD, mais également par l'acquisition du B-cell receptor (BCR) (Melchers 2015; Hoffman *et al.* 2016). Le BCR se construit tout au long de la lymphopoïèse grâce au réarrangement des segments de gènes qui codent pour les chaînes des immunoglobulines, les segments V, D et J. Le BCR permet la reconnaissance des antigènes, chaque lymphocyte se distinguant d'un autre par la variation de la structure de l'Ig du BCR. Une fois le BCR acquis, les LB naïfs (qui n'ont encore jamais interagi avec un antigène) sortent de la moelle osseuse pour se loger dans les organes lymphoïdes secondaires en attente de la rencontre avec l'antigène. La survie des LB dépend de leur rencontre avec l'antigène, sans laquelle le LB meurt par apoptose dans un délai de quelques jours à quelques semaines (Nutt *et al.* 2015). Lorsque le LB rentre en contact avec l'antigène, celui-ci devient un plasmocyte capable de produire les anticorps spécifiques à l'antigène rencontré (Nutt *et al.* 2015). Les plasmocytes représentent le stade de différenciation final des LB, ils sont localisés dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques,...) et sont capables de produire des anticorps solubles, impliqués dans la réponse immunitaire acquise.

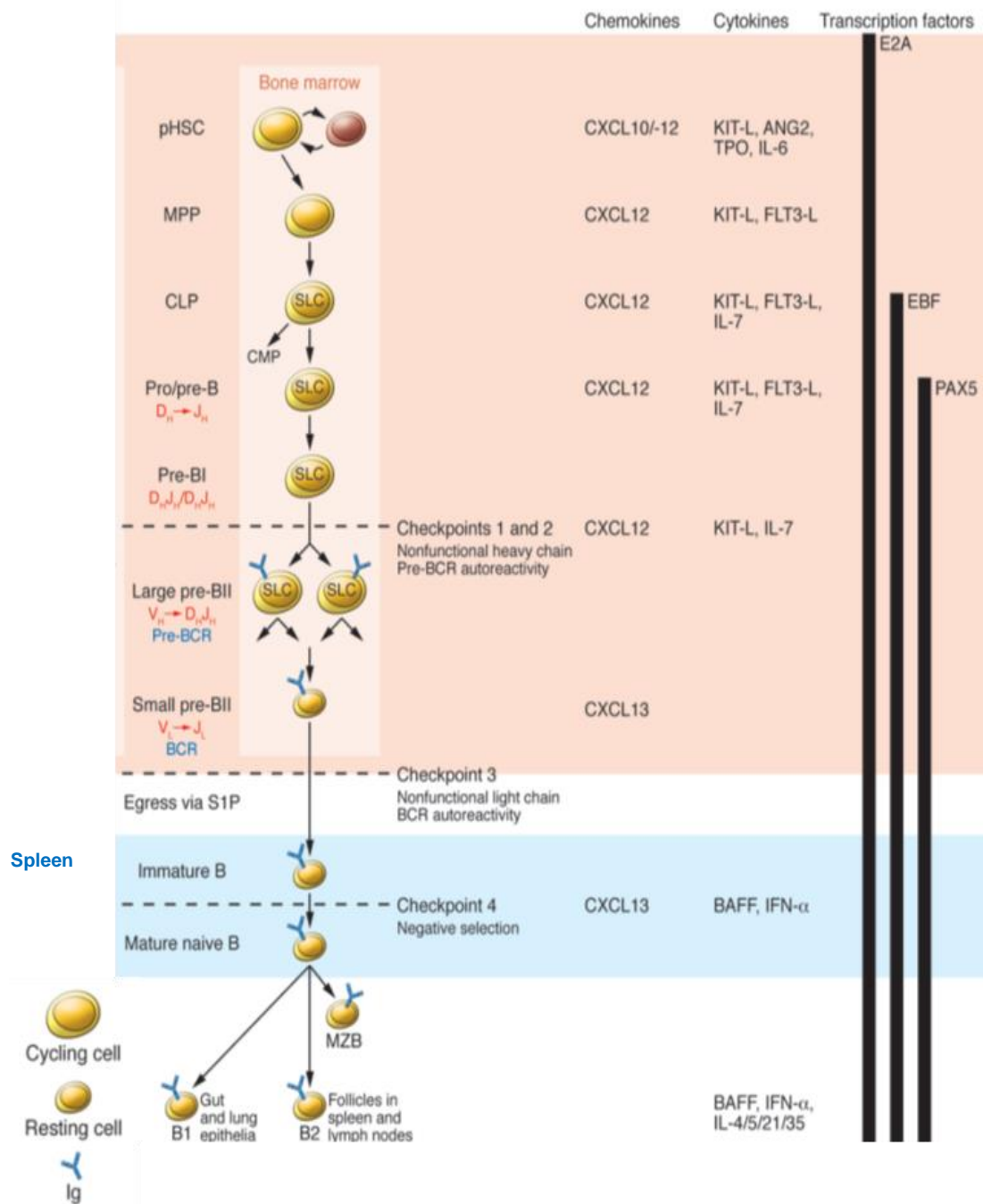


Figure 15: Etapes de la lymphopoïèse B

La lymphopoïèse débute dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (pHSC) qui se différencient progressivement en progéniteurs myéloïde/lymphoïdes multipotents (MPP), puis en progéniteur lymphoïde commun (CLP) jusqu'à aboutir au stade de LB mature dans la rate. Les LB1 colonisent les poumons et l'épithélium, les LB2 se logent dans la zone folliculaire de la rate pour former les centres germinatifs et les MZB colonisent la zone marginale. Tout au long du processus, de nombreuses cytokines, chémokines et facteurs de transcription contribuent au bon déroulement de la différenciation des LB.

Adapté d'après Melchers 2015

2.3.3. La réponse immunitaire

L'organisme est sans cesse agressé par de nombreux microorganismes, éliminés grâce au système immunitaire. Il existe deux types de réponse immunitaire : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise ou adaptative. Ces deux mécanismes ont chacun des caractéristiques bien particulières, cependant ils ne sont pas exclusifs l'un de l'autre et interagissent afin d'éliminer efficacement les pathogènes (Schenen & Medzhitov 2011; Iwasaki & Medzhitov 2015).

2.3.3.1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les pathogènes et est médiée par les phagocytes, dont les macrophages et les cellules dendritiques. Elle se caractérise par sa rapidité, son caractère non spécifique et par l'absence de mémoire. La première étape de la réponse immunitaire innée est la reconnaissance de l'agent pathogène par les cellules de l'organisme (Akira 2009). Cette reconnaissance se fait grâce aux récepteurs de reconnaissance de motifs microbiens, les Receptor Recognition Pattern (PRR) présents sur les cellules, capables de reconnaître les pathogènes *via* leurs motifs moléculaires Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) (Iwasaki & Medzhitov 2015). La reconnaissance des PAMP par les PRR aboutit à l'activation de voies de signalisation conduisant à la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens. Il existe différentes catégories de PRR, les principales étant les Toll-Like Receptors (TLR) et les Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors (NLR) (Iwasaki & Medzhitov 2015).

2.3.3.2. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative est impliquée dans l'élimination du pathogène dans les phases tardives de l'infection. Contrairement à la réponse innée, elle permet l'établissement de la mémoire immunitaire. Elle est spécifique de l'agent qui l'a induite et se caractérise par une augmentation de la réponse à chaque rencontre avec le même agent pathogène.

La première étape de la réponse immunitaire adaptative est la reconnaissance de l'antigène par les LT. Cette reconnaissance se fait grâce à l'interaction entre les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et les LT CD4⁺. En fonction de la nature de la liaison, la différenciation du précurseur des LT se fait vers la voie Th1 ou Th2 (O'Shea & Paul 2010). C'est cette polarisation des Th qui permet de diriger la réponse immunitaire vers la voie humorale ou vers la voie cellulaire (Kidd 2003). Les cellules dendritiques, les monocytes ou encore les LB font partie de la population de CPA, cependant les cellules dendritiques sont les plus efficaces (Guermonprez *et al.* 2002; Chaplin 2010). Ces cellules se situent dans les tissus périphériques et sont capables de

reconnaître les antigènes, de les internaliser et de les dégrader en peptides protéolytiques, dont la taille varie de 10 à 12 acides aminés (Chaplin 2010). Les peptides ainsi formés sont chargés au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), situé à la surface des cellules dendritiques. L'interaction entre les CMH II des cellules dendritiques et le TCR sur les LT CD4⁺ naïfs se fait dans les organes lymphoïdes secondaires, dans lesquels les cellules dendritiques migrent depuis les tissus périphériques grâce à l'action de cytokines et de chemokines spécifiques (Guermonprez *et al.* 2002). Cette interaction favorise la différenciation des LT naïfs en Th2 (Crotty 2015). L'antigène peut aussi se lier directement sur le BCR des LB naïfs dans la zone folliculaire des centres lymphoïdes secondaires.

Dans le cas de la réponse immunitaire humorale, c'est l'interaction avec les Th2 qui permet aux LB de recevoir des signaux nécessaires à la poursuite de la réponse immunitaire (Crotty 2015). Les LT et LB activés migrent ensemble dans la partie externe du follicule où les LB prolifèrent activement (**Figure 16 a**). A ce stade, les LB en prolifération peuvent se différencier selon trois voies. Ils peuvent soit devenir des plasmocytes à courte durée de vie dont le rôle est la production d'anticorps spécifiques de l'antigène présenté (**Figure 16 b**), soit des LB mémoire (**Figure 16 c**) ou retourner vers le centre germinatif dans lequel ils continuent à proliférer, cette expansion clonale s'accompagnant de la diversification du BCR (**Figure 16 d**). Les LB se trouvant dans le centre germinatif peuvent se différencier à leur tour en LB à mémoire (**Figure 16 e**) ou alors en plasmocytes à longue durée de vie, à l'origine de la mémoire immunitaire sérologique (**Figure 16 f**).

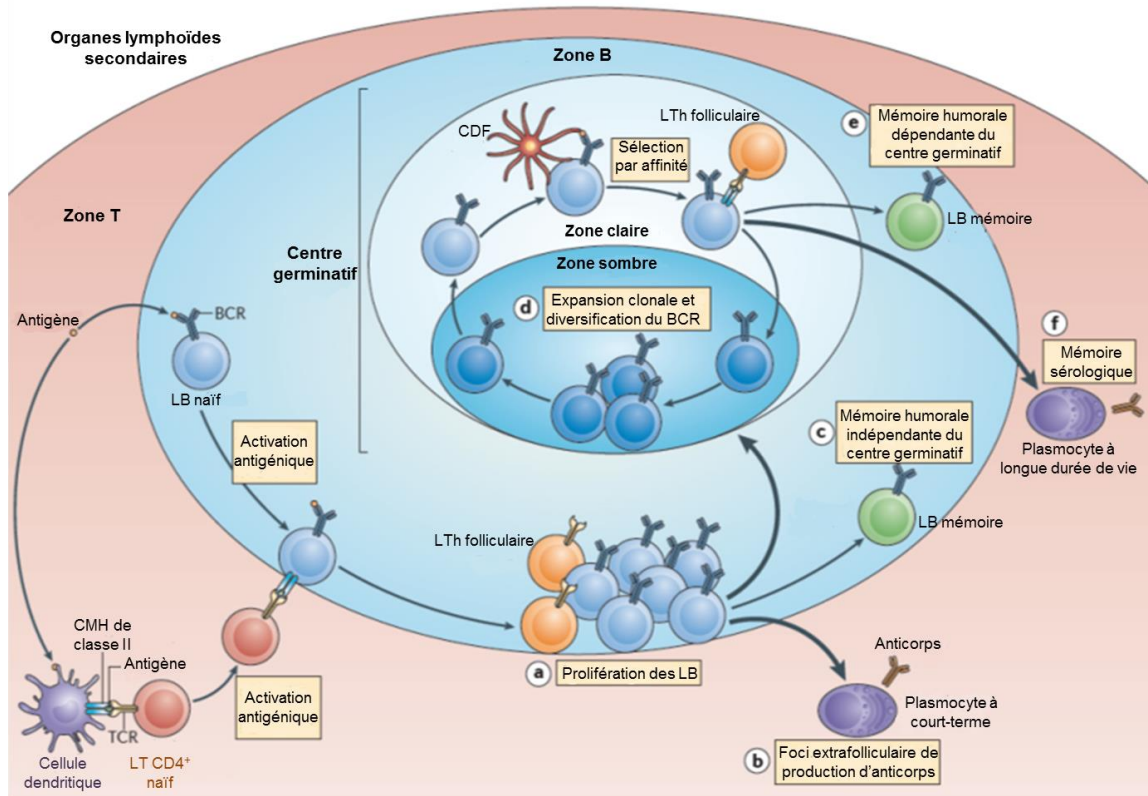


Figure 16: Etapes clés de la réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire débute par l'interaction entre le CMH de classe II des cellules dendritiques et le TCR sur les LT CD4⁺ naïfs. Les LT et LB activés migrent à l'extérieur de la zone folliculaire où les LB vont activement proliférer (a). A ce stade les LB peuvent devenir des plasmocytes à courte durée de vie synthétisant des anticorps (b), des LB mémoire (c) ou retourner vers le centre germinatif (d). Dans la zone sombre du centre germinatif, l'expansion clonale des LB se poursuit et les LB pourront devenir des LB mémoire (e) ou des plasmocytes à longue durée de vie (f). *Adapté d'après Kurosaki et al. 2015*

3. Les cellules souches pouvant être impactées par le ^{90}Sr

Comme mentionné dans les chapitres précédents, le principal site d'accumulation du ^{90}Sr dans l'organisme est l'os. L'énergie émise au cours de sa désintégration affecte un parcours dans la matière jusqu'à 200 μm , le rayonnement aura donc un impact préférentiellement sur le tissu osseux environnant et sur les cellules à proximité de l'os cortical qui sont les cellules bordantes, les CSM et les CSH (Figure 17).

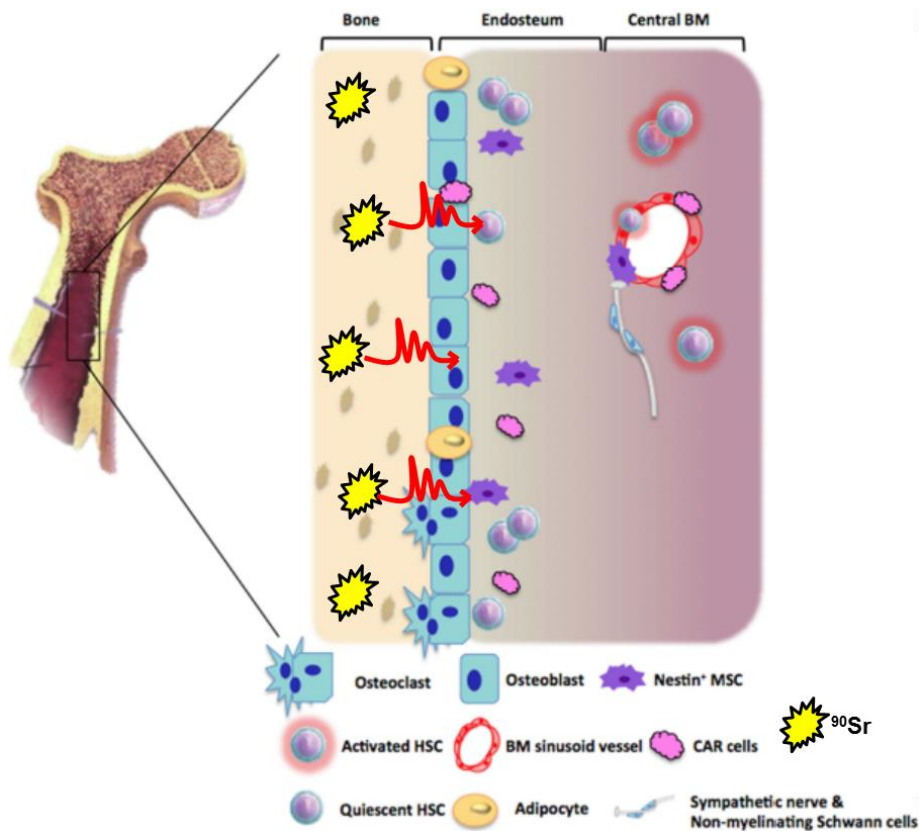


Figure 17: Désintégration du ^{90}Sr dans l'os

Le ^{90}Sr s'accumule dans la partie corticale de l'os et lorsqu'il se désintègre, l'énergie émise (flèche rouge) agit sur les cellules à proximité de la bordure osseuse : les cellules bordantes (bleu), les cellules souches mésenchymateuses (violet) et les cellules souches hématopoïétiques (bleu et violet). *Adapté d'après Coste et al. 2015*

3.1. Les cellules souches : définition

Une cellule souche est définie par trois propriétés majeures qui sont sa capacité de prolifération (auto-renouvellement), de différenciation et par la multipotence (Romito & Cobellis 2016). Chez l'embryon, les cellules souches sont dites totipotentes, elles sont capables de se différencier dans tous les types cellulaires à l'origine des différents tissus au cours du développement. Chez l'adulte, les cellules souches sont multipotentes, leur capacité de différenciation est limitée à quelques lignées cellulaires en fonction de leur nature et du tissu dans lequel elles sont situées. Elles sont retrouvées dans différents organes, logées à des endroits bien précis qui sont les niches. Les cellules souches adultes contribuent surtout à la régénération et au maintien de l'intégrité des tissus.

3.2. Les cellules souches mésenchymateuses

3.2.1. Généralités

Les cellules souches mésenchymateuses ou stromales (CSM) ont été découvertes grâce aux travaux de Friedenstein sur la moelle osseuse dans les années 1970 (Friedenstein *et al.* 1974). Ces cellules ont initialement été caractérisées par leur adhérence au plastic et leur forme fibroblastique lors de la mise en culture, ainsi que par leur capacité à former des colonies de type Colony Forming Unit Fibroblast (CFU-F) (Castro-Malaspina *et al.* 1980). Ce sont des cellules multipotentes capable de se différencier *in vitro* majoritairement en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes (Pittenger *et al.* 1999) mais également dans la plupart des tissus mésodermiques comme le muscle lisse ou l'endothélium (Oswald *et al.* 2004; Gong *et al.* 2009; Tian *et al.* 2010) et quelques études rapportent aussi leur potentielle différenciation en tissus neuronaux (Ma *et al.* 2011; Feng *et al.* 2014) (**Figure 18**). Les CSM sont présentes dans la moelle osseuse, dans le tissu adipeux, le liquide amniotique, le sang de cordon, les tissus fœtaux, le muscle squelettique, la pulpe dentaire ou encore le thymus (Mouiseddine *et al.* 2008; Roux *et al.* 2011). Cependant, les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM-MO) sont les mieux caractérisées bien qu'elles ne représentent que 0,001 à 0,01 % de la population cellulaire médullaire totale. Au niveau phénotypique, ces cellules ne présentent pas de marqueurs de la lignée hématopoïétique (CD34 et CD45) mais possèdent des marqueurs de surface spécifiques, des molécules d'adhésion, des intégrines, des cytokines et des récepteurs aux cytokines ainsi que des facteurs de croissance et des chemokines. Les principaux sont résumés dans le **tableau 1**.

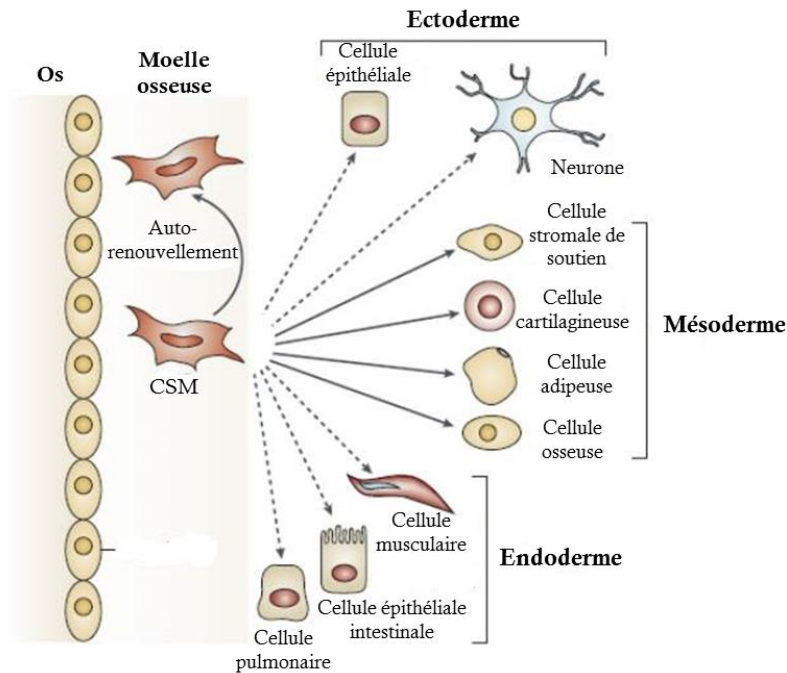


Figure 18: Multipotence des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM-MO)

Les CSM-MO sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier vers les lignées mésodermiques (flèches pleines) ou vers les lignées endodermiques et ectodermiques (flèches en pointillées).

Adapté d'après Uccelli et al. 2008

	Nom de la molécule
Marqueurs de surface	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, Stro-1, Sca-1
Intégrines et molécules d'adhésion	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, hyaluronate, receptor integrins $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, αA , αV , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$
Cytokines	IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, SDF-1, SCF, G-CSF, M-CSF, Flt3-1
Récepteurs aux cytokines	IL-1R, IL3-R, IL-4R, IL-6R, IL-7R

Tableau 1: Liste des principaux facteurs produits par les CSM

3.2.2. Différenciation des CSM : la voie Wnt/ β -caténine

La différenciation des CSM est régulée par les facteurs environnants. Ces facteurs peuvent être des facteurs mécaniques (champ magnétique, signaux électriques) ou moléculaires, *via* des cytokines présentes dans le microenvironnement. La différenciation vers la voie chondrocytaire, ostéoblastique ou adipocytaire dépend d'une variété de voies de signalisations et de facteurs de transcription. Plus généralement, c'est la voie de signalisation Wnt/ β -caténine qui est celle majoritairement impliquée dans les processus de prolifération et de différenciation des CSM (Ling *et al.* 2009; Visweswaran *et al.* 2015). Une perturbation de la voie Wnt est associée à de nombreuses pathologies, dont l'ostéoporose (Canalis 2013; Maeda *et al.* 2013). Il existe de nombreux ligands de Wnt (co-recépteurs, inhibiteurs de la voie,..) capables d'activer la voie canonique impliquant la β -caténine ou celle indépendante de la β -caténine (**Figure 19**). La nature de la liaison détermine les effets obtenus après activation de la voie canonique ou non (Kim *et al.* 2013; Ahmadzadeh *et al.* 2016). Concernant la voie canonique, en absence de ligands, des complexes destructifs formés par la Glycogen Synthase K3 (GSK3 β), l'Axin ou encore l'Adenomatous Polyposis Coli (APC) induisent la phosphorylation de la β -caténine dans le cytoplasme. Cette phosphorylation permet l'adressage de la β -caténine au protéasome 26S et donc sa dégradation. Au contraire, la liaison des ligands de Wnt avec les récepteurs Frizzled (Frz) et le Lipoprotein receptor-related protein 5/6 (Lrp5/6) conduisent à la stabilisation de la β -caténine. En effet, la formation du complexe Wnt/Frz/Lrp5/6 empêche la phosphorylation de la β -caténine par la protéine Dishevelled (Dsh). La β -caténine ainsi stabilisée dans le cytoplasme, entre dans le noyau où elle se lie aux composants de la machinerie transcriptionnelle. Le complexe β -caténine/enhancer factor T-cell factor (TCF)/lymphocyte enhancer factor (LEF) stimule l'expression de gènes cible par liaison sur des sites génomiques spécifiques (Kim *et al.* 2013; Ahmadzadeh *et al.* 2016).

Il a été montré que la différenciation des CSM en ostéoblastes et en adipocytes implique la signalisation par la voie impliquant la β -caténine (James 2013). Ces deux voies de différenciation sont étroitement liées et impliquent de nombreux facteurs de transcription dont les plus importants sont Runx2 et Osx pour l'ostéogenèse et le Proliferator Activated Receptor- γ (PPAR γ) ainsi que le CCAAT/enhancer-binding family of proteins (C/EBP) pour l'adipogenèse. Plusieurs études démontrent une corrélation négative entre l'adipogenèse et l'ostéogenèse (Muruganandan *et al.* 2009; Takada *et al.* 2009). En effet, lors de la différenciation de CSM *in vitro*, l'augmentation de l'expression de Runx2 ou Osx s'accompagne de l'inhibition de l'expression de PPAR γ et C/EBP et inversement (Kang *et al.* 2007; Liu *et al.* 2010; Valenti *et al.* 2011).

La différenciation des CSM en chondrocytes a lieu en réponse à la liaison du ligand Wnt5a qui active la voie de signalisation non-canonique (Bradley & Drissi 2010). Ce processus est sous la dépendance de l'activation du facteur de transcription SRY box 9 (Sox9), lui-même activé par la Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) (Pan *et al.* 2008; Bradley & Drissi 2010).

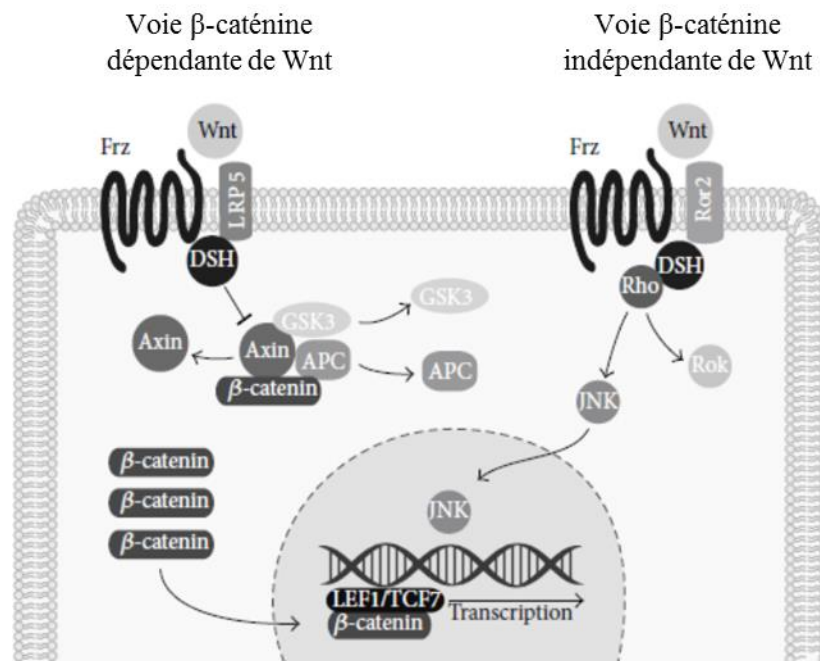


Figure 19: La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie canonique de signalisation de Wnt passe par la β-caténine (partie de gauche), celle non canonique est indépendante de la β-caténine (partie de droite). En fonction de la nature du ligand Wnt, la voie de signalisation impliquera des effecteurs spécifiques. *Adapté d'après James 2013*

3.2.3. Fonctions et applications cliniques

3.2.3.1. CSM et thérapeutique

Physiologiquement, le rôle principal des CSM est le maintien de l'intégrité des tissus dans lesquels elles se trouvent. Plus spécifiquement, dans l'os, les CSM ont un rôle dans le maintien de l'équilibre osseux et sont en lien étroit avec les CSH pour former la niche hématopoïétique (voir chapitre 3.3.4).

Dans la moelle osseuse, les CSM permettent de maintenir l'homéostasie du tissu osseux par leur différenciation directe en ostéoblastes mais également par la sécrétion de facteurs permettant la production de matrice extracellulaire et sa minéralisation. Ces facteurs sont des inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP, régulent l'activité des métalloprotéases afin d'éviter une résorption excessive de la matrice), l'ALP ou encore l'OPN ou le collagène de type I. Elles assurent également un rôle essentiel dans l'hématopoïèse par l'établissement d'un tissu de soutien et par la création d'un microenvironnement favorable à la régulation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des CSH (Dazzi *et al.* 2006). Ce rôle sera décrit dans un chapitre dédié à la niche hématopoïétique.

Depuis quelques années, de nombreuses études sont menées sur les CSM en tant qu'outil thérapeutique du fait de leurs nombreuses propriétés et de leur facile obtention à partir de différents tissus (Cipriani *et al.* 2015; Squillaro *et al.* 2015; Ullah *et al.* 2015). Il a été récemment démontré que les CSM possèdent un pouvoir immunomodulateur. En effet, celles-ci sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et B (Di Nicola *et al.* 2002; Kode *et al.* 2009). Les CSM semblent favoriser la mise en place d'un phénotype immunitaire anti-inflammatoire et plus tolérant. Cela se traduit par la différenciation des LT vers la voie des Th2, par l'inhibition de la production d'IFN- γ par les cellules NK et par la réduction de la production d'anticorps *via* l'inhibition de la différenciation des LB en plasmocytes (Kode *et al.* 2009). Ce pouvoir immunomodulateur a été utilisé dans les cas de traitement des maladies autoimmunes, des rejets d'organes ou encore dans le cas du syndrome du greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease, GvDH) (Uccelli *et al.* 2008; Kode *et al.* 2009; Cipriani *et al.* 2015). De même, leur capacité de multi-différenciation a donné lieu à de nombreuses études sur leur action thérapeutique dans le cadre de maladies cardiovasculaires, maladies ischémiques, fractures de l'os et maladies neurodégénératives pour permettre la régénération tissulaire (Wu *et al.* 2007; Mao *et al.* 2010; Lopatina *et al.* 2011; Lewis & Suzuki 2014), mais aussi dans le traitement de brûlures radiologiques (Lataillade *et al.* 2007).

3.2.3.2. Mode d'action

Afin de pouvoir effectuer leur action, les CSM doivent arriver jusqu'au site de lésion. Des études ont montré qu'après injection systémique de CSM, celles-ci se distribuaient dans tout l'organisme mais de façon préférentielle au niveau de la partie lésée, où est générée une réaction d'inflammation (Devine *et al.* 2003). Le mécanisme exact par lequel les CSM migrent vers la lésion n'est pas encore bien connu, cependant un grand nombre de chemokines et de molécules d'adhésion semblent aider le processus de migration. Le chemokine receptor type 4 (CXCR4) et son ligand stromal-derived factor-1 (SDF-1) sont les principaux acteurs de ce phénomène (Honczarenko *et al.* 2006; Ryu *et al.* 2010). En effet, des travaux ont démontré que l'injection de CSM surexprimant SDF-1, permettait une meilleure régénération de fractures de l'os (Jones *et al.* 2012; Herberg *et al.* 2015; Ho *et al.* 2015) ou encore de réparation de lésions au niveau du myocarde suite à un infarctus, en favorisant le recrutement des cellules sur le site des dommages (Ghadge *et al.* 2011).

Le mode d'action des CSM n'est pas encore bien élucidé, cependant plusieurs mécanismes ont été explorés. Les CSM peuvent agir de façon directe avec les cellules environnantes grâce aux molécules d'adhésion présentes à leur surface mais leur action se fait surtout de façon paracrine. Une fois arrivées sur le site de lésion, l'interaction avec le microenvironnement local leur permet de sécréter les facteurs spécifiques pour la réparation du tissu ou permet directement leur différenciation en cellule d'intérêt (Ventura *et al.* 2007; Kurpinski *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2010). Depuis quelques années maintenant, un nouveau mode d'action à distance a beaucoup été étudié et réside dans la production d'exosomes par les CSM (Baglio *et al.* 2012; Biancone *et al.* 2012; Yu *et al.* 2015). Les exosomes sont des vésicules de diamètre compris entre 30 et 100 nm, riches en cholestérol et phospholipides contenant de nombreux facteurs tels que des protéines, des cytokines, des lipides, des ARNm ou encore des miRNA (Chaput & Thery 2011; Ludwig & Giebel 2012). Ces exosomes sont relargués dans l'espace extracellulaire pour aller agir sur les cellules au niveau du site de lésion et permettent, entre autres, de réguler l'expression de gènes spécifiques au sein des cellules cibles grâce à l'action des miRNA notamment (Lai *et al.* 2015). Des études ont montré que la simple présence de milieu conditionné provenant de la culture de CSM avait des effets similaires à ceux obtenus avec les cellules (Lee *et al.* 2013; Shabbir *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015). L'étude des exosomes reste une voie prometteuse pour la thérapie cellulaire car elle permet de s'affranchir des risques d'effets néfastes liés à l'invasion des CSM au niveau des tissus sains, bien qu'actuellement aucun effet délétère n'ait été mis en évidence.

3.3. Les cellules souches hématopoïétiques

3.3.1. Généralités

Les CSH sont à l'origine des cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Elles sont retrouvées en grande majorité dans la moelle osseuse mais également dans le sang périphérique et la rate (Szilvassy 2003). Le système hématopoïétique est organisé de façon hiérarchique en fonction de la capacité de différenciation, de prolifération et d'auto-renouvellement des cellules qui le composent.

3.3.2. Caractéristiques fonctionnelles

Dans la moelle osseuse, moins de 0,1 % des CSH qui s'y trouvent sont pluripotentes, elles sont capables d'auto-renouvellement et sont à l'origine de la régénération des cellules sanguines et immunitaires tout au long de la vie d'un individu. Initialement, leur propriété d'auto-renouvellement avait été mise en évidence par une expérience d'injection de cellules issues de moelle osseuse chez des souris irradiées de façon létale (9,5 Gy au total). Dans la rate de ces souris il avait été observé des colonies (appelées CFU-S, Spleen Colony Forming Unit) provenant des CSH injectées (Till & Mc Culloch 1961). Le caractère clonal de ces CFU-S avait été démontré par la présence d'anomalies chromosomiques dans la descendance cellulaire (Becker *et al.* 1963).

Par la suite, les tests fonctionnels permettant de contrôler l'activité *in vivo* et *in vitro* des CSH ont été développés. Ils ont permis de démontrer la principale fonction de ces cellules qui réside dans leur capacité à générer de façon continue les cellules sanguines matures. *In vivo*, dans un modèle de souris irradiées à des doses létales, l'hématopoïèse a été rétablie par transplantation de progéniteurs hématopoïétiques (Harrison *et al.* 1993). *In vitro*, cette capacité a pu être observée par des expériences de Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC) dans lesquelles la formation des différentes lignées myéloïdes peuvent être obtenues à partir d'une seule CSH en culture (Bock 1997; Miller *et al.* 2008).

Une autre particularité des CSH est leur grande résistance aux stress et aux agents cytotoxiques *in vivo*. Ceci s'explique par le fait que seul un faible pourcentage de la population totale de CSH se renouvelle régulièrement. En effet, 75 % des CSH est dans un état quiescent, elles se trouvent au stade G0 du cycle cellulaire et ont un renouvellement très lent (Cheshier *et al.* 1999).

3.3.3. Caractéristiques phénotypiques

Les CSH et les progéniteurs ne peuvent être distingués sur des critères morphologiques. Le seul paramètre permettant de les distinguer est la présence de marqueurs de surface spécifiques de chaque stade de la différenciation cellulaire. Dans la moelle osseuse, les CSH fonctionnelles sont celles qui n'expriment pas de marqueurs spécifiques pour une seule lignée cellulaire, cette propriété étant mise en évidence grâce à l'absence de marquage avec le cocktail d'anticorps Lineage (Lin). Ce cocktail est composé d'un mélange d'anticorps monoclonaux spécifiques pour une lignée particulière. Cependant, les CSH expriment fortement les marqueurs Stem-cell antigen 1 (Sca1) et le récepteur c-Kit. Ces cellules sont dites LSK (Lin⁻Sca1⁺Kit⁺) (Seita & Weissman 2010).

Parmi les cellules LSK, il existe des cellules ayant une capacité de repeuplement des lignées sanguines à long terme, les LT-CSH, et d'autres ayant un potentiel de différenciation plus limité, ce sont les Short-Term CSH (ST-CSH). Ces cellules possèdent chacune des profils d'expression génétique bien spécifiques, conduisant à la variété de marqueurs à leur surface (Ramalho-Santos *et al.* 2002; Venezia *et al.* 2004). Ainsi, les LT-CSH expriment le CD150 alors que les ST-CSH expriment le CD34. Par ailleurs, des progéniteurs à un stade de différenciation plus avancé que les ST-CSH sont caractérisés par l'expression du marqueur Fms-related tyrosine kinase (Flt3). Au niveau fonctionnel, la corrélation entre la capacité de ces cellules à repeupler la moelle osseuse et leurs caractéristiques phénotypiques a été démontrée par des expériences de transplantation de cellule unique, dans un modèle murin. Dans cette expérience, une cellule obtenue par tri au cytomètre en fonction de la combinaison de ses marqueurs de surface et transplantée chez la souris, avait conduit à la formation d'une grande variété de lignées sanguines (Mendez-Ferrer *et al.* 2015).

3.3.4. La niche hématopoïétique

3.3.4.1. Les fonctions de la niche

La différenciation des CSH est fortement contrôlée par son environnement. Une niche est définie comme une structure dans laquelle les cellules souches sont logées et entretenues dans un environnement favorable au maintien de leur intégrité (Wilson & Trumpp 2006; Wang *et al.* 2013). Ceci permet de préserver un pool de cellules souches tout au long de la vie d'un individu, la première fonction de la niche étant d'assurer le maintien de l'état quiescent des cellules. Les différentes études menées à ce sujet ont permis d'aboutir à deux modèles : une niche de stockage et une niche d'auto-renouvellement. Aujourd'hui encore, il est difficile de savoir si ces deux modèles coexistent au sein d'un même tissu ou s'ils sont indépendants l'un de l'autre.

Dans le modèle de niche de stockage, les signaux qui émanent des cellules environnantes permettent le maintien des cellules dans un état de quiescence, c'est-à-dire au stade G₀ du cycle cellulaire en réprimant leur division et leur différenciation. Des expériences ont montré que ce pool de CSH peut être mobilisé dans la circulation sanguine pour aller régénérer l'hématopoïèse, dans la rate par exemple, puis reviennent dans la moelle osseuse où elles redeviennent quiescentes (Wilson & Trumpp 2006) (**Figure 20 A**).

Le deuxième modèle de niche dite d'auto-renouvellement, a pour fonction principale de garantir qu'après division cellulaire, l'une des cellules fille maintienne son caractère souche tandis que l'autre deviendra un progéniteur (Wilson & Trumpp 2006). Dans ce modèle plus complexe, les cellules quiescentes sont situées au centre de la niche et plus les cellules s'éloignent du centre, plus l'environnement sera modifié. A l'interface, entre la zone de la niche et celle de la « non-niche », les signaux émis par les cellules environnantes vont promouvoir la différenciation et/ou la division des cellules fille (**Figure 20 B**).

Une autre particularité de la niche est qu'elle se trouve dans un environnement hypoxique ce qui contribue au maintien des CSH métaboliquement inactives, contribuant ainsi à leur quiescence (Eliasson & Jönsson 2010).

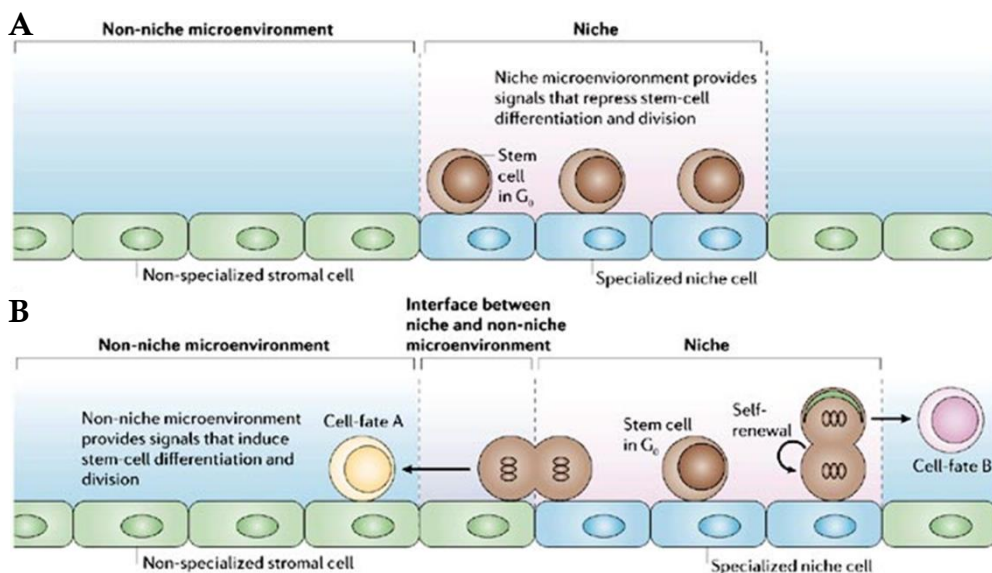


Figure 20: Les modèles de niche

A. Modèle de niche de stockage : les signaux qui émanent des cellules environnantes permettent le maintien de l'état quiescent des cellules.

B. Modèle de niche d'auto-renouvellement : plus on s'éloigne du centre de la niche, plus le microenvironnement change. Les cellules filles issues de la division de la cellule souche auront un devenir différent en fonction de la localisation au sein de la niche.

D'après Wilson & Trumpp 2006

3.3.4.2. Les composants cellulaires et moléculaires de la niche

Dans la moelle osseuse, les CSH sont situées à proximité de la surface de l'os (Lord *et al.* 1975). Récemment, il a été montré que les progéniteurs hématopoïétiques sont en étroite association avec l'endoste dans les cavités trabéculaires des os longs, alors que les cellules les plus différenciées sont situées dans la partie centrale de la cavité médullaire (Nilsson *et al.* 2001; Lo Celso *et al.* 2009). Il existe également une population de CSH associée aux sinusoides sanguins, ceux-ci servant de support à la différenciation des progéniteurs et contribuant à leur mobilisation dans la circulation sanguine (Kiel & Morrison 2006; Lo Celso *et al.* 2009).

La niche endostéale se compose de CSH, d'ostéoblastes et de CSM qui sont en lien étroit (Calvi *et al.* 2003; Mendez-Ferrer *et al.* 2010). Le dialogue entre ces cellules est médié à la fois par des signaux extracellulaires mais aussi par des molécules d'adhésion permettant le contact direct. Le rôle principal de la plupart de ces facteurs est le maintien du caractère souche des cellules en les gardant dans un état quiescent. De plus, ils permettent également de garantir l'ancrage des cellules souche dans la niche, c'est le phénomène de « homing ». Les ostéoblastes et les CSM produisent un grand nombre de facteurs impliqués dans la régulation des CSH tels que le G-CSF, SDF-1, SCF ou encore l'OPN (Taichman & Emerson 1994; Caplan & Dennis 2006). Ces facteurs se lient à leurs récepteurs présents sur les CSH (CXCR4 pour SDF-1 ou c-Kit pour SCF) et permettent le maintien de la propriété d'auto-renouvellement des cellules, leur quiescence ou encore la régulation de leur nombre dans la moelle osseuse. Le Ca^{2+} relargué au cours du remodelage osseux est également un régulateur de l'activité des CSH.

Concernant les molécules d'adhésion, les CSH, et plus précisément la sous-population LSK expriment fortement la N-cadhérine permettant leur ancrage avec les ostéoblastes (Wang *et al.* 2013). De même, la nestine est exprimée par les CSM (Mendez-Ferrer *et al.* 2010) et constitue un marqueur de la niche endostéale.

Le maintien de l'état quiescent des cellules dans la niche fait intervenir deux voies de signalisation majoritaires, la voie Wnt/ β -caténine et la voie Notch (Duncan *et al.* 2005; Weber & Calvi 2010; Wang *et al.* 2015b). Wnt est secrété par les CSM et a une action sur les CSH dans lesquelles il permet la stabilisation de la β -caténine, en étroite association avec la partie intracellulaire de la N-cadhérine. L'activation de la β -caténine conduit à l'induction de la transcription du facteur *p21*, impliqué dans le maintien de l'état quiescent. (Reya *et al.* 2003; Fleming *et al.* 2008). Quant à Notch, il est exprimé par les CSH et se lie à son récepteur Jagged1 présent sur les ostéoblastes, cette liaison permettant l'activation de facteurs ayant un rôle dans la quiescence des CSH (Weber & Calvi 2010; Wang *et al.* 2015b).

Une atteinte de la niche endostéale pourrait donc engendrer des effets multiples, à la fois sur le système immunitaire, le système hématopoïétique et même du tissu osseux.

4. Les mécanismes d'action et conséquences cellulaires des rayonnements ionisants

Le ^{90}Sr est un émetteur β^- qui peut avoir de nombreux effets au niveau cellulaire, les mécanismes d'action des rayonnements ionisants (RI) étant multiples. En effet, la cellule est une entité complexe et en fonction du compartiment touché (noyau, cytoplasme ou organelles) les conséquences engendrées n'auront pas la même gravité.

4.1. Le stress oxydant

4.1.1. Définition

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) présentes à l'état basal en faible concentration et le système antioxydant, chargé d'éliminer les ERO produites en excès. Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre entre la production de ERO et leur élimination (Sies & Cadenas 1985).

Les ERO peuvent être de nature multiple, cependant les plus réactives sont les espèces radicalaires qui possèdent sur leur couche périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, leur conférant une instabilité et donc une grande réactivité (Valko *et al.* 2007). Les radicaux libres majoritairement formés au cours des différentes réactions sont l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle HO^{\cdot} et le monoxyde d'azote NO^{\cdot} . Parmi les espèces non radicalaires le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est l'une des ERO les plus réactives. Les cibles de ces ERO peuvent être tous les composants cellulaires : les acides nucléiques (ADN et ARN) (Ayala-Peña 2013; Bradley-Whitman *et al.* 2014), les protéines (Yan 2014) et les lipides (Pinchuk & Lichtenberg 2014; Suyama *et al.* 2014).

Ces espèces peuvent être produites en réponse à des stress extérieurs tels que les RI (induction de la réaction de radiolyse de l'eau), les UV, certains médicaments et les polluants. Cependant, les réactions physiologiques endogènes sont également productrices de ERO, comme au cours de la respiration mitochondriale (environ 90 % des ERO produits) (Valko *et al.* 2007) ou lors du phénomène de phagocytose par les macrophages. Leur élimination se fait grâce à une variété de composés antioxydants.

4.1.2. Le système antioxydant

Par définition, un antioxydant est un composé qui à faible concentration est capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat (Halliwell & Gutteridge 1990). Plus généralement, les substances antioxydantes sont capables d'empêcher la formation de radicaux libres, de permettre leur élimination et enfin de réparer les éventuels dégâts causés par leur action. Ils peuvent être classés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les non-enzymatiques. Parmi les antioxydants non-enzymatiques il existe les composés de faible poids moléculaires, capables de piéger directement les radicaux libres, et les facteurs de transcription.

4.1.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Il existe plusieurs catégories d'enzymes antioxydantes, les plus importantes étant la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx).

La CAT est une enzyme localisée dans les peroxysomes et permet de catalyser la réaction de dismutation du H_2O_2 en eau et dioxygène ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). La CAT est capable de convertir chaque minute 6 millions de molécules d' H_2O_2 en eau et dioxygène (Valko *et al.* 2006).

Les SOD sont des métalloenzymes permettant de catalyser la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène ($2H^+ + 2O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$) (Holley *et al.* 2011). Ce sont des enzymes ubiquitaires qui diffèrent essentiellement par la nature de leur cofacteur (manganèse, cuivre ou zinc). La MnSOD est présente uniquement au dans les mitochondries alors que la CuSOD ou la ZnSOD sont présentes surtout au niveau cytoplasmique (Slot *et al.* 1986).

Enfin, la GPx est une sélénoprotéine comprenant 5 isoformes (GPx 1, 2, 3, 4 et 6) permettant d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Valko *et al.* 2006; Diamond 2015). Son action est couplée avec celle du glutathion pour permettre cette réaction. La GPx tout comme la CAT utilise le H_2O_2 comme substrat, mais celle-ci est active pour de plus faibles concentrations (Valko *et al.* 2006).

4.1.2.2. Les antioxydants non-enzymatiques : le glutathion

Le glutathion est un tripeptide ubiquitaire présent dans plusieurs compartiments cellulaires (cytoplasme, noyau, mitochondries) soit sous la forme réduite GSH ou sous sa forme oxydée GSSG (glutathion disulphide). Il possède un groupement thiol qui lui permet d'intervenir dans les réactions de détoxication des ERO et il est l'antioxydant soluble majoritaire de la cellule (Masella *et al.* 2005). Un rapport GSH/GSSG élevé est nécessaire pour assurer la fonction antioxydante et

la mesure de ce rapport est un indicateur du niveau de stress oxydant d'un organisme (Hwang *et al.* 1992; Hernandez *et al.* 2015).

Le glutathion est synthétisé à partir du glutamate en faisant intervenir successivement deux réactions ATP-dépendantes. Il exerce son activité d'antioxydant en agissant comme cofacteur de plusieurs enzymes de détoxication des ERO (comme la GPx par exemple pour la détoxication du H_2O_2). Il est également capable de se lier directement aux radicaux libres afin de les rendre plus solubles et il permet la régénération de la forme active d'autres antioxydants non-enzymatiques tels que la Vitamine C ou E (Masella *et al.* 2005).

Afin de préserver un rapport GSH/GSSG assez élevé dans la cellule, deux enzymes sont requises pour la réaction redox. Les deux enzymes principales impliquées dans le cycle redox du glutathion sont la Glutathion Réductase (GR) et la GPx. La GR permet de catalyser la réaction du GSSG en GSH en utilisant la NADPH. Elle a un rôle prépondérant dans le maintien d'un milieu cellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un taux faible de GSSG (Deponce 2013). La Glutathion-S-Transférase (GST) utilise également le glutathion comme cofacteur, c'est une enzyme cytosolique qui catalyse la réaction de conjugaison du GSH avec des xénobiotiques afin de les rendre plus hydrosolubles (Desmots *et al.* 2001) (**Figure 21**).

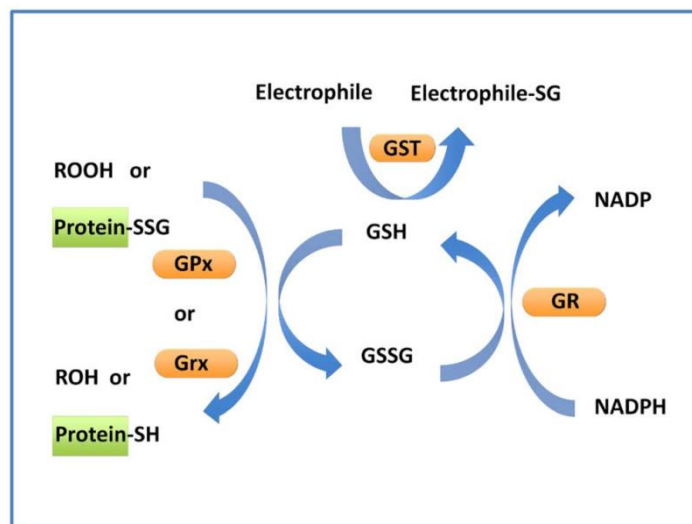


Figure 21: Le cycle du glutathion

L'équilibre entre la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH) du glutathion est maintenue grâce à l'action de la GPx et de la GR.
D'après Johnson 2012

4.1.2.3. Le facteur de transcription Nrf2

La plupart des voies de signalisation impliquées dans l'activité antioxydante convergent vers la régulation de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription sont responsables de l'induction de nombreux gènes impliqués dans la détoxification de molécules oxydées mais aussi dans la réparation et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ces voies sont activées par le niveau des ERO, telles que le H₂O₂ par exemple (Marinho *et al.* 2014). L'un des facteurs de transcription les plus importants est le Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2 (Nrf2).

Nrf2 est une protéine ubiquitaire retrouvée dans les différents organes de détoxification, principalement dans les reins et le foie. Nrf2 est sous forme cytosolique et sa demi-vie courte (7 à 15 min) peut être augmentée jusqu'à 100 min en présence d'inducteurs (Nguyen *et al.* 2003). En absence de stimulus, Nrf2 est associé à son répresseur Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) permettant son adressage au protéasome 26S et donc sa dégradation. L'accumulation de ERO dans la cellule conduit à l'inhibition de Keap1 et à la stabilisation de Nrf2 qui s'accumule dans le noyau (Suzuki & Yamamoto 2015). Une fois dans le noyau, Nrf2 se dimérise avec l'une des protéines de la famille des small Maf et l'hétérodimère se fixe au niveau de la séquence de réponse aux antioxydants (Antioxidant Response Element, ARE). Les séquences ARE sont des séquences spécifiques retrouvées au niveau des promoteurs des gènes cibles de Nrf2 (Suzuki & Yamamoto 2015). Nrf2 permet d'activer la transcription des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, les enzymes impliquées dans la synthèse et la conjugaison du glutathion, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques mais aussi pour les transporteurs membranaires d'efflux (Suzuki & Yamamoto 2015; Ma 2013) (**Figure 22**).

En dehors de la régulation du niveau de stress oxydant, Nrf2 est aussi impliqué dans d'autres mécanismes physiologiques tels que la prolifération et la mort cellulaire ou encore dans l'inflammation (Chen & Kunsch 2004; Chen *et al.* 2006) mais aussi dans certaines pathologies comme les cancers (Ohta *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010).

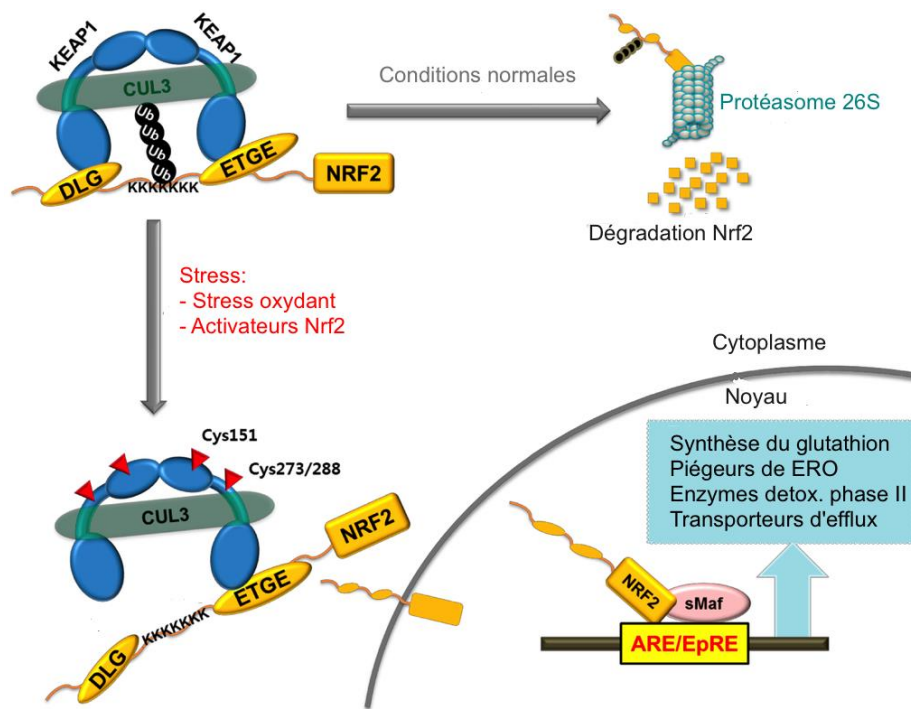


Figure 22: Le système Nfr2/Keap1

En condition normale, Nrf2 est lié à Keap1 qui permet l'ubiquitinylation de Nrf2 et son adressage au protéasome 26S. En conditions de stress oxydatif, Nrf2 est libéré de Keap1 et se lie aux séquences ARE sur l'ADN permettant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et la conjugaison du glutathion, l'élimination des ERO et la détoxification des xénobiotiques. *Adapté d'après Choi et al. 2014*

4.1.3. Les conséquences du stress oxydant

Dans l'organisme, le maintien de l'équilibre entre la formation d'ERO et les systèmes d'élimination est finement régulé. Un dysfonctionnement de la balance pro/anti oxydants peut avoir des conséquences sur la santé.

Des études ont démontré l'implication du stress oxydant dans le cas de pathologies liées au vieillissement. En effet, l'accumulation d'éléments cellulaires oxydés contribuerait à la dégénérescence cellulaire liée au vieillissement et ferait partie des causes de pathologies associées telles que la maladie d'Alzheimer, Parkinson ou encore les cancers (Valko *et al.* 2007). De même, la production chronique d'ERO conduit à certaines pathologies telles que le diabète de type 2, à l'athérosclérose et serait même impliquée dans l'obésité (Savini *et al.* 2013). De récentes études ont également montré l'implication du stress oxydant dans l'infertilité masculine pour laquelle il a été observé une augmentation de dommages à l'ADN en réponse au stress oxydant dans les spermatozoïdes (Hosen *et al.* 2015).

4.2. Les dommages à l'ADN

4.2.1. Généralités

Le génome est en perpétuel remaniement, il est donc important pour la cellule de mettre en œuvre tous les mécanismes possibles pour préserver son intégrité. En effet, la cellule subit des stress liés directement à son métabolisme notamment lors du processus de réplication de l'ADN où des dommages peuvent survenir, ces dommages étant comparables à ceux causés par des agents extérieurs (Burcham 1999; De Bont & van Larebeke 2004). Mais les cellules sont aussi exposées à des stress génotoxiques à la fois de nature endogène (espèces réactives de l'oxygène produites lors des processus physiologiques normaux, nucléases) et exogènes (UV, RI, agents de chimiothérapie) (**Figure 23**). Ces agents peuvent modifier la structure de l'ADN ce qui aura pour effet une mauvaise transcription en ARN, ou même une absence totale de transcription par perte de la liaison avec les molécules de reconnaissance de l'ADN. Ceci peut causer de nombreux effets dont la mort cellulaire ou encore des mutations génétiques (Bjelland & Seeberg 2003).

Les lésions de l'ADN peuvent être de nature multiple en allant de la simple modification chimique des bases (oxydation, alkylation, hydrolyse) à la cassure simple ou double-brin (CDB) (Lindahl 1993) (**Figure 23**). Les altérations chimiques sont les plus fréquentes alors que les CDB sont les plus délétères. Les mécanismes de détection et de réparation de ces dommages sont fondamentaux pour la survie de la cellule et leur étude présente un intérêt particulier pour la compréhension de l'oncogénèse et des pathologies dégénératives liées à l'âge par exemple (Malik & Herbert 2012; Madabhushi *et al.* 2014; Vermeij *et al.* 2014).

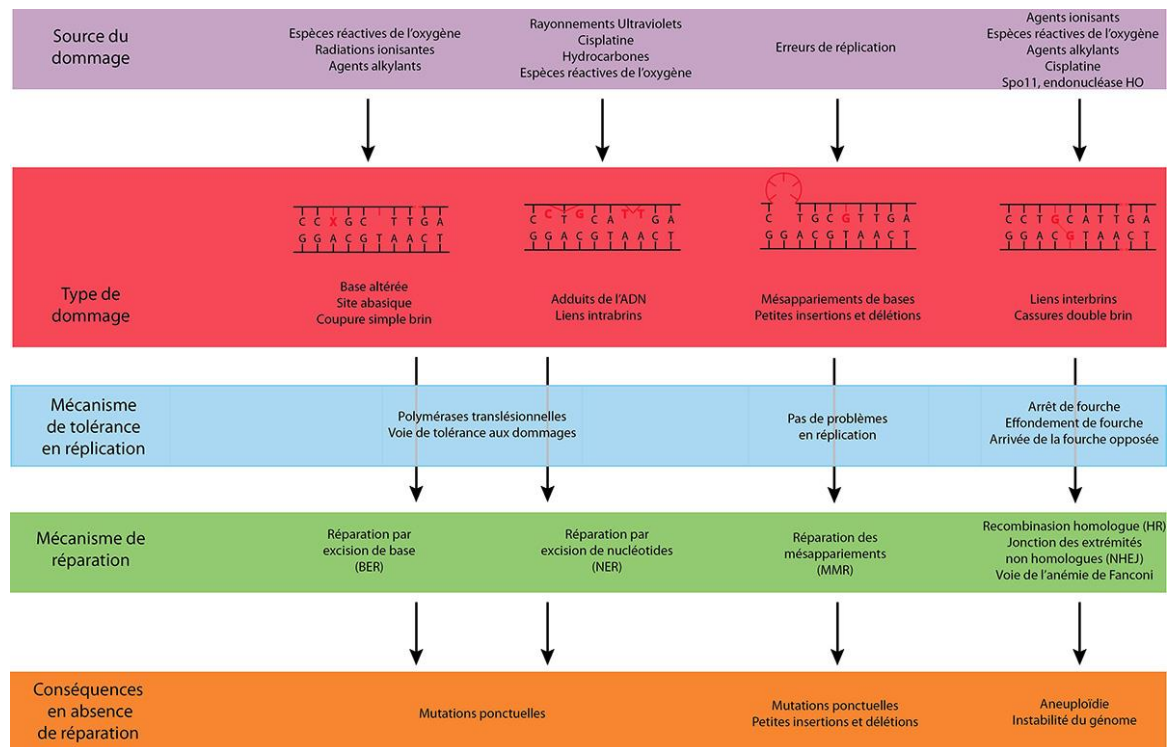


Figure 23: Résumé des sources et des atteintes de l'ADN

D'après www.smvjussieur.fr

4.2.2. Les cassures double-brin et signalisation

Lors de la réplication de l'ADN, la survenue de CDB est un phénomène physiologique (Rothkamm *et al.* 2003). Cependant, si elles ne sont pas bien gérées elles peuvent provoquer de lourds dommages cellulaires. Comme déjà mentionné, les CDB causées par les agents exogènes sont les plus létales, les RI étant connus pour être l'un des agents exogènes les plus efficaces pour l'induction des CDB.

Contrairement aux cassures simple-brin, les CDB se caractérisent par la cassure au niveau des 2 brins de l'ADN pouvant ainsi entraîner la perte d'un fragment entier de chromosome ou alors aboutir à des échanges de séquences géniques (translocations). Lorsque l'ADN est atteint, la cellule réquisitionne de nombreux acteurs moléculaires qui ont pour but de recruter à leur tour, les éléments de la machinerie de réparation au niveau du site de lésion. Dans le cas des CDB, cette étape met en jeu le variant d'histone H2AX. L'ADN est normalement organisé en nucléosomes, chaque nucléosome étant constitué d'histones : H2A, H2B, H3 et H4. H2AX est un variant de l'histone H2A représenté avec une fréquence d'environ 10 % dans le génome humain et de façon aléatoire (Rogakou *et al.* 1998).

Quelques minutes après la formation de CDB, l'histone H2AX au niveau du site de la cassure est phosphorylée sur son résidu Sérine en position 139. L'histone ainsi phosphorylé porte le nom de γ -H2AX (Rogakou *et al.* 1998; Kuo & Yang 2008). Au niveau du site de lésion, 100 à 1000 H2AX sont phosphorylés formant ainsi des foci. Les CDB de l'ADN sont donc quantifiables par les foci γ -H2AX, dont le nombre est directement proportionnel à la quantité de CDB par noyau. La phosphorylation du résidu Sérine se fait par la protéine Ataxia Telangiectasia mutated (ATM) et par la DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (Burma *et al.* 2001) ou par l'ATM-Rad3-related (ATR) dans le cas de CDB répliquatives (Ward & Chen 2001). Cette phosphorylation est nécessaire afin que la machinerie de réparation puisse reconnaître et réparer la cassure.

4.2.3. La réparation

Quand surviennent des dommages à l'ADN, les possibilités de réponse de la part de la cellule sont multiples. Si les dommages trop nombreux et saturant la machinerie de réparation alors la cellule va activer les voies de mort cellulaire, sinon elle va les réparer (Ciccia & Elledge 2010; Chapman *et al.* 2012).

Dans le cas des CDB, les foci γ -H2AX formés permettent le recrutement des éléments nécessaires à la réparation des cassures. En fonction de la morphologie de la cassure, mais aussi de la phase du cycle dans laquelle les cellules se trouvent au moment de la lésion (présence d'une ou 2 chromatides), les mécanismes mis en jeu ne seront pas les mêmes (Chapman *et al.* 2012). Les deux voies principales de réparation de l'ADN sont la voie de la recombinaison homologue (HR) et la voie de la jonction d'extrémités non homologues (non-homologous end joining, NHEJ). Ces deux mécanismes font partie de la réponse aux dommages de l'ADN (DNA damage response, DDR) pour lesquels la cellule nécessite un arrêt dans sa progression dans le cycle cellulaire. Celui-ci ne reprendra que lorsque la cellule aura correctement effectué la réparation. Ces mécanismes nécessitent une régulation très fine car en cas de mauvaise gestion de la cassure, des mutations pourront apparaître (Ciccia & Elledge 2010; Chapman *et al.* 2012).

4.2.3.1. La voie de la recombinaison homologue

La première étape de la HR est la reconnaissance de la cassure par le complexe MRN (Mre11-Rad50-NSB1) qui, par activation des médiateurs de type ATM ou ATR permet la phosphorylation de H2AX, amplifiant ainsi le signal au niveau de la cassure. γ -H2AX est également responsable de la stabilisation du complexe de réparation (Pardo *et al.* 2009; Rein & Stracker 2014). Le complexe MRN induit la phosphorylation d'autres éléments tels que la protéine Breast Cancer type 1 susceptibility (BRCA1) et l'Exonucléase 1 (Exo 1). La phosphorylation d'Exo1 conduit à son activation et permet d'initier la résection des extrémités générées par la cassure. L'ADN simple brin généré par la résection est ensuite recouvert par la protéine nommée Replication Protein A (RPA). RPA est progressivement remplacée par les protéines Rad51 et BRCA2. Rad51 est responsable de l'invasion de la chromatide sœur pour la recherche d'homologie. L'élongation du brin se fait grâce à la DNA polymérase (Pardo *et al.* 2009) (**Figure 24**).

Cette voie nécessite la présence de chromatides sœurs, elle ne peut donc se faire que lorsque la cellule est en phase de réplication (S) ou post-réplication (G2). Dans ce mécanisme, la synthèse d'ADN se fait à partir du brin identique sur la chromatide sœur, cette voie de réparation est donc la plus fidèle (Pardo *et al.* 2009; Thompson 2012).

4.2.3.2. La voie de la jonction d'extrémités non homologues

Les cassures de l'ADN peuvent aussi être directement réparées par la voie de recombinaison non-homologue qui ne requiert pas d'étape de résection des extrémités au niveau de la cassure. La voie NHEJ débute par l'hétérodimérisation des protéines Ku70 et Ku80 (Pastwa & Blasiak 2003; Kragelund *et al.* 2016). Ce complexe se lie aux extrémités de la cassure et permet le recrutement de sous-unités catalytiques de la DNA-PK et de la p53-binding protein 1 (53BP1). En parallèle, comme pour la voie HR, ATM phosphoryle H2AX. 53BP1 empêche la résection des extrémités des CDB et celles-ci sont stabilisées par la phosphorylation de la protéine Artemis. Artemis facilite la fin du processus en recrutant la DNA ligase 4 (LIG4) et les facteurs XRCC4 et XLF qui lient les extrémités entre elles et terminent la réparation (Pastwa & Blasiak 2003) (**Figure 24**). Ce type de voie est impliqué surtout lorsque les cellules sont en phase G1, c'est un processus peu fidèle, le plus à risque pour l'apparition de mutations et de translocations (Gong *et al.* 2005).

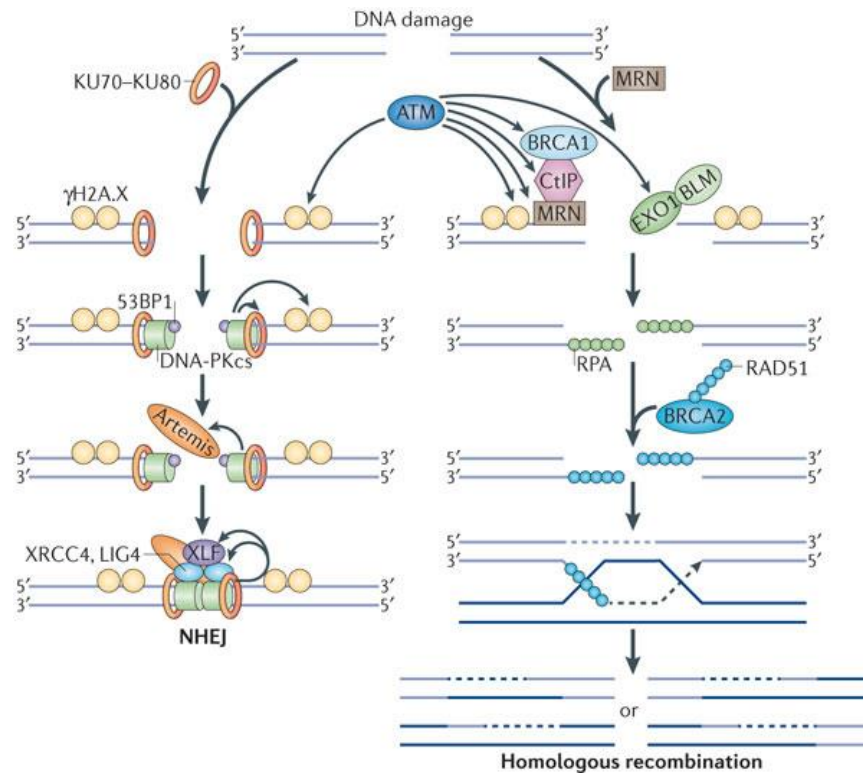


Figure 24: Les voies de réparation des cassures double brin

En fonction du stade du cycle cellulaire la réparation va se faire plutôt par voie NHEJ (à gauche) ou par la voie HR (droite). D'après Chowdhury *et al.* 2013

4.2.4. Conséquences des dommages à l'ADN

Les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN diffèrent en fonction du niveau de dommage créé, les CDB étant les dommages les plus délétères. Lorsque les dommages peuvent être pris en charge par le système de réparation de l'ADN, la cellule pourra reprendre une prolifération normale. Cependant, en fonction de la voie de réparation activée, il se peut que des infidélités dans le processus puissent apparaître. En effet, les travaux de Mohrin *et al.* (2010) ont mis en évidence la réparation de CDB dans des CSH en culture après irradiation. Or, des aberrations chromosomiques avaient été observées dans ces CSH quiescentes malgré la réparation médiée en grande majorité par la voie NHEJ (la voie HR nécessitant la phase de réplication). Plus généralement, l'induction de dommages à l'ADN conduit à des instabilités chromosomiques impliquées dans l'apparition de nombreux cancers (Eyfjord & Bodvarsdottir 2005). Par ailleurs, lorsque les dommages créés sont trop sévères, la cellule met en place des mécanismes de protection tels que la mort par apoptose ou encore la sénescence prématurée (Chen *et al.* 2007).

4.3. La mort cellulaire

4.3.1. Généralités

La mort cellulaire est un processus physiologique qui joue un rôle important au cours du développement, comme par exemple lors de la formation des doigts des mains et des pieds, le tissu devant être détruit pour la formation des espaces interdigitaux (Chimal-Monroy *et al.* 2011; Hernandez-Martinez & Covarrubias 2011). De même, la mort cellulaire est impliquée au cours de la formation des structures du cerveau (Oppenheim 1991; Roth & D'Sa 2001). Chez l'adulte, la mort cellulaire est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du renouvellement cellulaire. Il a été estimé qu'environ 10 Milliards de nouvelles cellules sont produites chaque jour pour compenser celles qui ont été détruites (Renehan *et al.* 2001).

La mort cellulaire est également un mécanisme mis en jeu en réponse à des stress exogènes tels l'exposition aux RI, aux agents de chimiothérapie, capables d'activer directement les voies de mort cellulaire ou alors indirectement par l'induction de stress oxydant ou de dommages à l'ADN. D'un point de vue thérapeutique, l'activation de la mort cellulaire est ciblée dans les cas de traitements de chimiothérapie pour causer la mort des cellules tumorales (Los *et al.* 2003). La mort cellulaire est donc un mécanisme de défense en réponse aux stress mis en place par la cellule.

Les voies majoritaires de mort cellulaire sont l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et la catastrophe mitotique (Galluzzi *et al.* 2012; Stevens *et al.* 2013) (**Figure 25**), cette dernière étant spécifique des cellules dans lesquelles la mitose s'est déroulée de façon défectueuse aboutissant à un nombre important d'aberrations chromosomiques. La catastrophe mitotique permet donc d'éliminer ces cellules. La plupart des signaux de mort vont activer l'une ou l'autre de ces voies. Cependant certains agents sont capables d'activer plusieurs voies simultanément ou alors peuvent conduire à l'activation d'effecteurs communs (Jain *et al.* 2013).

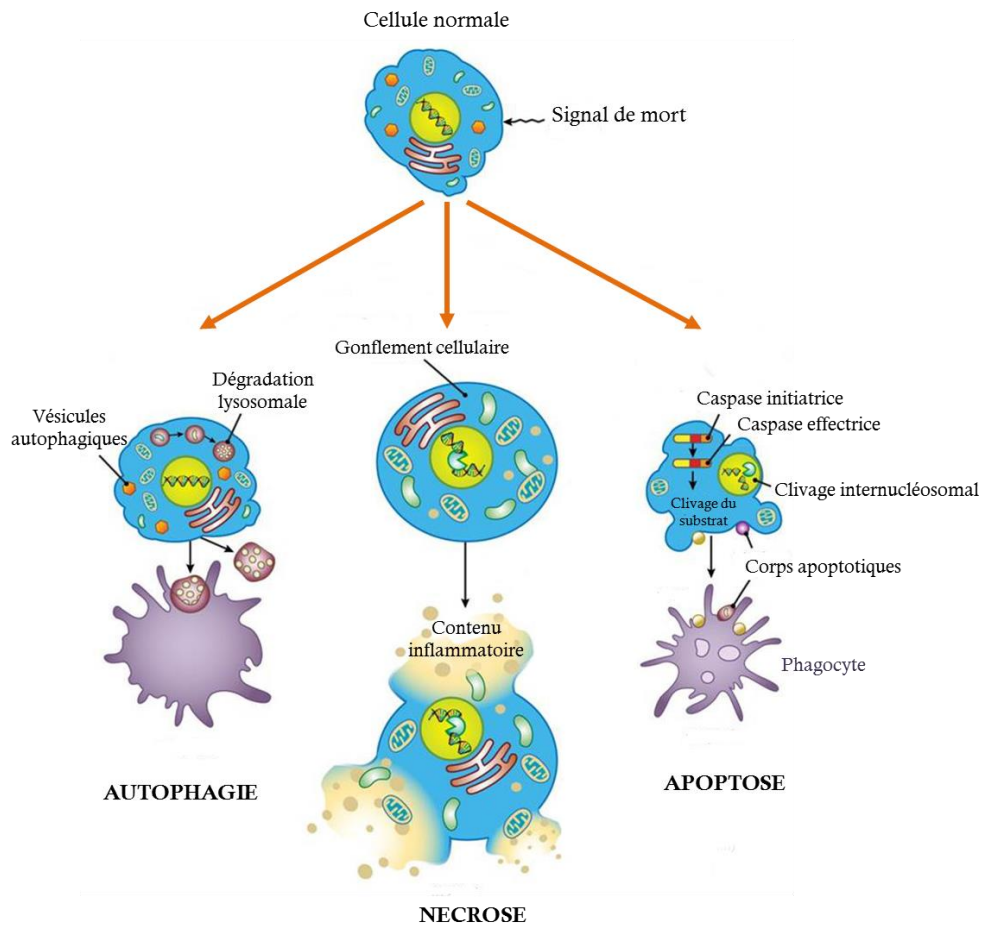


Figure 25: Les différents types de mort cellulaire

En réponse à un stress, la cellule met en place des mécanismes de mort cellulaire dont les principaux sont l'autophagie, la nécrose et l'apoptose. Ces voies se distinguent en partie par la morphologie de la cellule au terme du processus. *Adapté d'après Bortner & Cidlowski 2014*

4.3.2. Les types de mort cellulaire

4.3.2.1. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire médiée par l'activation de récepteurs de mort à la surface des cellules (voie extrinsèque) ou par le relargage du cytochrome c par la mitochondrie (voie intrinsèque) à la suite de stress dont la nature peut être très variée. Ces deux voies apoptotiques aboutissent au même effecteur commun, l'activation des caspases 3, 7 et 8 (Elmore 2007) (**Figure 26**).

La voie intrinsèque est médiée par les membres pro-apoptotiques de la famille B cell lymphoma 2 (Bcl-2) : Bcl2-associated X protein (Bax) et Bcl2-antagonist killer (Bak) qui, lorsqu'elles sont activées provoquent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Elmore 2007).

Le phénomène s'amplifie *via* un second mécanisme conduisant à davantage perméabiliser la membrane qui se rompt par choc osmotique. Les protéines sont alors relarguées dans le cytoplasme, la première étant le cytochrome c, un composant essentiel de la chaîne respiratoire. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c forme un complexe avec l'apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf-1) et la caspase-9, c'est l'apoptosome. Par la suite, la cascade de signaux apoptotiques sera activée pour conduire à la mort de la cellule (Elmore 2007).

La voie extrinsèque peut être initiée par la liaison de ligands sur des récepteurs de mort situés à la surface des cellules. Ces récepteurs de mort sont : Fas, TNF receptor (TNFR) et le TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor (TRAILR) (Savitskaya & Onishchenko 2015). Ces récepteurs possèdent une partie intracytoplasmique contenant le domaine de mort (Death domain, DD). Une fois la liaison entre le ligand et son récepteur établie, la protéine adaptatrice Fas-Associated-Death-Domain (FADD) est recrutée sur le récepteur actif. FADD à son tour recrute la pro-caspase 8, ce complexe étant appelé le Death-Induced Signal Complex (DISC). Le DISC est activé lorsque la caspase 8 est clivée et active à son tour la caspase 3, par clivage. La caspase 3-clivée est l'effecteur principal de la voie de l'apoptose qui se caractérise par la fragmentation de l'ADN, la dégradation du cytosquelette et des protéines nucléaires, par la formation de corps apoptotiques et par l'expression de ligands spécifiques aux cellules phagocytaires (Elmore 2007; Savitskaya & Onishchenko 2015).

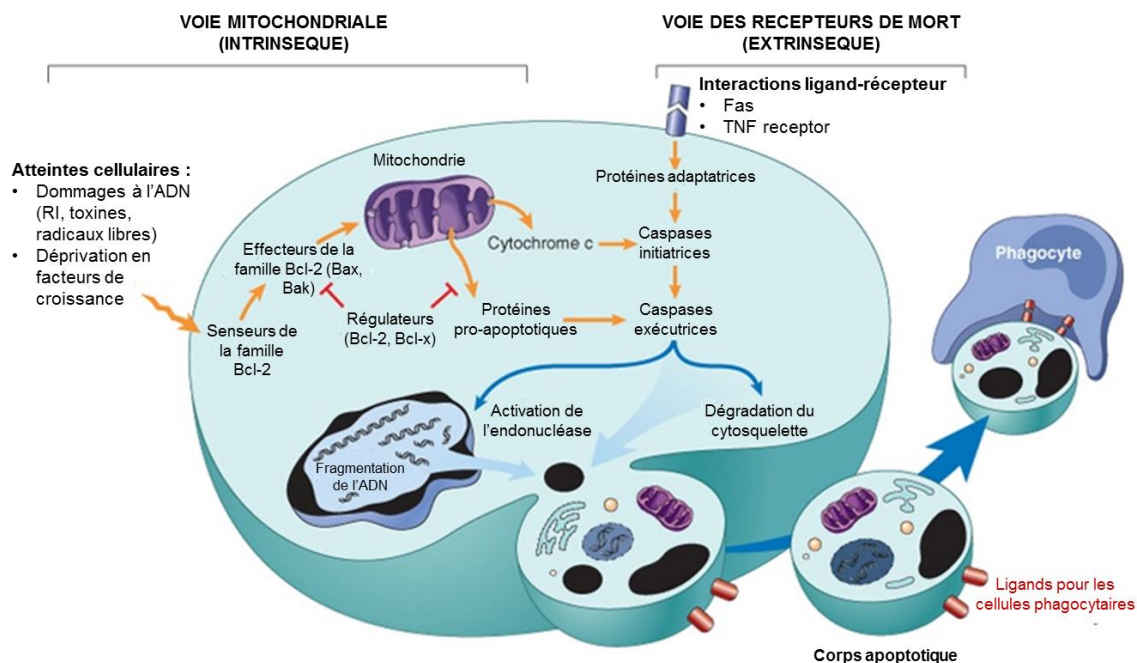


Figure 26: les deux voies de l'apoptose

Le phénomène d'apoptose est médié par deux voies, la voie intrinsèque (à gauche) et la voie extrinsèque (à droite). Ces deux voies sont capables d'activer les mêmes effecteurs communs qui aboutissent à la formation de corps apoptotiques pris en charge par les phagocytes. *Adapté d'après Kumar et al. 2007*

4.3.2.2. La nécrose

Longtemps, la nécrose a été considérée comme étant une mort non programmée du fait de l'absence de ressemblances morphologiques avec l'apoptose ou l'autophagie (Galluzzi *et al.* 2012). Aujourd'hui, les études ont montré que la nécrose est un phénomène régulé et que ce type de mort présente un rôle majeur au niveau physiologique, en contribuant notamment à la mort des chondrocytes lors de la croissance osseuse, ou plus généralement pour le maintien de l'homéostasie des tissus (Roach & Clarke 2000). Le mécanisme de nécrose peut également être induit par une large variété de stress, tels que les dommages à l'ADN, les ERO ou l'inflammation (Feoktistova & Leverkus 2015). Il existe plusieurs types de nécrose (**Figure 27**). Le premier, la nécroptose, est un mécanisme initié par les mêmes récepteurs de mort à la surface des cellules que ceux impliqués dans l'apoptose (Fas, TRAILR et TNFR), mais la cascade de signalisation activée est indépendante des caspases (Galluzzi *et al.* 2014). En effet, l'activation des récepteurs de mort active une voie médiée par les Receptor Interacting Protein Kinases (RIPK) et leur effecteur, la protéine Mixed-Lineage Kinase domain-Like (MLKL) (Galluzzi *et al.* 2014). Un autre mécanisme de nécrose implique la perméabilisation mitochondriale (Mitochondrial permeability transition, MPT). Ce phénomène est activé lorsque la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} ou de ERO augmente et serait initié par le pool mitochondrial de p53 capable d'activer la cyclophiline D (CypD), une isomérase ayant un rôle régulateur sur l'ouverture du Permeability Pore Transition (PTP) situé sur la membrane interne de la mitochondrie (Vaseva *et al.* 2012). Une fois le PTP ouvert, un choc osmotique est provoqué dans la mitochondrie conduisant au relargage des facteurs impliqués dans la mort par nécrose. Le mécanisme exact n'est cependant pas élucidé. Enfin, le dernier type de nécrose, le parthanatos, est activé lorsque la cellule subit des dommages continus à l'ADN et est médiée par la Poly(ADN-Ribose) Polymérase (PARP) (Feoktistova & Leverkus 2014). Plus généralement, quand la cellule s'engage dans la voie de la nécrose, l'intégrité cellulaire est rompue et le matériel intracellulaire est directement relargué dans le milieu extracellulaire, induisant une réponse inflammatoire de la part des cellules du système immunitaire (Feoktistova & Leverkus 2014).

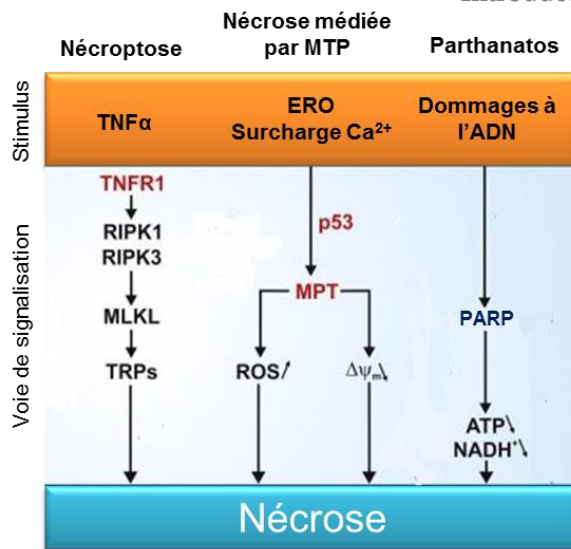


Figure 27: Les différents types de nécrose

Il existe trois types de mort par nécrose : la nécroptose, la nécrose médiée par la mitochondrial transition permeability (MTP) et la parthanatos. Chacune implique une voie de signalisation spécifique qui *in fine* aboutit à la mort de la cellule par relargage du contenu cellulaire directement dans le milieu extracellulaire. Adapté d'après Galluzzi *et al.* 2014

4.3.2.3. L'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique de dégradation lysosomale du contenu cytoplasmique, c'est un mécanisme conservé tout au long de l'évolution chez les eucaryotes (Lamb *et al.* 2013; Yonekawa & Thorburn 2013). *In vivo*, des études ont démontré l'importance de l'autophagie physiologiquement dans le programme de développement de *D. melanogaster* (Galluzzi *et al.* 2012). *In vitro*, il a été montré que l'autophagie peut être induite dans les cellules cancéreuses en réponse aux traitements par agents de chimiothérapie (Galluzzi *et al.* 2012). L'autophagie est une réponse cellulaire à une variété de stress internes et externes tels que l'hypoxie ou encore au stress oxydant. Elle se caractérise par la production d'autophagosomes, à partir de la membrane du reticulum endoplasmique, qui en fusionnant avec les lysosomes dégradent leur contenu qui sera alors réutilisé comme source d'énergie par la cellule (Russell *et al.* 2014). Le mécanisme de formation des autophagosomes est finement régulé par un réseau complexe de voies de signalisation et par l'implication des gènes et des protéines Autophagy Related (ATG) (Pasquier 2016). Cependant, l'acteur principal de l'autophagie est le facteur mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1), senseur de la cellule. Celui-ci est impliqué dans la voie de signalisation Phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/Akt et AMP-activated Protein Kinase (AMPK) (**Figure 28**). En conditions cellulaires normales, les récepteurs aux facteurs de croissance, entre autres, activent le complexe mTORC1 *via* la voie PI3K/Akt. mTORC1 forme alors un complexe avec la kinase UNC51 like Serine/Thréonine kinase (ULK1) et inhibe le processus d'autophagie. En conditions de stress cellulaire (déprivation en facteurs de croissance, niveau d'ATP bas, diminution du niveau d'acides aminés) mTORC1 est inhibé par l'action de l'AMPK et se dissocie de ULK1. A ce stade, ULK1 peut effectuer son activité kinase en phosphorylant un complexe formé par les protéines Vps34 et Beclin1, conduisant à l'initiation de la nucléation des autophagosomes dont la formation complète est médiée par l'action combinée des protéines ATG et microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) (Lamb *et al.* 2013;

Russell et al. 2014). L'autophagie est un phénomène qui permet à la cellule de surmonter un stress et constitue une échappatoire à la mort par apoptose, en recyclant les éléments cellulaires nécessaires à son métabolisme. Cependant, des études ont montré que l'autophagie permet également d'activer la mort par apoptose, en absence des effecteurs Bax ou Bak, *via* la protéine ATG5 (Yonekawa & Thorburn 2013). Par ailleurs, des travaux ont démontré un lien entre la senescence et l'autophagie, par l'implication de la voie PI3K/Akt-mTOR (Young *et al.* 2009; Alessio *et al.* 2015). Enfin, l'autophagie est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies infectieuses ou encore les cancers (Pasquier 2016).

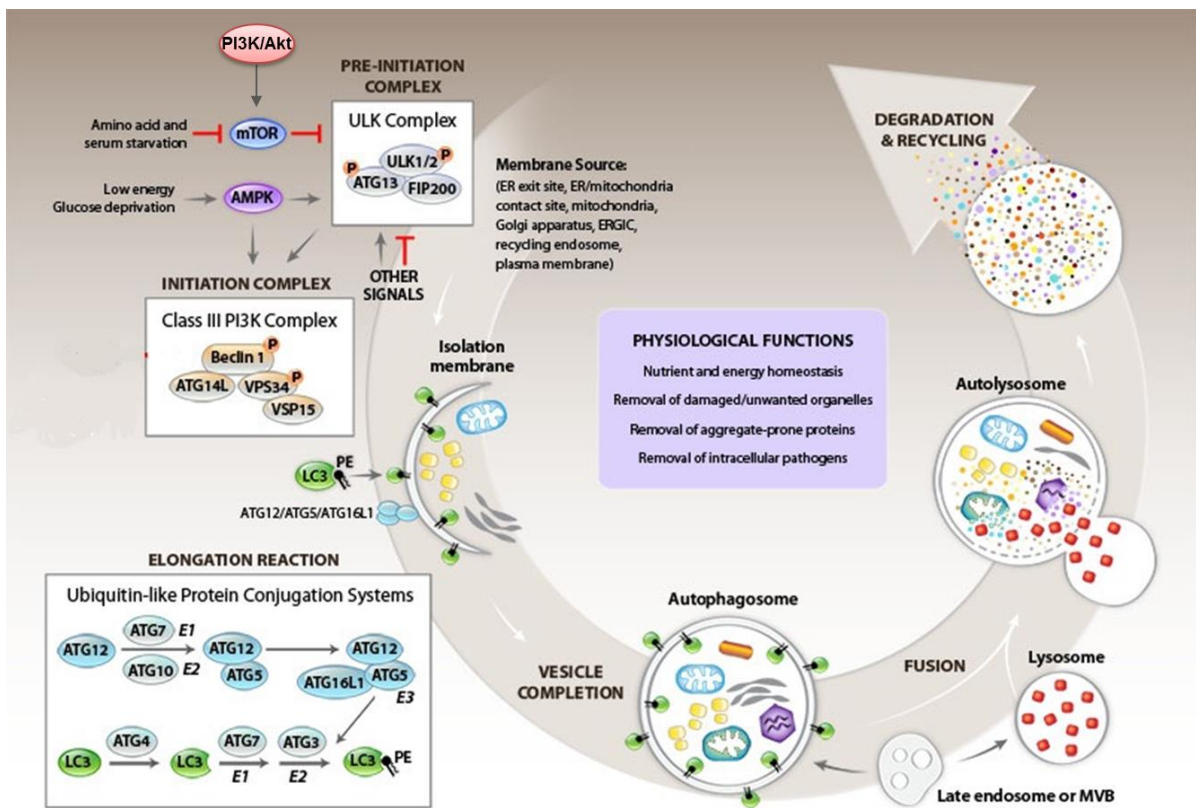


Figure 28 : Le mécanisme d'autophagie

Le processus d'autophagie est médié par les voies de signalisation PI3K/Akt et AMPK qui régulent le facteur mTOR, senseur de la cellule. L'autophagie se traduit par la formation de vésicules, les autophagosomes à partir de la membrane du réticulum endoplasmique ou même de l'appareil de Golgi. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former des autolyosomes au sein desquels le recyclage des éléments intracellulaire pourra se faire.

Adapté d'après www.utsouthwestern.edu

4.4. La sénescence

4.4.1. Généralités et définition

La sénescence cellulaire a été initialement décrite comme un arrêt permanent des cellules en culture dans le cycle cellulaire, résultant de la perte de la capacité à se répliquer de ces cellules, c'est la sénescence répliquative (Hayflick 1965). Depuis quelques années, il a été démontré que des stress cellulaires pouvaient aboutir à un phénotype similaire. Ces stress peuvent être les dommages à l'ADN, le stress oxydant ou les agents de chimiothérapie (Kuilman *et al.* 2010) (**Figure 29**).

Une cellule sénescence se caractérise par un arrêt permanent et irréversible dans le cycle cellulaire, une morphologie caractéristique avec un cytoplasme et un noyaux élargis et par l'expression de la SA- β galactosidase reflétant l'augmentation de la masse lysosomale. Enfin, une cellule sénescence se caractérise par l'expression d'un phénotype sécrétoire spécifique (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) (Rodier & Campisi 2011).

Dans l'organisme, la fonction de la sénescence peut être assimilée à celle de l'apoptose. Ce mécanisme est mis en place par la cellule en tant que mécanisme suppresseur de tumeur en induisant un arrêt définitif dans le cycle cellulaire des cellules tumorales (Braig *et al.* 2005; Collado *et al.* 2005). De plus, ces deux mécanismes sont impliqués à la fois dans des processus pathologiques dans le cas de maladies liées au vieillissement (Baker *et al.* 2011), et également dans des processus physiologiques comme au cours du développement embryonnaire (Storer *et al.* 2013).

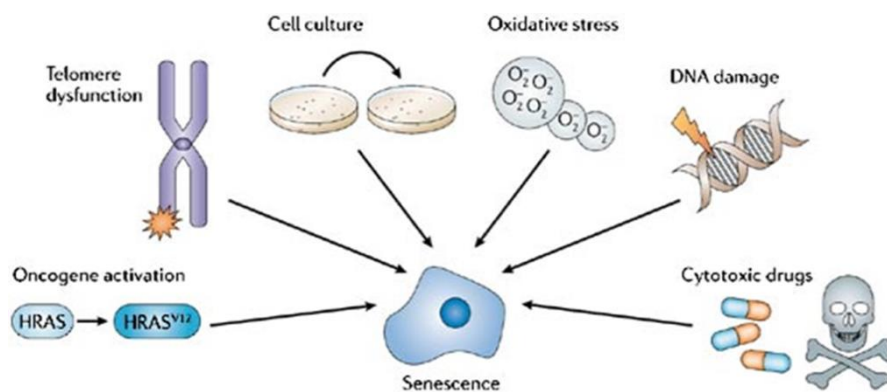


Figure 29: Les causes de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire peut être induite en réponse à une dysfonction des télomères, aux conditions même de culture cellulaire ou encore en réponse à des dommages de types stress oxydant, dommages à l'ADN ou encore oncogéniques. *D'après Collado & Serrano, 2006*

4.4.2. Les différents types de sénescence cellulaire

4.4.2.1. La sénescence répllicative

En 1961, les travaux de Hayflick et Moorhead ont démontré pour la première fois que des cellules primaires humaines en culture possédaient un pouvoir de prolifération limité (Hayflick & Moorhead 1961). En effet, après un certain nombre de divisions et de passages il avait été observé un changement de la morphologie des cellules, ainsi qu'un arrêt définitif de la prolifération. Ceci a été défini comme étant la sénescence répllicative. Les travaux en lien avec cette découverte ont mis en évidence que la perte progressive de la capacité de prolifération s'accompagne du raccourcissement des extrémités de la molécule d'ADN, les télomères (Harley *et al.* 1990; Campisi 1997).

Les télomères sont localisés aux extrémités de l'ADN linéaire, ce sont des séquences allant de 10 à 15 kpb chez l'homme et se composent de la répétition successive de la séquence TTAGGG. Au cours de la réplication cellulaire, la télomérase est l'enzyme qui assure le maintien de la longueur des chromosomes par ajout de séquences TTAGGG au niveau des télomères (Blackburn *et al.* 2015). Physiologiquement, le rôle des télomères est de protéger la molécule d'ADN contre la dégradation ou les recombinaisons mais permettent également le recrutement de la DNA polymérase, nécessaire au processus de réplication. Les télomères sont donc considérés comme l'horloge moléculaire, déterminant le nombre de réplifications possibles avant de rentrer dans un état de sénescence répllicative (Bodnar *et al.* 1998; Blackburn *et al.* 2015). En effet, lorsque les télomères atteignent une taille limite (accompagné par la perte de l'activité télomérase) la DNA polymérase ne peut plus être recrutée et le signal d'entrée en sénescence est activé. Le raccourcissement des télomères engendre une réponse de type DDR persistant conduisant à l'activation de la cascade de signalisation impliquant la voie p53 empêchant la progression dans le cycle cellulaire (Blackburn *et al.* 2015).

4.4.2.2. La sénescence en réponse à un stress

Les stimuli qui induisent la sénescence sont nombreux. En effet, comme déjà mentionné, un niveau élevé de stress oxydant ou de dommages à l'ADN causés par les RI, les UV ou encore les agents de chimiothérapie peuvent engendrer la sénescence cellulaire (von Zglinicki *et al.* 2005; Day *et al.* 2014). Par ailleurs, il a été montré que la sénescence peut également être induite par des agents oncogènes laissant penser que celle-ci est un mécanisme de défense de la part de la cellule pour empêcher le développement de cellules tumorales.

D'autres études ont montré que la sénescence en réponse à un stress pourrait être une alternative à l'apoptose (Childs *et al.* 2014) et en fonction du niveau de stress appliqué sur la cellule, celle-ci

emprunte l'une des deux voies. Lorsque la cellule subit de lourds dommages difficilement réparables, elle va préférer la voie de l'apoptose, alors qu'en cas de dommages moins sévères elle va activer la voie de la sénescence. En effet, contrairement à une cellule apoptotique, une cellule sénescence est métaboliquement active et peut encore influencer son environnement (Campisi 2005). Bien que les stress cellulaires soient de nature très variée, comme pour la sénescence répllicative, les voies de signalisation mises en jeu sont de type DDR. Les effecteurs activés sont ceux de la voie suppresseur de tumeur p53 qui aboutit à un arrêt définitif dans le cycle cellulaire, caractéristique des cellules sénescences (d'Adda di Fagagna 2008).

4.4.3. Les caractéristiques des cellules sénescences

La sénescence peut être de nature répllicative ou alors induite par un stress cellulaire, mais les acteurs moléculaires mis en jeu ainsi que le phénotype sénescence sont communs à ces deux phénomènes. Les caractéristiques principales des cellules sénescences sont l'arrêt irréversible dans le cycle cellulaire, l'expression de la SA- β galactosidase et un phénotype sécrétoire bien spécifique.

4.4.3.1. L'arrêt dans le cycle cellulaire

L'arrêt irréversible de la progression des cellules dans le cycle cellulaire est la caractéristique majeure des cellules sénescences à la fois *in vivo* et *in vitro*. En réponse à un stress ou face au raccourcissement des télomères, les mécanismes de DDR (décrits dans le chapitre « dommages à l'ADN ») sont activés. Ceci se traduit par l'activation des kinases ATM et ATR, des transducteurs du signal Checkpoint kinase 1 et 2 (Chk1 et Chk2) ainsi que de l'effecteur p53 (d'Adda di Fagagna 2008). L'arrêt dans le cycle cellulaire peut également se faire en réponse à l'activation de la voie p16/INK4A, indépendante des DDR (Lowe *et al.* 2004). Ces deux voies constituent les voies majoritaires suppresseurs de tumeur et ses composants sont les marqueurs permettant d'identifier les cellules sénescences.

La plupart des signaux cellulaires provenant du raccourcissement des télomères, des dommages à l'ADN sévères ou encore de l'action des ERO convergent vers la voie p53 (Biegging *et al.* 2014). En effet, lors de l'activation des mécanismes de DDR, l'activité ATM (ATR) augmente afin de permettre la prise en charge des dommages. ATM (ATR) permet la phosphorylation de la Chk2 (Chk1) qui en retour diffuse son signal du cytoplasme vers le noyau par une cascade de phosphorylations. Cette cascade aboutit à la phosphorylation de sites spécifiques sur p53 qui sera alors activée. p53 active à son tour la protéine p21, une cycline-dépendant kinase inhibitor (CdkI) impliquée dans le point de contrôle G1/S du cycle cellulaire conduisant à un arrêt stable dans cette phase.

La voie p16/INK4A est activée par des mécanismes DDR-indépendants mais aboutit à l'activation de la protéine p16-Retinoblastoma (pRb) capable d'induire la formation de foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) constitués de marques épigénétiques répressives. Les SAHF répriment l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Narita *et al.* 2003). La voie p16 est une réponse plus tardive au stress cellulaire et est engagée essentiellement lorsque le stress cellulaire est de type oncogénique (Lowe *et al.* 2004).

Ces deux voies suppresseur de tumeur ne sont pas exclusives l'une de l'autre et peuvent agir de façon coordonnée et simultanée. En effet, certains signaux de la voie p53 peuvent également induire l'arrêt du cycle cellulaire par levée de l'inhibition de la protéine pRb *via* p21 (Sabin & Anderson 2011) (Figure 30).

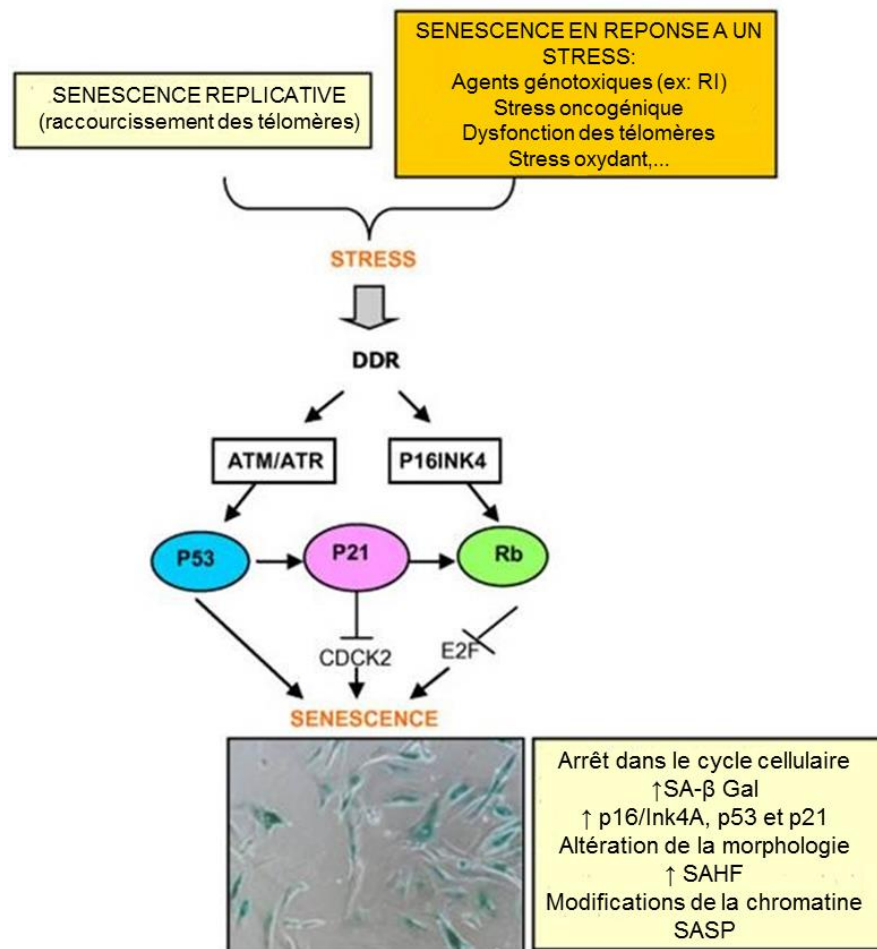


Figure 30: Les voies moléculaires de la sénescence

La sénescence cellulaire passe par l'activation des voies suppresseur de tumeur p53 ou p16/INK4A.
Adapté d'après Sabin & Anderson 2011

4.4.3.2. L'activité SA- β galactosidase

Au niveau enzymatique, les cellules sénescents présentent une expansion du compartiment lysosomal et une augmentation de la granulosité (Kurz *et al.* 2000). Ceci conduit à une augmentation de l'activité de la SA- β galactosidase, une enzyme codée par le gène GLB1 et est communément utilisée comme biomarqueur de la sénescence cellulaire (Dimri *et al.* 1995). Chez les cellules non sénescents, La β -D galactosidase est une enzyme exprimée dans le lysosome et est active à pH 4. Du fait de l'expansion des lysosomes, l'activité de la β -D galactosidase va progressivement augmenter et dépasser un seuil qui la rend détectable même à un pH de 6, c'est à ce moment qu'on l'appelle SA- β galactosidase (Lee *et al.* 2006). Cependant, encore aujourd'hui, son rôle dans le phénomène de sénescence n'est pas élucidé.

4.4.3.3. Les facteurs sécrétés en sénescence

Les cellules qui entrent en sénescence présentent d'importantes modifications de leur profil de sécrétion. Ces changements touchent de nombreuses cytokines et chemokines, ce phénotype est appelé le Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) (Rodier & Campisi 2011). 40 à 80 facteurs interviennent dans la signalisation intercellulaire et la plupart des cytokines impliquées sont essentiellement des cytokines proinflammatoires permettant à la cellule sénescence d'influer sur son environnement, conduisant au maintien de l'état sénescence (Tasdemir & Lowe 2013). Les principaux médiateurs du SASP sont résumés dans le **tableau 2**.

Nom du facteur	Augmentation en réponse à la sénescence
GM-CSF, GRO α , IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2, MMP-1, MMP3, MMP-10	Forte (environ 4 fois)
IL-1 β , MCP-4, MMP-12 à 14, RANTES, TIMP-2	Moyenne (2 à 4 fois)
G-CSF, IL-1R, MMP-2, PAI-1, TIMP-1, SCF, SDF-1	Faible (inférieur à 2 fois)

Tableau 2: Les principaux facteurs du SASP

Les cytokines, chemokines et facteurs de croissance impliqués dans le SASP sont nombreux, leur taux d'augmentation dans les cellules sénescents est variable, entre 2 et 4 fois.

Adapté d'après Freund et al. 2010

Le rôle des molécules du SASP sont multiples (**Figure 31**), d'une part, en collaboration avec p53 et pRb, celles-ci agissent de façon autocrine pour renforcer l'état sénescence de la cellule et empêcher sa transformation en cellule tumorale. Le SASP permet également de médier la signalisation avec le système immunitaire afin d'éliminer les cellules sénescence (Kuilman *et al.* 2010). Cependant, les cellules sénescence augmentant avec l'âge et l'efficacité du système immunitaire n'étant pas de 100 %, il se peut que les cellules sénescence résiduelles provoquent une inflammation chronique pouvant avoir à terme, des effets délétères, notamment dans le développement de cellules tumorales. Le SASP est envisagé comme cible thérapeutique pour le traitement des cancers (Acosta & Gil 2012).

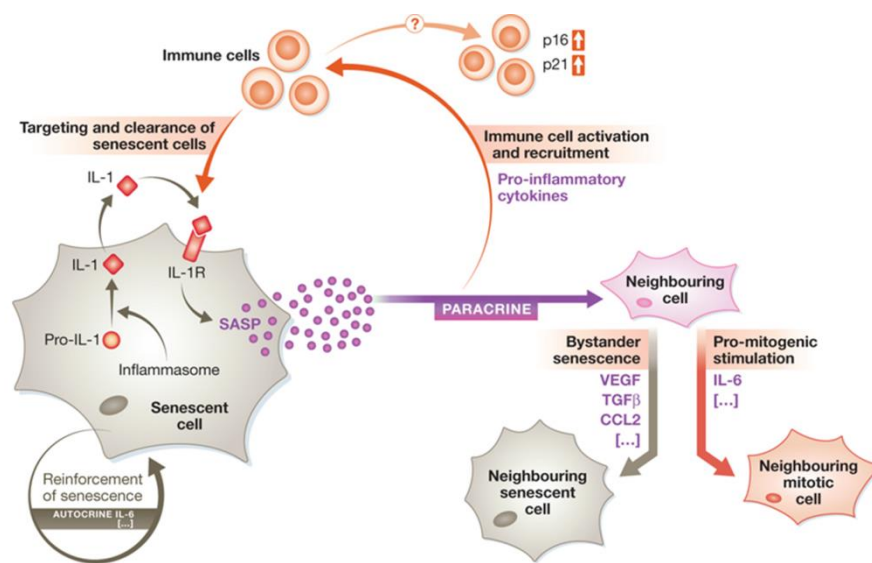


Figure 31: Les principaux rôles du SASP

Le profil de sécrétion des cellules sénescence permet la création d'un environnement cellulaire nécessaire à leur signalisation. *D'après Tasdemir & Lowe 2013*

4.4.4. Les conséquences de la sénescence

La sénescence est une réponse de la part de la cellule à un stress (UV, RI ou raccourcissement des télomères), permettant aux cellules touchées d'entrer dans un état non prolifératif stable mais de rester tout de même métaboliquement actives (*cf.* SASP).

Il est maintenant bien établi que la sénescence cellulaire est un phénomène physiologique lié au vieillissement de l'organisme (Cristofalo *et al.* 2004). Des études ont montré l'implication du microenvironnement de type pro-inflammatoire créé par les cellules sénescence qui contribue à la survenue de nombreuses pathologies liées à l'âge et peut également favoriser la migration et la prolifération de cellules tumorales (le cancer étant également une pathologie liée à l'âge) (Rodier

& Campisi 2011). En effet, l'inflammation chronique provoquée par le SASP pourrait contribuer au phénomène de vieillissement de plusieurs façons. Tout d'abord par le maintien du système immunitaire dans un état d'activation constant mais de faible activité, aboutissant à la sénescence du système immunitaire qui serait donc moins apte à répondre aux différents stimuli avec le temps. De plus, certains facteurs sécrétés par les cellules sénescentes seraient capables soit de dégrader directement les tissus environnants (exemple des MMP) soit de recruter les cellules de l'immunité innée de type macrophages, lésant les tissus indirectement par relargage d'ERO (exemple de l'IL-6 et de l'IL-8 qui ont un fort pouvoir attracteur des cellules immunitaires). C'est donc cette inflammation chronique à bas bruit qui contribue à la survenue de pathologies liées au vieillissement telles que l'arthrite, l'ostéoporose, l'athérosclérose ou encore la maladie d'Alzheimer (phénomène d'«inflammaging») (Vasto *et al.* 2007; Franceschi & Campisi 2014) et de nombreux cancers. Enfin, il a été démontré que les signaux oncogéniques induisant la sénescence pouvaient être activés par des molécules proinflammatoires, laissant supposer que les cellules sénescentes sont capables d'induire leur propre signal de stress (Krtolica *et al.* 2001).

5. Problématique

La dispersion de ^{90}Sr dans l'environnement à la suite d'accidents nucléaires tels que Tchernobyl ou encore à cause du manque de gestion des déchets radioactifs ayant conduit à la contamination de la rivière Techa dans les années 1950, pose le problème des effets sur la santé de l'homme d'une contamination chronique par de faibles quantités de radionucléides. Les études épidémiologiques concernant la cohorte de la rivière Techa, majoritairement contaminée par le ^{90}Sr , ont permis de mettre en évidence plusieurs effets sur la santé. Entre autres, une augmentation de la mortalité par leucémies chez les personnes directement exposées ainsi que des diminutions du taux de remodelages osseux et des inhibitions partielles de l'hématopoïèse ont été observées. Les études expérimentales menées par contamination aiguë ont permis d'identifier le tissu osseux comme site majoritaire d'accumulation du ^{90}Sr . Ces travaux ont également mis en évidence les effets d'une contamination par ce radionucléide, en démontrant l'apparition d'ostéosarcomes et de syndromes myélodysplasiques chez les animaux contaminés. Cependant, le manque de données expérimentales concernant les effets d'une exposition à de faibles concentrations de radionucléides est une problématique majeure.

Au LRTOX, dans le cadre des études des effets sur la santé de l'homme d'une contamination interne par de faibles concentrations de radionucléides, une étude sur la contamination chronique par le ^{90}Sr avait été menée. Cette étude avait pour but d'analyser les effets d'une contamination chronique de ^{90}Sr sur des souris contaminées par l'eau de boisson à 20 kBq.L^{-1} de ^{90}Sr (4 kBq/kg/jour). Les résultats obtenus grâce à ce modèle ont démontré que ce type de contamination avait à la fois une action sur la physiologie osseuse et sur le système immunitaire. En effet, chez les animaux contaminés la résorption de l'os était favorisée, l'équilibre Th1/Th2 était perturbé et une diminution de la production d'anticorps spécifiques de la toxine tétanique (TT), lorsque les souris étaient spécifiquement vaccinées contre cet antigène, était observée.

Les modèles de biocinétique disponibles dans la littérature indiquent que le ^{90}Sr s'accumule principalement dans l'os, site au sein duquel il va se désintégrer. Le rayonnement β - émis au cours de sa désintégration a un parcours dans la matière d'environ $200 \mu\text{m}$. Ce rayonnement aura donc une action potentielle au niveau des cellules à proximité de la bordure osseuse, ces cellules pouvant être les CSM, les CSH et les ostéoblastes. Ces cellules représentent les populations les plus importantes au sein du tissu osseux.

Afin de comprendre les mécanismes d'action du ^{90}Sr pouvant expliquer les effets précédemment observés au laboratoire et dans les différentes études épidémiologiques, deux modèles ont été mis en place au cours de ce travail. Le premier est un modèle *in vitro* dans lequel des cellules stromales murines, les cellules MS5, sont contaminées directement *via* le milieu de culture par du

^{90}Sr à différents temps et concentrations. Ce modèle murin a été choisi pour rester au plus proche des études précédemment réalisées. L'objectif majeur de ce modèle est d'étudier si les mécanismes d'action connus des rayonnements ionisants sont transposables pour une exposition à faibles doses et faible débit de dose. Ceci se traduit par l'induction de stress oxydant, de dommages à l'ADN mais également par la survenue de l'apoptose et de la senescence cellulaire. Par ailleurs, l'utilisation d'une lignée cellulaire bien définie permet de mieux mimer l'effet d'une exposition continue du ^{90}Sr dans l'organisme, sur les CSM tout particulièrement. En effet, la lignée MS5 est une lignée largement caractérisée pour modéliser les cellules stromales. Ces cellules sont impliquées à la fois dans la physiologie osseuse puisqu'elles sont capables de se différencier vers la voie ostéoblastique, mais également dans la fonction immune par leur fonction régulatrice de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse.

Le deuxième modèle est un modèle *in vivo* de contamination chronique de souris Balb/c par l'eau de boisson avec des concentrations de ^{90}Sr de 4, 20 et 100 kBq.L^{-1} sur une durée de 24 semaines et pour lequel la contamination commence dès le stade *in utero*. Ce modèle de contamination est un modèle classiquement utilisé au laboratoire et permettra de traiter deux aspects. Le premier objectif de ce modèle est de confirmer les effets précédemment observés avec la concentration unique de 20 kBq.L^{-1} sur la physiologie osseuse et le système immunitaire. Le deuxième objectif est l'étude des mécanismes d'action *in vivo* du ^{90}Sr , en se basant sur les résultats obtenus *in vitro*.

MATERIEL & METHODES

1. Matériel

1.1. Le modèle *in vivo*

1.1.1. Les souris Balb/c

Toutes les expérimentations animales menées au cours de ce travail ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, n° protocole et avis P13-04) et sont conformes à la législation française (Ministère de l'agriculture, décret n° 2001-464, Mai 2001). Les souris Balb/c proviennent de l'élevage Charles River (L'arbresles, France). A la suite du transport, les animaux ont une semaine d'adaptation avant le début des expérimentations. Les animaux sont placés dans des cages dans une pièce maintenue à température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) avec un cycle jour/nuit de 12 h. Pendant toute la durée de ce travail, les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Aux temps nécessaires, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine/kétamine et sont ensuite euthanasiées par ponction sanguine intracardiaque sur seringue héparinée et dislocation cervicale.

1.1.2. La contamination par le ^{90}Sr

La contamination des animaux se fait à partir d'une source liquide de ^{90}Sr ($^{90}\text{SrCl}_2$, CERCA-LEA, Pierrelatte, France) diluée aux concentrations souhaitées. Cette source contient également du Sr stable à la concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

1.1.2.1. Le mode de contamination

Les animaux sont contaminés par l'eau de boisson (Evian, Danone, Paris, France) contenant des concentrations de ^{90}Sr de 4, 20 et 100 kBq.L^{-1} . Ces concentrations ont déjà été utilisées au laboratoire, notamment pour l'étude de la biocinétique du ^{137}Cs (Bertho *et al.* 2010). La contamination quotidienne des populations autour de Tchernobyl étant estimée entre 10 et 100 Bq par jour pour le ^{90}Sr , la concentration de 20 kBq.L^{-1} a donc été choisie pour représenter la contamination environnementale en se basant sur une consommation quotidienne de 5 mL d'eau par les souris. Les concentrations de 4 et 100 kBq.L^{-1} ont été choisies afin d'encadrer la concentration de référence. Dans ce modèle, un groupe supplémentaire de souris reçoit de l'eau contenant du Sr non radioactif à une concentration de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$. En effet, la source de ^{90}Sr étant diluée dans une solution de Sr stable, cette concentration correspond à la concentration maximale de Sr nécessaire pour diluer la source à la plus forte concentration (100 kBq.L^{-1}).

1.1.2.2. Le modèle d'effet-dose

A la fin de la période d'acclimatation, les animaux sont divisés en 5 groupes en fonction de la contamination : un groupe contrôle recevant de l'eau normale, trois groupes de contamination recevant du ^{90}Sr à 4, 20 ou 100 kBq.L^{-1} et un dernier groupe recevant du Sr stable à 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Deux semaines après le début de la période d'ingestion, chaque groupe est subdivisé en 16 groupes de reproduction composés de 1 mâle et 2 femelles par cage. Une semaine après l'accouplement les mâles sont sacrifiés. Trois semaines après la naissance les animaux sont sexés et seuls les mâles sont conservés. En effet, les hormones sexuelles, et notamment les œstrogènes, ont un rôle dans la régulation de la physiologie osseuse. Afin d'éviter un éventuel biais dans nos analyses, causé par l'influence de ces hormones, pour cette étude seuls les mâles sont utilisés.

Une fois le sexage et le tatouage d'identification des animaux effectués, les groupes de sacrifice sont constitués en prenant des animaux provenant de différentes litières. Chaque groupe se compose de 10 souris et les euthanasies sont effectuées à 3, 7, 20 et 24 semaines après la naissance. Dans ce modèle, les animaux sont donc contaminés par transfert placentaire jusqu'à la naissance, par l'allaitement jusqu'au sevrage (3 semaines) et enfin par l'eau de boisson jusqu'à 24 semaines (**Figure 32**). La consommation de nourriture, en eau de boisson ainsi que le poids de chaque animal est suivi de façon hebdomadaire.

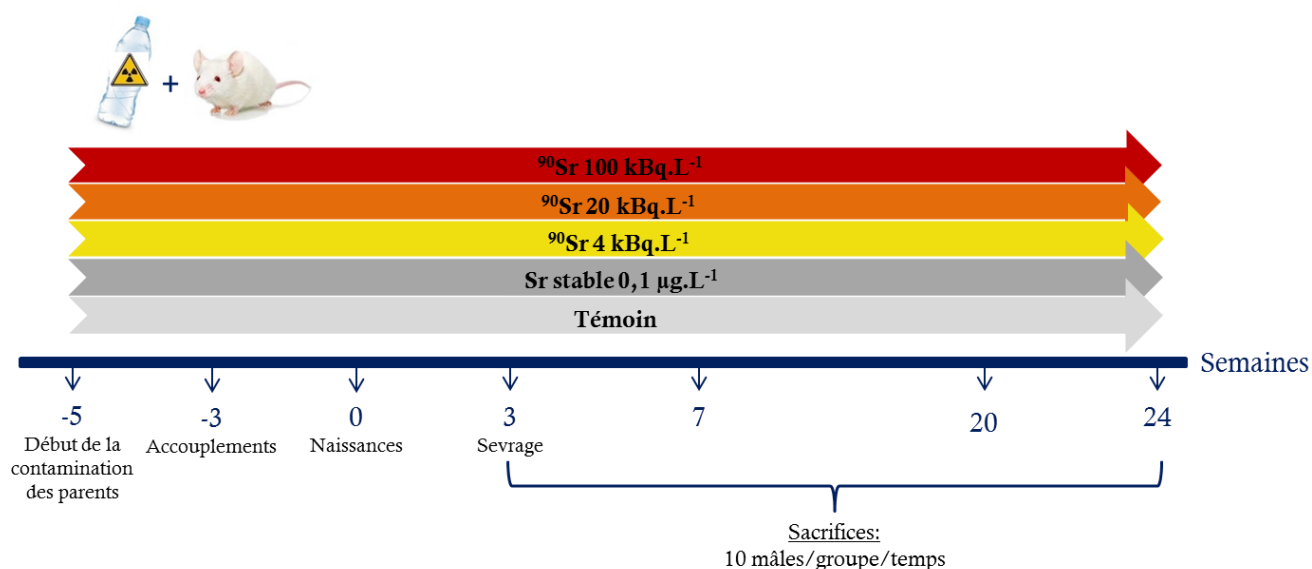


Figure 32: Protocole de contamination pour le modèle *in vivo* effet-dose

Dans ce modèle les parents sont contaminés deux semaines avant l'accouplement. Les animaux utilisés dans ce modèle sont contaminés dès le stade *in utero* et jusqu'à 24 semaines après la naissance. La contamination se fait à partir d'eau de boisson supplémentée en Sr stable à 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou en ^{90}Sr à 4, 20 et 100 kBq.L^{-1} .

1.2. Le modèle *in vitro*

1.2.1. La lignée MS5

La lignée MS5 a été obtenue à partir du stroma médullaire de souris irradiées à 9 Gy (Itoh *et al.* 1989). Ces cellules présentent un phénotype pré-adipocytaire et ont la particularité de pouvoir soutenir l'hématopoïèse *in vitro* (Suzuki *et al.* 1992; Issaad *et al.* 1993). La culture des MS5 a été effectuée dans du milieu Modified Eagle's Medium α (MEM α) supplémenté avec 10 % de Serum de Veau Foetal (SVF), 1 % de L-glutamine et 1 % de pénicilline-streptomycine (le tout provenant d'Invitrogen, Le Pont de Claix, France). Les cellules sont maintenues à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine et un repiquage hebdomadaire a été réalisé. Brièvement, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X avant d'être incubées 5 min à 37°C avec de la trypsine-EDTA (Invitrogen). Une fois collectées, les cellules sont comptées sur lame de Malassez et la viabilité déterminée par exclusion au bleu trypan. Les cellules sontensemencées dans des flasks 75 cm² à 5000 cellules.cm² pour entretien.

1.2.2. Les cellules mésenchymateuses primaires

Les cellules mésenchymateuses sont isolées à partir de moelle osseuse de rats Sprague Dawley (Charles River, France). Brièvement, les rats sont anesthésiés par inhalation d'isofluorane et l'euthanasie se fait par ponction sanguine intracardiaque et dislocation cervicale. Les fémurs sont prélevés et collectés dans du MEM α supplémenté avec 1 % de L-glutamine, 1 % de pénicilline-streptomycine et 20 % de SVF (le tout Invitrogen). Chaque fémur est flushé deux fois avec du MEM α supplémenté avec 20 % de SVF. Après lavage et numération sur lame de Malassez en acide acétique les cellules obtenues sontensemencées à une concentration de 5000 cellules.cm⁻² dans des flasks 75 cm². 24 h plus tard, les flasks sont lavées au PBS 1X afin de retirer toutes les cellules non adhérentes. Les cellules ayant adhéré à la flask sont maintenues dans du milieu de culture (voir paragraphe précédent 1.2.1) changé deux fois par semaine jusqu'à la confluence et sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules mésenchymateuses ainsi obtenues (CSM-MO) sont utilisées après le 1^{er} ou le 2^{ème} passage.

1.2.3. Contamination par le ⁹⁰Sr

La contamination des cellules se fait par le milieu de culture supplémenté en ⁹⁰SrCl₂ à une concentration finale de 1 ou 10 kBq.mL⁻¹. Les cellules sont soit exposées lorsqu'elles sont en phase de prolifération soit une fois qu'elles ont atteint le stade de confluence (**Figure 33**). Le milieu contaminé est laissé en continu sur des durées comprises entre 15 min et 7 jours, en

fonction du paramètre étudié. Pour chacune des expériences décrites, les surnageants cellulaires ont été récupérés et congelés à -80°C .

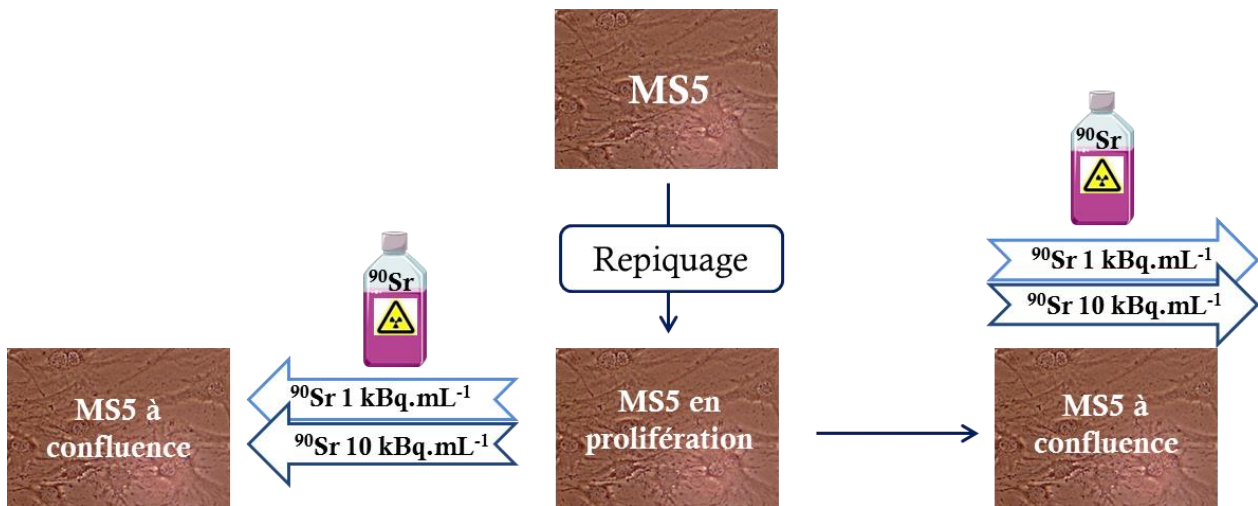


Figure 33: Protocole de contamination pour le modèle *in vitro*

Dans ce modèle les cellules sont contaminées par du ^{90}Sr à 1 ou $10\text{ kBq}\cdot\text{mL}^{-1}$ soit au moment de la prolifération, soit une fois qu'elles ont atteint le stade de confluence. La durée de la contamination varie de 30 minutes à 7 jours en fonction du paramètre étudié.

2. Méthodes

2.1. Prélèvement et traitement des échantillons

2.1.1. Les cellules MS5

Sauf indication, à la fin de chaque temps d'exposition au ^{90}Sr , les cellules sont récoltées et stockées pour les analyses génétiques et protéiques sous forme de culots secs. Pour cela, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X, incubées 5 min avec de la trypsine-EDTA à 37°C, comptées sur lame de Malassez et centrifugées 8 minutes à 400 g en PBS 1X. A la fin de la centrifugation le surnageant est enlevé et les culots secs obtenus sont stockés à -80°C.

2.1.2. Modèle « effet-dose » : prélèvement d'organes

2.1.2.1. Prélèvement chez les parents

Dans cette étude les pères sont euthanasiés après l'accouplement, les mères sont euthanasiées au moment du sevrage (3 semaines). Pour chacun d'eux, le sang est prélevé par ponction intracardiaque pour l'analyse de la numération et de la formule sanguine (NFS) réalisées grâce au compteur MS-9 (Melet-Schlossing, Osny, France). Le plasma est ensuite isolé par centrifugation 5 min à 800 g et est stocké à -80°C. Un fémur est également prélevé pour vérification de la contamination.

2.1.2.2. Prélèvements chez la descendance

Dans cette étude, les animaux sont euthanasiés à 3, 7, 20 et 24 semaines après la naissance. Pour chacune des souris, le sang, la rate, le thymus, les nœuds lymphoïdes mésentériques (NLM), les deux fémurs et un tibia sont prélevés (voir **Figure 34** pour récapitulatif).

La rate et le thymus sont prélevés et découpés en trois parties. Un premier morceau est fixé 24 h dans du PFA 4 % pour des analyses histologiques, les deux autres morceaux sont congelés en azote liquide pour des extractions d'ARN totaux ou de protéines.

Les NLM sont fixés 24 h en PFA 4 %.

Concernant les fémurs, l'un est fixé 24 h en PFA 4% pour des analyses histologiques alors que le deuxième est flushé avec du PBS-BSA 0,5 % afin de récupérer les cellules de la moelle osseuse. Pour chaque fémur flushé, le culot cellulaire est divisé en deux lots, l'un pour extraction d'ARN totaux, l'autre pour extraction protéique, chaque culot est stocké à -80°C. Le fut fémoral restant (os dépourvu de cellules médullaires) est également congelé à -80°C.

Enfin, pour vérifier la contamination des animaux, un tibia est prélevé et pesé.

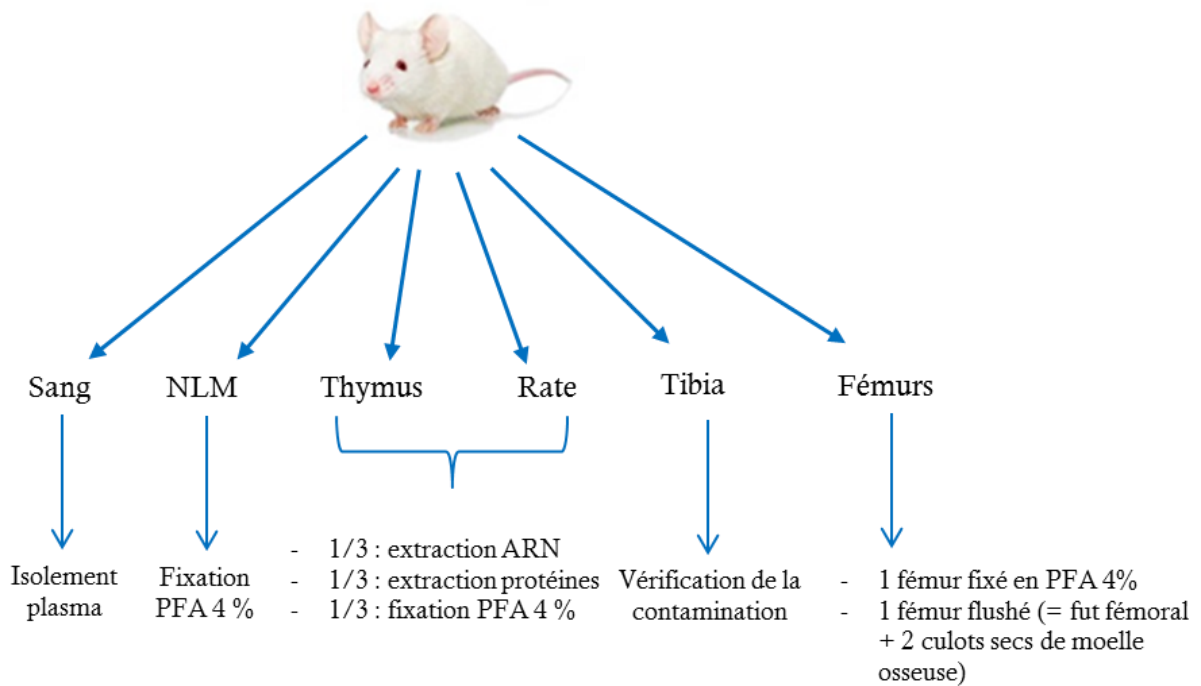


Figure 34: Récapitulatif des prélèvements chez les animaux

Dans ce modèle, le sang, les nœuds lymphoïdes mésentériques (NLM), le thymus, la rate, le tibia et les deux fémurs sont prélevés aux temps 3, 7, 20 et 24 semaines après la naissance.

2.2. Mesure du ^{90}Sr

2.2.1. Vérification de la contamination des cellules MS5 et CSM-MO

Pour chacune des expérimentations, 0,5 à 1 mL de milieu de culture est prélevé et 15 mL de liquide scintillant sont ajoutés à chaque échantillon (Ultima Gold AB, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Le liquide scintillant permet de convertir l'énergie β émise au cours de la désintégration du ^{90}Sr en photons. La mesure du ^{90}Sr se fait avec un compteur β à scintillation liquide (TRI-CARB 2700TR Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer) avec un temps de comptage de 2 h par échantillon. La valeur obtenue est une mesure en coups par minute (cpm).

2.2.2. Mesure du ^{90}Sr dans les os

Pour la mesure du ^{90}Sr dans l'os, les fémurs et les tibias sont tout d'abord calcinés pendant 5 h au four à 500°C. Les cendres sont dissoutes deux fois dans un mélange 2 :1 d'acide nitrique 67 % et peroxyde d'hydrogène 30 % et chauffées jusqu'à évaporation complète. La procédure complète de calcination-dissolution est répétée deux fois pour chaque échantillon. A la fin de ce cycle, les échantillons sont redissous toute la nuit dans 1 mL d'acide nitrique 10 %. Enfin, 15 mL de liquide scintillant (Ultima Gold AB, Perkin Elmer) sont ajoutés à chaque échantillon qui sera compté 2 h au compteur β à scintillation liquide (TRI-CARB 2700TR).

2.2.2.1. Calcul de l'activité massique

La valeur obtenue en coups par minute (cpm) pour chaque échantillon d'os est convertie en activité par unité de masse A_m (en $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$) selon l'équation suivante :

$$A_m = (\text{CPM}_{\text{brut}} - \text{CPM}_{\text{témoin}}) / ((60 \times E \times m) / 100)$$

où CPM_{brut} correspond à la valeur brute de l'échantillon (en cpm), $\text{CPM}_{\text{témoin}}$ la moyenne en cpm du bruit de fond obtenue par comptage de 10 échantillons témoin, m la masse de l'échantillon (en g) et E l'efficacité de détection du ^{90}Sr (en %). L'efficacité E est calculée par :

$$E = (\text{CPM}_{\text{add}} - \text{CPM}_{\text{brut}}) / ((60 \times A_{\text{add}}) / 100)$$

où CPM_{add} est la mesure brute de l'échantillon (en cpm) après addition de 2 Bq de ^{90}Sr et A_{add} est l'activité définie de ^{90}Sr ajoutée (ici 2 Bq).

Cette méthode de détermination de l'efficacité de comptage est appelée « méthode par ajout dosé ».

2.2.2.2. Calcul des doses cumulées : os et corps entier

Les calculs de la dose absorbée sont établis grâce au logiciel RODES développé par le laboratoire d'évaluation de la dose interne, (LEDI, IRSN).

2.3. Les analyses génétiques

2.3.1. Extraction d'ARN totaux

2.3.1.1. Extraction des ARN totaux des MS5, cellules de moelle osseuse et rate

Les ARN des cellules MS5, de la rate et des cellules de moelle osseuse sont extraits grâce au kit d'extraction RNeay mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole fourni. Brièvement les MS5, les cellules de moelle osseuse et la rate sont lysés grâce au tampon de lyse fourni dans le kit, supplémenté avec 1 % de β -mercaptoéthanol. De l'éthanol 70 % est ajouté dans les lysats et le mélange est transféré sur une colonne RNeasy capable de retenir spécifiquement les ARN. Des successions de lavages avec les différents tampons fournis permettent la purification des ARN dans la colonne. Les ARN sont élués de la colonne avec de l'eau RNase-free. L'éluat est incubé 5 min à 65°C afin d'éliminer les structures secondaires.

2.3.1.2. Extraction des ARN totaux des fémurs

L'extraction des ARN des fémurs se fait avec du Trizol (Qiagen). Brièvement, les fémurs sont broyés sur glace à l'ultraturrax dans du Trizol. Le broyat est centrifugé afin d'éliminer les impuretés puis le surnageant est repris dans du chloroforme. Après centrifugation, la phase contenant les ARN est récupérée et de l'isopropanol permettant la précipitation des ARN est ajouté. Le tout est centrifugé et le culot contenant les ARN est lavé deux fois avec de l'éthanol 70 %. Après le dernier lavage, le culot est repris dans 20 à 40 μ l d'eau RNase-free et est incubé 5 min à 65°C afin d'éliminer les structures secondaires.

2.3.2. Dosage des ARN totaux

La concentration d'ARN est mesurée par densité optique à 260 nm grâce au NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Labtech, Palaiseau, France). La qualité des ARN est obtenue grâce au ratio entre les mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm (ratio 260/280 devant être compris entre 1,8 et 2).

2.3.3. Rétro-transcription

Au total, 1 µg d'ARN totaux est rétro-transcrit grâce au kit high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole fourni. Le mélange de rétro-transcription contient du tampon de rétro-transcription (20 % v/v), des primers aléatoires (20 % v/v), des nucléotides (dNTP, 8 % v/v), de l'eau RNase-free (42 % v/v) et l'enzyme de synthèse, la Multiscribe reverse transcriptase (10 % v/v). A la fin du cycle de rétro-transcription les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

2.3.4. PCR en temps réel

L'expression des gènes a été mesurée par PCR en temps réel (RT-qPCR) par amplification à partir des ADNc obtenus par rétro-transcription. Les primers utilisés dans ce travail sont issus soit de la littérature, soit déterminés grâce à la plateforme PrimerBlast (NCBI, USA). Pour chaque couple de primers, les séquences sens et antisens établies doivent couvrir au moins une jonction exon-exon sur la séquence d'ARNm correspondante. Ceci permet d'exclure toute amplification non spécifique d'ADN génomique. La liste des primers utilisés au cours de cette thèse est disponible dans les **tableaux 3 et 4**.

Dans une plaque 384 puits, 6 µl d'ADNc préalablement dilué au 1/50^{ème} dans de l'eau nucléase-free sont déposés dans chaque puits. Puis, 4 µl de mélange réactionnel sont ajoutés. Le mélange est composé de SYBR Green PCR Master Mix (83 % v/v, contenant l'enzyme de polymérisation, les nucléotides et du SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN double brin, Applied Biosystem), d'eau nucléase-free (14,5 % v/v) et du mélange de primers sens et antisens pour le gène d'intérêt (2,5 % v/v). L'amplification et la détection des produits de PCR se fait grâce au Quant Studio™ 12K Flex (Life Technologies).

2.3.5. Quantification de l'expression génique

Afin de quantifier l'expression des gènes d'intérêt, le nombre de cycle seuils (Ct), c'est-à-dire, le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence de l'échantillon dépasse celle du bruit de fond, est utilisé. La méthode de quantification utilisée tient compte de l'efficacité E d'amplification de chaque couple de primers :

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

La valeur de la pente étant déterminée lors de la réaction d'amplification de chaque couple de primer avec une gamme de dilution d'ADNc.

Pour l'analyse, les Ct > 35 et les duplicats ayant un CV > 0,5 sont exclus.

Les quantités relatives sont obtenues en calculant la moyenne des Ct par échantillon et pour chaque gène de référence et d'intérêt dans le groupe témoin. Ce nombre est normalisé par rapport à la moyenne géométrique du niveau d'expression des gènes de référence (Pfaffl 2001).

Dans le groupe témoin, pour chaque gène de référence la moyenne des Ct est calculée ($M Ct_{ref Te}$) puis pour chacun des échantillons des groupes la différence de Ct par rapport au témoin est établie ($\Delta Ct_{ref \acute{e}ch}$):

$$\Delta Ct_{ref \acute{e}ch} = M Ct_{ref Te} - Ct_{ref \acute{e}ch}$$

La réaction d'amplification suivant un profil exponentiel, la valeur brute de l'expression de chaque gène est donnée par la formule:

$$E^{-\Delta Ct_{ref \acute{e}ch}}$$

Pour un même échantillon la moyenne géométrique des gènes de référence ($Mgéo_{ref \acute{e}ch}$) à partir du $E^{-\Delta Ct_{ref \acute{e}ch}}$ est calculée.

Pour chaque gène cible, les calculs suivent la même progression que celle décrite ci-dessus en commençant par le calcul de la moyenne des Ct pour le groupe témoin ($M Ct_{cible Te}$) et ensuite pour chaque groupe :

$$\Delta Ct_{cible \acute{e}ch} = M Ct_{cible Te} - Ct_{cible \acute{e}ch}$$

Suivi du calcul de $E^{-\Delta Ct_{cible \acute{e}ch}}$

Afin de connaître l'expression relative de chacun des gènes cible par rapport au témoin, le *ratio* de quantification ($RQ_{\acute{e}ch}$) pour chaque échantillon est obtenu par la formule suivante :

$$RQ_{\acute{e}ch} = E^{-\Delta Ct_{cible \acute{e}ch}} / Mgéo_{ref \acute{e}ch}$$

Pour chaque gène d'intérêt la quantification est réalisée en calculant la moyenne des $RQ_{\acute{e}ch}$ pour chacun des groupes.

Nom du gène	Séquence (5'-3')	Accession number
Glutathion S-transférase (<i>Gst</i>)	S : GACTGTGAGCTGAGTGGAGAAGAA AS : CCGGCCATTGCAGCAA	NM_008181.3
Glutathion reductase (<i>Gsr</i>)	S : CGGCGATCTCCACAGCAATG AS : ACCGCTCCACACATCCTGATTG	NM_010344.4
Glutathion peroxydase (<i>Gpx</i>)	S : GGGACTACACCGAGATGAACG AS : TCCGCAGGAAGGTAAAGAGC	NM_008160.6
Manganèse superoxyde dismutase (<i>MnSOD</i>)	S : ACACATTAACGCGCAGATCA AS : AATATGTCCCCACCATTGA	NM_001281206.1
Catalase (<i>Cat</i>)	S : AGCGACCAGATGAAGCAGTG AS : GGGTTACCTCAAAGTATCCAAA	NM_009804.2
Transformation-related protein 53 (<i>p53</i>)	S : TTCATTGGGACCATCCTGGC AS : GGCAGTCATCCAGTCTTCGG	NM_011640.3
Cdk interacting protein 1 (<i>p21</i>)	S : TTGTCGCTGTCTTGCACTCTGGT AS : AGACCAATCTGCGCTTGGAGTGAT	NM_007669.4
Lipoprotéine lipase (<i>Lpl</i>)	S : AGGCATACAGGTGCAACTCC AS : GTCCAGTGTCAGCCAGACTT	NM_008509.2
Adiponectine (<i>Adipoq</i>)	S : GGATCTGACGACACCAAAAGG AS : AGGAGAGCTTGCAACAGTAGCAT	NM_009605.4
Fatty acid binding protein-4 (<i>Fabp4</i>)	S : TGGAAAGTCGACCACAATAAAGAG AS : CACCACCAGCTTGTACCAT	NM_024406.2
Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	S : AGCTTGTCATCAACGGGAAG AS : TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	NM_008084
60S ribosomal protein L27 (<i>Rpl27</i>)	S : AAGCCGTCATCGTGAAGAACA AS : CTTGATCTTGGATCGCTTGGC	NM_011289
Peptidylprolyl isomerase A (<i>Ppia</i>)	S : GGGTTCCTCCTTTCACAGAA AS : GATGCCAGGACCTGTATGCT	NM_008907

Tableau 3: Liste des primers utilisés pour le modèle *in vitro*

S: Séquence sens, **AS** : Séquence antisens.

Organe	Nom du gène	Séquence (5'-3')	Accession number
Moelle osseuse, fut fémoral	<i>Gsr, Gpx, MnSOD, Cat, p21</i>	Voir table 3	
	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (<i>Nrf2</i>)	S : CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA AS : GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT	NM_010902.3
	Interleukine-6 (<i>Il-6</i>)	S : TGCTGGTGACAACCACGGCCT AS : GGCATAACGCACTAGGTTTGCCGA	NM_031168.1
Fut fémoral	Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (<i>RankL</i>)	S : TCAGCTGATGGTGTATGTCGTTAA AS : TTCGTGCTCCCTCCTTTCAT	NM_011613.3
	Tartrate resistant acid phosphatase 5 (<i>Trap5b</i>)	S : GATGACTTTGCCAGTCAGCAG AS : GCACATAGCCACACCGTTCTC	NM_007388.3
	Osteonectin (<i>Opg</i>)	S : GGGCGTTACCTGGAGATCG AS : GAGAGAACCCTCTGGACATTT	NM_08764.3
	Alcaline phosphatase (<i>Alp</i>)	S : CCGATGGCACACCTGCTT AS : GAGGCATACGCCATCACATG	NM_007431.2
	Osteocalcine (<i>Ocn</i>)	S : CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA AS : AGGCGGTCTTCAAGCCATACT	NM_007541.2
	Bone sialoproteine (<i>Bsp</i>)	S : ACCCAAGCACAGACTTTTGA AS : CTTTCTGATCTCCAGCCTTCT	NM_008318.3
Rate	Interleukine-4 (<i>Il-4</i>)	S : GAGCTCGTCTGTAGGGCTTC AS : TGCAGCTCCATGAGAACACT	NM_021283
	Interleukine-10 (<i>Il-10</i>)	S : AGAGAAGCATGGCCAGAAAT AS : CGCATCCTGAGGGTCTCA	NM_010548.2
	Interféron-γ (<i>Ifn-γ</i>)	S : AGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAG AS : CCTTTTTTCGCCTTGCTGTTG	NM_008337.3
	T-box 21 (<i>T-bet</i>)	S : ACCAGAACGCAGAGATCACTCA AS : CAAAGTTCTCCCGGAATCCTT	NM_019507.2
	GATA binding protein 3 (<i>Gata-3</i>)	S : CTACCGGGTTCGGATGTAAGTC AS : GTTACACACTCCCTGCCTTCT	NM_008091.3
	Forkhead box P3 (<i>Foxp3</i>)	S : CCCAGGAAAGACAGCAACCTT AS : TTCTACAACCAGGCCACTTG	NM_054039.1
Moelle osseuse, fut fémoral, rate	Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	S : AGCTTGTCATCAACGGGAAG AS : TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	NM_008084
	60S ribosomal protein L41 (<i>Rpl41</i>)	S : GCCATGAGAGCGAAGTGG AS : CTCCTGCAGGCGTCGTAG	NM_018860
	Peptidylprolyl isomerase A (<i>Ppia</i>)	S : GGGTTCCTCCTTTCACAGAA AS : GATGCCAGGACCTGTATGCT	NM_008907

Tableau 4: Liste des primers utilisés pour le modèle *in vivo*

S: Séquence sens, AS : Séquence antisens.

2.4. Les analyses protéiques

2.4.1. Extraction de protéines

Les protéines sont extraites à partir des culots cellulaires de MS5, de la moelle osseuse ou de la rate des souris Balb/c en utilisant du tampon de lyse composé en partie de 0,1 % de SDS, 0,5 % d'acide deoxycholique et 1 % d'Igepal et d'inhibiteur de protéases (RIPA, Mammalian Cell Lysing kit, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) en suivant le protocole fourni. Les culots cellulaires sont lysés avec 50 à 100 μ L de tampon RIPA en vortexant au moins 30 sec chaque échantillon, alors que les morceaux de rate sont placés dans 500 μ L de tampon RIPA et sont lysés environ 15 sec par sonication. Les lysats cellulaires sont incubés sur glace pendant 15 min, centrifugés et le surnageant résultant contient la fraction protéique.

2.4.2. Dosages de protéines

La concentration en protéines est mesurée par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, Life Technologies) reposant sur la réduction des ions Cu par les protéines en milieu alcalin. Les ions Cu ainsi générés forment un complexe de couleur violette avec l'acide bicinchoninique mesurable à 562 nm. L'absorbance est mesurée grâce au lecteur de plaques Multiscan FC (Thermo Fisher) et est directement proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

2.4.3. Le western blot

Pour chaque échantillon utilisé, 20 μ g de protéines sont dénaturées 5 minutes à 95°C dans du tampon Laemmli (Tris-HCl pH=6,8, glycérol, SDS, β -mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol). Les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide 10 % en conditions dénaturantes (pour la composition des gels de concentration et de séparation voir **tableau 5**). Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Invitrogen) par application d'un courant électrique pendant 1 h 30. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante avec du tampon de saturation Tris Buffer Saline (TBS) à 5 % de lait écrémé afin de bloquer les sites aspécifiques. La membrane est incubée toute la nuit à + 4°C en présence d'anticorps primaires dilués dans du TBS 5 % de lait (pour la liste des anticorps voir **tableau 6**). A la fin de l'incubation, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec du PBS 1X puis est incubée 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase du raifort (Horse Radish Peroxydase, HRP) dilués dans du TBS 1 % de lait. Enfin la membrane est rincée avant d'être incubée avec un mélange de chemiluminescence (Millipore) et est révélée avec le Fujifilm LAS-3000. L'intensité des bandes est normalisée par rapport à celle de la GAPDH, utilisée comme témoin de charge des échantillons.

Composants	Gel de concentration	Gel de séparation
Eau milliQ	3 ml	6,05 ml
Tris-HCl 0,5 M pH=6,8	1,25 ml	
Tris-HCl 1,5 M pH=8,8		3,75 ml
SDS 10 %	50 µl	150 µl
Acrylamide Bis 30 %	668 µl	5 ml
TEMED	7,5 µl	25 µl
APS 10 %	50	150 µl

Tableau 5: Composition des gels pour le western blot

Les volumes indiqués sont utilisés pour la préparation de 5 ml de gel de concentration et de 15 ml de gel de séparation de 1 mm d'épaisseur respectivement.

Protéine d'intérêt	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Paramètre testé
Ku70	70	Santa Cruz ref. H-308 sc-9033	Réparation de l'ADN (voie NHEJ)
Mre11	80	AbCam ref.34754	Réparation de l'ADN (voie HR)
Rad51	37	Santa Cruz ref. H-92 sc-8349	Réparation de l'ADN (voie HR)
p21	23	Santa Cruz ref. M-19 sc-471	Sénescence
GAPDH	37	Santa Cruz ref. FL-335 sc-25778	Témoin de charge
Anticorps secondaire : chèvre anti-lapin+HRP		AbCam ref.6721	Anticorps de révélation

Tableau 6: Anticorps utilisés pour le western blot

Tous les anticorps primaires sont des anticorps de lapins anti-Ig de souris

2.4.4. Le screening protéique

Les extraits protéiques de MS5 sont utilisés afin d'obtenir le profil d'expression de cytokines intracellulaire. Pour cela, le Proteome profiler Array (R&D system, Abingdon, UK) a été utilisé en suivant les instructions fournies. Brièvement, 200 µg d'extraits protéiques provenant de MS5 contaminées pendant 24 h ou 7 jours sont incubés toute la nuit à + 4°C sur des membranes coatées avec des anticorps spécifiques pour 40 cytokines. A la fin de l'incubation les membranes sont rincées et incubées avec de la streptavidine-HRP pendant 30 min. Enfin les membranes sont incubées avec un mélange chemiluminescent et révélées au Fujifilm LAS-3000. Pour chaque cytokine obtenue, la moyenne de la densité de pixels est calculée grâce au logiciel Multi-Gauge (Fujifilm).

2.5. Les dosages

2.5.1. Enzyme Linked Immunosorbant Assays (ELISA)

L'ELISA est une technique qui repose sur la reconnaissance de protéines présentes dans l'échantillon d'intérêt par des anticorps spécifiques. Dans cette méthode, la reconnaissance des anticorps se fait par des anticorps secondaires biotinylés qui se lient à la streptavidine couplée à l'HRP qui par réaction avec son substrat, le peroxyde, permet la quantification de la protéine d'intérêt en fonction de la valeur de l'absorbance. Tous les ELISA ont été effectués grâce à des kits spécifiques en suivant chaque fois le protocole fourni. La lecture de l'absorbance s'effectue sur le lecteur de plaques Multiscan FC (Thermo Fisher) à la longueur d'onde indiquée.

2.5.1.1. Concentrations extracellulaires

La production extracellulaire de cytokines après contamination a été mesurée en utilisant les surnageants de MS5. Les kits ELISA utilisés proviennent tous de R&D Systems (Abingdon, UK). Les surnageants sont utilisés pour le dosage de l'inteleurkine-6 (IL-6, detection limit (dl) : 1,6 pg.ml⁻¹), l'interleukine-3 (IL-3, dl : 2,5 pg.ml⁻¹), le Stem Cell Factor (SCF, dl : 5 pg.ml⁻¹), le recepteur antagoniste à l'interleukine-1 (IL-1ra, dl : 7 pg.ml⁻¹), le Stromal cell-Derived Factor 1 (SDF-1, dl : 0,044 ng.ml⁻¹), le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, dl : 1,8 pg.ml⁻¹), le Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF, dl : 5 pg.ml⁻¹), le Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 (TIMP-1, dl : 2,1 pg.ml⁻¹), le Monocyte Chimioattractant Protein 1 (MCP-1, dl : 2 pg.ml⁻¹) et le Macrophage Stimulating Factor (M-CSF, dl : 5 pg.ml⁻¹).

2.5.1.2. Concentrations plasmatiques

Le plasma obtenu à partir du sang des souris Balb/c a été utilisé pour le dosage ELISA des concentrations d'enzymes impliquées dans la physiologie osseuse, plus particulièrement dans l'équilibre formation/résorption de l'os. Les enzymes suivantes ont été dosées : l'Alcaline Phosphatase spécifique de l'os (bALP, USCN Life Science Inc., dl : 0,059 ng.ml⁻¹), l'ostéocalcine (OCN, USCN Life Science Inc., dl: 23,58 pg.ml⁻¹), la Tartrate Resistant Acid Phosphatase 5 (TRAP5, USCN Life Science Inc., dl: 28 pg.ml⁻¹) et le C-terminal Telopeptide du collagène I (CTX, Immunodiagnostic Systems, dl : 2ng.ml⁻¹).

2.5.1.3. Concentrations spléniques

L'évaluation du système immunitaire et plus spécifiquement de l'équilibre Th1/Th2 et Treg se fait à partir des extraits protéiques de rate des souris Balb/c. Les cytokines dosées par ELISA sont l'Interféron- γ (IFN- γ , dl : 2 pg.ml⁻¹), l'interleukine-4 (IL-4, dl : 2 pg.ml⁻¹) et l'interleukine-10 (IL-10, dl : 1,97 pg.ml⁻¹). Tous ces kits proviennent de R&D system (UK).

2.5.2. Le multiplex

La concentration plasmatique de 6 isotypes d'immunoglobulines (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, Ig3 et IgM) a été mesurée par la méthode multiplex grâce au lecteur MagPix (Millipore) à partir du plasma des souris Balb/c. Brièvement, cette technique permet de coupler les propriétés de la cytométrie en flux avec la spécificité et la sensibilité d'un dosage ELISA. Cette technique permet d'obtenir à partir d'un faible volume d'un seul échantillon, le dosage de dizaines de molécules dans un même puits. Les échantillons sont d'abord incubés en présence d'un cocktail d'anticorps, chacun couplé à une bille magnétique fluorescente, chaque bille ayant une couleur différente. Lors de l'excitation par le laser, chaque bille émet une couleur spécifique, et c'est la combinaison de couleur dans chaque puits qui permet de déterminer la concentration de chacun des isotypes présents dans l'échantillon.

2.5.3. Le dosage de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme relarguée par les cellules lorsque la membrane est rompue. Ce dosage permet d'évaluer la mortalité cellulaire, en effet l'absorbance obtenue dans les échantillons est directement proportionnelle à la quantité de LDH rejetée. Ce dosage est réalisé sur des surnageants provenant de MS5 contaminées pendant 7 jours grâce au kit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche, Meylan, France) en suivant les instructions fournies.

2.6. Histologie et immunohistologie

2.6.1. Le modèle *in vitro*

2.6.1.1. Coloration à l'Oil Red O

Les cellules mésenchymateuses stromales ont comme caractéristique de pouvoir se différencier en plusieurs lignées cellulaires (Pittenger *et al.* 1999) et les MS5 ont un phénotype pré-adipocytaire. Les cellules MS5 sont mises en culture en plaque 12 puits, en triplicat pour chaque condition. Après 7 jours de contamination par 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X et fixées 10 min à température ambiante dans une solution de PFA 4 %. A la fin de la fixation, deux rinçages avec du PBS 1X sont effectués avant d'incuber les cellules 10 min avec une solution d'Oil Red O (Sigma-Aldrich), spécifique des vacuoles lipidiques. La solution est ensuite remplacée par une solution d'hémalum de Mayers pendant 1 min pour la contre-coloration des noyaux et les puits sont enfin rincés avec de l'eau courante jusqu'à obtention d'une eau claire. Le nombre de cellules contenant des vacuoles lipidiques a été établi au microscope optique en comptant 10 champs par puits, chaque champ contenant 50 cellules minimum.

2.6.1.2. La SA β -galactosidase

La Senescence-Activated β -galactosidase (SA β -galactosidase) est une enzyme produite par les cellules sénescentes. Les cellules MS5 sont mises en culture dans des plaques 12 puits comme décrit ci-dessus et après 7 jours de contamination la SA β -galactosidase est révélée grâce au Senescence détection kit (Promokine, Heidelberg, Allemagne) en suivant les instructions fournies. Brièvement, les cellules sont rincées avec du PBS 1X et incubées avec une solution de fixation. A la fin de la fixation, les cellules sont incubées toute la nuit à 37°C avec une solution de X-galactose, substrat spécifique de la SA β -galactosidase. A la fin de l'incubation les cellules exprimant la SA β -galactosidase présentent une coloration bleu dans le cytoplasme.

2.6.1.3. Immunohistochimie

2.6.1.3.1. Cassures double-brin : γ -H2AX

Les cassures double brin de l'ADN sont caractérisées par la phosphorylation du variant d'histone H2AX, elles peuvent être mises en évidence par immunomarquage (Rogakou *et al.* 1998). Les cellules MS5 et les CSM-MO sont mises en culture en labteks 4 chambres (2 cm² par chambre) à une concentration de 20 000 cellules.cm⁻². 3 jours après la mise en culture, le milieu est remplacé par 1 mL de milieu frais témoin ou contenant 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr laissé pendant 30 min, 24

h, 72 h et 7 jours (sauf pour les CSM-MO). Cette cinétique est basée sur la cinétique connue d'apparition et de disparition des foci γ -H2AX à la suite d'une irradiation externe. Le témoin positif est une labtek irradiée à 1 Gy par une source de ^{137}Cs .

A la fin des incubations successives, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X et fixées pendant 15 min à température ambiante dans une solution à 4 % de PFA et 2 % de sucrose. A la fin de la fixation les cellules sont perméabilisées pendant 3 min avec une solution de lyse contenant 0,5 % de triton X-100. La solution est ensuite remplacée par la solution contenant l'anticorps primaire de lapin anti γ -H2AX (Millipore, Guyancourt, France) dilué au 1/800^{ème} dans du PBS-BSA 2 % pendant 40 min à 37°C. Après incubation, les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X et incubées 20 min à 37°C avec l'anticorps secondaire fluorescent anti-IgG de lapin-FITC (Life Technologies) dilué au 1/200^{ème} dans du PBS-BSA 2 %. Enfin, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS 1X. Les chambres des labteks sont retirées et une goutte de Vectashield contenant du DAPI à 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Life Technologies) est déposée sur les cellules afin de visualiser les noyaux. Les images sont acquises automatiquement au microscope à fluorescence couplé au système Metafer (Metasystem, Alltussheim, Allemagne) à l'objectif x63. Au minimum, 250 noyaux par chambre sont acquis et les foci γ -H2AX par noyau ont été quantifiés de façon semi-automatique grâce au logiciel Histolab (Microvision Instrument, Evry, France).

2.6.1.3.2. Immunomarquage de p21

Les cellules MS5 sont mises en culture sur des lamelles en verre dans des plaques 12 puits, (3 puits par condition) à une concentration de 5000 cellules.cm⁻². Après 7 jours de contamination, le marquage de p21 a été réalisé en suivant le même protocole que celui décrit ci-dessus. L'anticorps primaire utilisé est un anti-p21 de lapin (Santa-Cruz, Heidelberg, Allemagne) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS-BSA 2 % et l'anticorps secondaire est un anti-IgG de lapin couplé au FITC (Life Technologies) dilué au 1/200^{ème} dans du PBS-BSA 2 %. Les images ont été acquises au microscope à fluorescence à l'objectif x20. Cinq champs par puits ont été analysés et la quantification du nombre de noyaux positifs pour p21 a été effectuée grâce au logiciel Histolab (Microvision Instrument).

2.6.2. Le modèle *in vivo* : traitement des organes pour l'histologie

Suite à la fixation en PFA 4 %, les fémurs sont rincés deux fois avec du PBS 1X et sont incubés 1 h pour décalcification avec du Rapid DeCalcifier (RDC, CML, France). A la fin de la décalcification, les fémurs sont rincés à nouveau avec du PBS 1X et sont conservés dans de l'éthanol 70 %. La rate, le thymus et les NLM sont rincés deux fois au PBS 1X et conservés dans

l'éthanol 70 %. Tous les organes sont ensuite placés dans des cassettes d'identification et passés au VIP (Tissue-Tek, Sakura, Villeurbanne, France) qui par une succession d'étapes permet la déshydratation et l'inclusion en paraffine des échantillons de façon automatique (étapes décrites dans le **tableau 7**). A la fin du processus, chaque échantillon est inclus dans des blocs de paraffine pour conservation.

Solution	Temps (minutes)
Formol	10
Ethanol 80 %	10
Ethanol 80 %	25
Ethanol 95 %	10
Ethanol 95 %	25
Ethanol 100 %	25
Butanol	15
Butanol	15
Toluène	40
Xylène	40
Paraffine	15
Paraffine	30
Paraffine	60
Paraffine	60

Tableau 7: Etapes de passage au VIP

2.7. La cytométrie en flux

2.7.1. Phénotype des CSM-MO

Afin de caractériser les CSM-MO obtenues à partir du fémur de rat, un phénotypage par cytométrie de flux a été réalisé. Lors du premier passage, des aliquots de $2 \cdot 10^5$ cellules sont constitués et lavés deux fois avec du PBS 1X. Les aliquots sont ensuite incubés 20 min à + 4°C avec les anticorps suivants : anti-IgG1-FITC, anti-IgG2a-PE, anti-CD44-FITC, anti-CD45-FITC, anti-CD90-PE, anti-CD73-alexa647 (tous provenant de BD Pharmigen, Le Pont de Claix, France), et anti-CD34-PE (Santa Cruz Biotechnologies). A la fin de l'incubation les cellules sont passées au FACS Canto II (BDIS, Le Pont de Claix, France) avec acquisition d'au moins 10 000 événements par condition.

2.7.2. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est analysé par incorporation d'iodure de propidium (IP) dans le noyau des cellules. L'IP est un agent fluorescent lorsqu'il s'intercale entre les brins d'ADN. La fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'ADN, cette incorporation permet alors de

distinguer les différentes phases du cycle cellulaire où en G0/G1 la quantité de fluorescence équivaut à la moitié de celle en G2/M (phase post-réplication de l'ADN). Deux modèles de contamination sont utilisés comme déjà décrit. Dans le premier les cellules sont contaminées pendant 7 jours après avoir atteint la confluence puis sont lavées, trypsinées, comptées et ensemencées dans des flasks 25 cm² à une concentration de 5000 cellules.cm⁻². Dans le deuxième modèle, les cellules sont lavées, trypsinées, comptées et ensemencées dans des flasks 25 cm² à une concentration de 5000 cellules.cm⁻² dans du milieu de culture contaminé à 1 ou 10 kBq.mL⁻¹. La cinétique pour ces deux modèles est la même, le passage au cytomètre se fait 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 7 jours après mise en culture.

Au temps souhaité, les cellules sont lavées, incubées 5 min en présence de trypsine-EDTA à 37°C et comptées sur lame de Malassez. 3.10⁵ cellules par condition sont fixées dans de l'éthanol 70 % pendant 1 h minimum à -20°C. A la fin d l'étape de fixation, les cellules sont centrifugées 8 min à 400 g et le culot est resuspendu dans 300 µL d'une solution de citrate de sodium contenant 0,2 % de triton X-100, 100 µg.mL⁻¹ de RNase et 50 µg.mL⁻¹ d'IP (Sigma) et incubé 30 min à 37°C à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite analysées au FACS Canto II (BDIS) avec acquisition d'au moins 10 000 événements par condition.

2.7.3. Evaluation du stress oxydant

La production intracellulaire précoce d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été mesurée par clivage spécifique de la sonde 2'-7'-dichlorofluoresceine diacétate (H₂DCFDA). En effet, cette sonde est clivée en présence de ERO, le produit de clivage étant fluorescent, la fluorescence émise sera proportionnelle à la quantité de ERO présente (Royall & Ischiropoulos 1993). Une fois les MS5 arrivées à confluence, celles-ci sont lavées au PBS 1X, trypsinées, comptées sur lame de Malassez et centrifugées 8 min à 400 g. Le culot est ensuite repris dans du milieu de culture afin d'obtenir une concentration cellulaire de 2.10⁶ cellules.mL⁻¹. La suspension est incubée avec 20 µM de sonde H₂DCFDA pendant 30 min à 37°C à l'abri de la lumière afin de charger les cellules avec la sonde. Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation et le culot est remis en suspension avec du milieu de culture contenant du ⁹⁰Sr à la concentration finale de 1 ou 10 kBq.mL⁻¹. Afin de montrer que les MS5 sont capables de produire des ERO, un témoin positif a été utilisé, il consiste en un traitement des cellules par un puissant inducteur de ERO, le ter-Butyl hydroperoxyde (tBHP) à une concentration finale de 300 µM. Les cellules sont passées au FACS Canto II après 15, 30, 45 et 60 min d'exposition et la fluorescence verte du DCF a été mesurée en utilisant la longueur d'onde du canal FL1-H, avec acquisition d'au moins 10 000 événements par temps et par condition. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (MFI).

2.8. Tests fonctionnels

2.8.1. Test de clonogénicité : les CFU-F

Les cellules stromales ont la capacité de former des colonies (CFU-F) lorsqu'elles sont mises en culture (Castro-Malaspina *et al.* 1980). Ce test permet de mettre en évidence la prolifération cellulaire. Pour ce faire deux modèles de contamination ont été utilisés afin de mettre en évidence si les cellules sont plus sensibles au ^{90}Sr lorsqu'elles sont en phase de prolifération ou lorsqu'elles sont en phase de confluence.

Dans le premier modèle, les cellules sont contaminées pendant 7 jours après qu'elles sont arrivées au stade de confluence. Au bout de 7 jours, les cellules sont lavées avec du PBS 1X, incubées 5 min à 37°C en présence de trypsine-EDTA, comptées sur lame de Malassez et ensemencées dans des flasks 25 cm² à faible concentration dans du milieu frais non contaminé (20, 50, 100 et 200 cellules par flask) en triplicat. Les cellules sont incubées 12 jours à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X et fixées 5 min avec du méthanol puis sont incubées successivement 5 min avec une solution de May-Grünwald puis avec une solution de Giemsa diluée au 1/7^{ème} dans du PBS 1X et filtrée. Enfin les cellules sont rincées avec de l'eau courante jusqu'à obtention d'une eau claire. Seules les colonies contenant au moins 50 cellules sont comptabilisées.

Dans le deuxième modèle, les cellules arrivées à confluence sont repiquées selon la même méthode que ci-dessus et ensemencées dans des flasks 25 cm² à faible concentration, en triplicat, dans du milieu de culture contenant 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ^{90}Sr . Les cellules sont incubées 12 jours à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂ en présence de ^{90}Sr . A la fin de l'incubation les cellules sont colorées au May-Grünwald Giemsa et les colonies sont comptées.

2.8.2. La co-culture

2.8.2.1. Différenciation clonale en méthylcellulose

Pour démontrer une influence éventuelle modification des cytokines secrétées par les MS5 en réponse à la contamination, un test de formation de colonies hématopoïétiques en milieu conditionné a été réalisée comme précédemment décrit (Bertho *et al.* 2010).

Les fémurs de souris Balb/c adultes saines ont été prélevés et flushés avec du MEM α , les cellules obtenues sont comptées sur lame de Malassez en acide acétique. Les cellules sont ensuite ensemencées à une concentration de 5.10⁴ cellules dans 1,1 mL de methylcellulose sans ajout de cytokines ou supplémentée en érythropoïétine (EPO) (Stem cell technologies, Vancouver,

Canada). La méthylcellulose utilisée a préalablement été supplémentée avec du surnageant provenant de MS5 contaminées pendant 7 jours avec 1 et 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr ou non. Afin de vérifier un éventuel effet direct du ⁹⁰Sr sur la prolifération des progéniteurs de moelle osseuse, un contrôle a été mis en place. Pour cela, du surnageant provenant de MS5 contrôle et supplémenté en ⁹⁰Sr à une concentration finale de 10 kBq.mL⁻¹ est ajouté à la méthylcellulose. Les cellules sont incubées 12 jours à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les colonies granulocytaires (CFU-G) et érythrocytaires (BFU-E) formés ont été quantifiés à la fin de l'incubation.

2.8.2.2. Long-term culture-initiating cells (LTC-IC)

Pour attester d'une éventuelle modification des molécules d'adhésion exprimées à la surface des MS5 en réponse à la contamination, une expérience de Long Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC) a été entreprise. Les MS5 sont ici utilisées comme support de la lignée hématopoïétique.

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à une concentration de 5000 cellules.cm⁻². Une fois arrivées à confluence, les cellules sont contaminées avec du ⁹⁰Sr 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ pendant 7 jours. Les cellules de moelle obtenues par flush de fémurs de souris sont enrichies en progéniteurs hématopoïétiques. L'enrichissement se fait par déplétion de cellules exprimant les marqueurs Lineage (Lin). Pour cela, un cocktail d'anticorps couplés à des billes magnétiques permettant de séparer les cellules Lin⁻ (progéniteurs) des cellules Lin⁺ (cellules matures) a été utilisé en suivant le protocole fourni (Miltenyi Biotec, Paris, France). Le contrôle par cytométrie en flux de la population cellulaire obtenue a montré une population composée à 90 ± 7,2 % de cellules Lin⁻. Avant la mise en culture des progéniteurs, le stroma de MS5 est lavé deux fois avec du PBS 1X afin d'éliminer au maximum le ⁹⁰Sr, puis les plaques sontensemencées en dilution limite avec 5000, 2500, 1250, 625 et 312 cellules Lin⁻ par puits dans du milieu de culture à long terme (Myelocult, Stem cell technologies). Le changement du milieu est effectué de façon hebdomadaire pendant 5 semaines par demi-déplétion. A chaque fois, uniquement la moitié du milieu est remplacé par du milieu frais afin de ne pas perturber les contacts cellulaires dans le fond des puits. Après 5 semaines, chaque puits est trypsiné et remis en culture dans de la méthylcellulose complète contenant IL-3, IL-6, SCF et de l'EPO en concentrations optimales (Methocult M3434, Stem cell Technologies). Les cellules sont maintenues à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂ pendant 12 jours. A la fin de l'incubation, le nombre de puits contenant au moins une colonie (considéré comme « puits positif ») a été quantifié. La fréquence de LTC-IC a été déterminée par régression linéaire entre le nombre de cellules Lin⁻ initialementensemencées dans chaque puits et la fréquence de puits négatifs pour chaque condition testée.

2.9. Analyses statistiques

Toutes les expérimentations pour le modèle *in vitro* ont été réalisées au moins trois fois (n=3), chaque condition étant réalisée en triplicat. Les observations en microscopie ont été réalisées en aveugle. Pour le modèle *in vivo* le nombre de souris utilisées par groupe et par temps est de 10 (n=10). Tous les résultats obtenus sont présentés comme moyenne \pm SEM à moins d'indication contraire. La distribution normale des données a été vérifiée et les comparaisons entre les groupes ont été effectuées par Student's *t*-test ou par ANOVA à 1 ou 2 paramètres. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel d'analyse Sigmaplot (v 11.0, Systat, Paris, France).

RESULTATS

1. Résultats *in vitro*

1.1. Calcul de la dose cumulée à la cellule

Les calculs de la dose cumulée à la cellule ont été réalisés par Aurélie Desbrée du laboratoire d'étude de la dose interne (LEDI, IRSN). Les calculs sont établis sur la base d'une modélisation simplifiée de cellules en culture fixées sur un support et surmontées d'une hauteur de milieu de 1 cm contenant le ^{90}Sr dispersé de façon homogène. Dans ces conditions, pour la concentration de ^{90}Sr de 10 kBq.mL^{-1} le débit de dose à la cellule est de $0,27 \text{ mGy.h}^{-1}$ soit $6,5 \text{ mGy.jour}^{-1}$.

1.2. Cassures double brin de l'ADN

Les dommages à l'ADN font partie des mécanismes d'action précoces des rayonnements ionisants. En se basant sur de précédentes études de cinétique d'apparition de cassures double brin (CDB) après irradiation externe, la recherche de CDB après contamination par le ^{90}Sr sur une culture primaire de CSM de rat (CSM-MO) et sur la lignée MS5 a été réalisée grâce à l'immunomarquage des foci $\gamma\text{-H2AX}$ (Rogakou *et al.* 1998) (**Figure 35**). Le phénomène d'apparition de CDB est un processus physiologique au cours de la phase de réplication, toutes les expériences ont donc été menées après que les cellules eurent atteint la confluence, ceci afin d'éviter d'éventuels artefacts.

Tout d'abord, concernant les CSM-MO de rat, afin de s'assurer que les cellules obtenues aient bien un phénotype de cellule stromale médullaire, des analyses par cytométrie en flux ont été réalisées. Les résultats de cytométrie ont mis en évidence que ces cellules expriment à $82,2 \pm 9,2$ % les marqueurs $\text{CD73}^+\text{CD90}^+$ et à $79,6 \pm 10,4$ % le marqueur CD29^+ , elles ont donc bien un phénotype de type cellule stromale médullaire. Cependant une hétérogénéité dans la population obtenue peut être notée. Les résultats obtenus sur ces cellules montrent une augmentation de la fréquence de foci $\gamma\text{-H2AX}$ par noyau dès 30 min de contamination par le ^{90}Sr à 10 kBq.mL^{-1} mais pas avec la concentration de 1 kBq.mL^{-1} (**Figure 36**, $5,98 \pm 1,17$ foci par noyau dans les cellules contrôle et $13,82 \pm 2,49$ foci par noyau pour 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr , t-test $p < 0,05$). Un retour à un niveau basal des foci est observé dès 24 h. Cependant, le taux basal de foci dans les CSM-MO est élevé, ceci étant probablement dû à l'hétérogénéité des phases du cycle cellulaire dans lesquelles se trouvent les cellules malgré l'utilisation de cultures confluentes. En effet, afin de discriminer les cellules en prolifération, un double marquage au $\gamma\text{-H2AX}$ et Ki67 (marqueur des cellules en prolifération) a été réalisé. Les résultats obtenus ont démontré un marquage Ki67 important malgré la condition de confluence, ceci attestant de la prolifération des cellules. Pour la suite de ce travail, seule la lignée MS5 a donc été utilisée.

Concernant la lignée MS5, le profil d'apparition des foci γ -H2AX est analogue à celui des CSM-MO. Une augmentation significative de la fréquence de foci γ -H2AX par noyau dès 30 min d'exposition à la plus forte concentration de ^{90}Sr est observée (**Figure 37**, $3,69 \pm 0,29$ pour les cellules contrôle et $5,84 \pm 0,38$ pour la condition 10 kBq.mL^{-1} , One-way ANOVA $p < 0,001$). Par ailleurs, comme déjà décrit précédemment, aucune modification n'est mise en évidence pour la concentration de 1 kBq.mL^{-1} et dès 24 h, une diminution du nombre de foci par noyau qui revient à un niveau basal est mise en évidence. De 24 h à 7 jours d'exposition, aucune modification dans le niveau de foci par noyau n'est observée entre les groupes. Cependant une diminution du niveau basal de foci est montrée pour tous les groupes par rapport aux temps plus précoces, ceci suggère que malgré la confluence, les cellules progressent dans le cycle cellulaire.

Ces résultats indiquent que le ^{90}Sr à faible concentration est capable de rapidement former des CDB mais qu'en retour la cellule serait aussi capable d'activer ses mécanismes de réparation pour pallier ces effets.

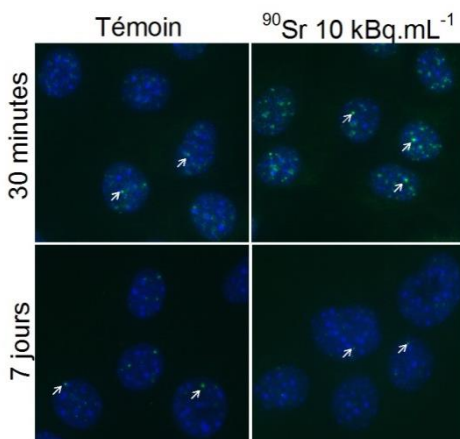


Figure 35: Image représentative de l'immunomarquage des foci γ -H2AX

Les foci γ -H2AX sont marqués dans les cellules MS5 Contrôle (images à gauche) et contaminées avec 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr (images de droite). Le marquage a été réalisé après 30 minutes de contamination (images du haut) ou 7 jours (images du bas). Les foci sont marqués en vert (FITC) et indiqués par les flèches blanches, les noyaux sont bleus (DAPI).

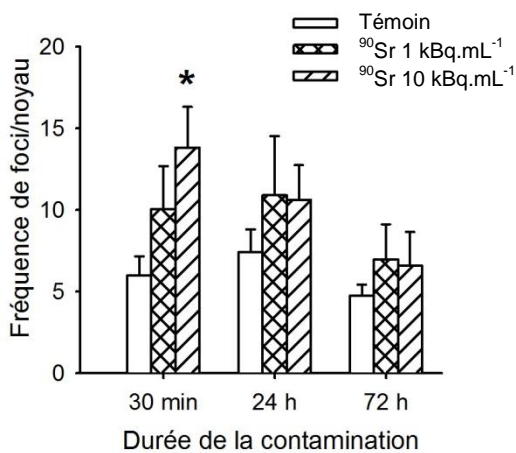


Figure 36: Quantification des foci γ -H2AX dans les CSM-MO de rat

Les foci γ -H2AX dans les CSM-MO de rat ont été quantifiés après 30 minutes, 24 h et 72 h de contamination par le ^{90}Sr . Une augmentation significative du nombre de foci par noyau est observée pour les cellules contaminées par 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr dès 30 minutes d'exposition (t-test, $*p < 0,05$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM.

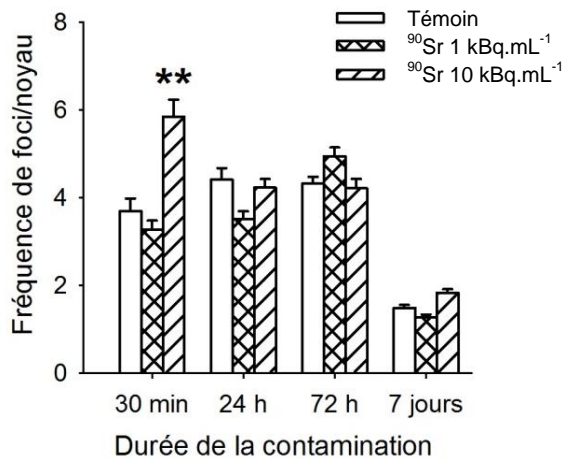


Figure 37: Quantification des foci γ -H2AX dans les MS5

Les foci γ -H2AX dans la lignée MS5 ont été quantifiés après 30 min, 24 h, 72 h et 7 jours de contamination par le ^{90}Sr . Une augmentation significative du nombre de foci par noyau est observée dès 30 min de contamination par 10 kBq.mL $^{-1}$ de ^{90}Sr (One-way ANOVA $^{**}p < 0,01$). Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM.

1.3. La réparation de l'ADN

Afin de mettre en évidence la réponse de la cellule en réaction à l'apparition des CDB, les protéines impliquées dans les deux voies de la réparation de l'ADN (NHEJ et HR) ont été analysées par western blot. Les protéines choisies pour la voie NHEJ sont Ku70 et Mre11, pour la voie HR, Rad51 a été utilisée.

L'expression de ces protéines a été mesurée en suivant la cinétique précédemment utilisée pour l'étude des CDB. Les western blots ont donc été réalisés sur des extraits protéiques obtenus après 1 h, 24 h, 72 h et 7 jours de contamination. Les résultats montrent tout d'abord que les protéines Ku70 et Mre11 sont exprimées dans les cellules contrôle non exposées et que leur niveau reste stable tout au long de la période de culture. Seule une modification de Rad51 est observée, en effet, il n'est pas exprimé dans les cellules contrôle à 1 h mais est exprimé dans les cellules contaminées à 10 kBq.mL $^{-1}$ (**Figure 38**). Dès 24 h cependant, le niveau d'expression de Rad51 est équivalent à celui du groupe contrôle.

La diminution du niveau basal de foci par noyau observée entre 24 h et 7 jours, suggère une progression des cellules dans le cycle cellulaire, provoquant l'activation physiologique des mécanismes de réparation. De plus, les cellules ne sont pas toutes synchronisées au même stade du cycle cellulaire, ceci permettant d'expliquer l'absence d'une voie de réparation majoritairement mise en jeu.

Ces résultats suggèrent que la réparation cellulaire implique à la fois la voie NHEJ et HR et que le niveau basal de Ku70, Mre11 et Rad51 est suffisant pour induire la réparation des CDB induites par le ^{90}Sr .

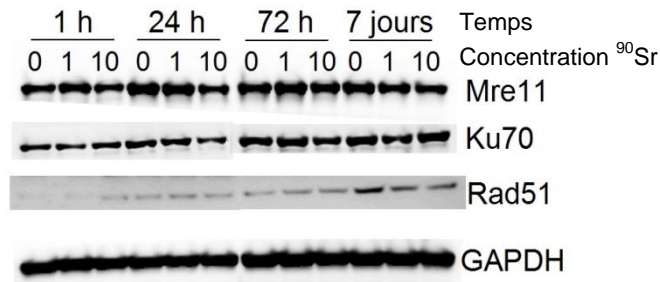


Figure 38: Les protéines de la réparation de l'ADN

Le niveau d'expression des protéines de la réparation cellulaire, Ku70, Mre11 et Rad51, a été mesuré par western blot après 1 h, 24 h, 72 h et 7 jours dans les cellules contrôle (0) ou contaminées avec 1 kBq.mL⁻¹ (1) ou 10 kBq.mL⁻¹ (10) de ⁹⁰Sr. La GAPDH est utilisée comme témoin de charge.

1.4. Le stress oxydant

La production de ERO est un autre mécanisme induit par les RI et peut expliquer la formation des CDB.

La capacité du ⁹⁰Sr à induire des ERO a initialement été étudiée par cytométrie en flux en utilisant la sonde H₂DCFDA qui émet de la fluorescence lorsqu'elle est clivée en présence de ERO. Cette méthode permet de démontrer une induction précoce de la formation de ERO, en effet la sonde n'est stable dans la cellule que quelques heures. Les passages au cytomètre ont été réalisés après 15, 30, 45 et 60 min d'exposition au ⁹⁰Sr. L'utilisation d'un témoin positif (300 μM de terbutyl hydroperoxyde, tBHP) montre une production de ERO progressive par les MS5 avec un pic obtenu après 45 min de traitement et pour lequel environ 50 % des cellules produisent des ERO. Au contraire, aucune modification du niveau d'espèces réactives n'est observée après contamination par le ⁹⁰Sr pour toutes les concentrations et pour tous les temps (**Figure 39**).

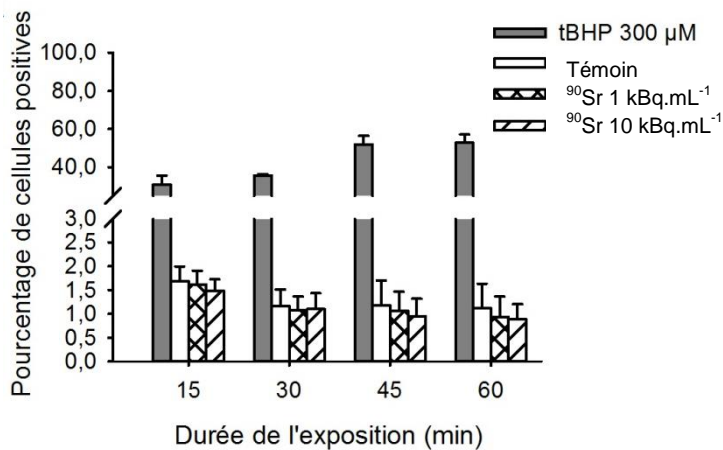


Figure 39: Production de ERO par les MS5

Pourcentage de MS5 exprimant des ERO après 15, 30, 45 et 60 min de traitement au tBHP (barres grises) ou de contamination par le ⁹⁰Sr. Les résultats sont présentés comme moyenne ± SEM.

Afin de montrer une production plus tardive de ERO en réponse à la contamination, l'étude de l'expression génique des principales enzymes impliquées dans la défense antioxydante a été réalisée par RT-qPCR après 1 h, 24 h, 72 h et 7 jours d'exposition au ^{90}Sr . Le niveau d'expression de la Catalase (*Cat*), Manganèse Superoxyde dismutase (*MnSOD*), Glutathion S-Transférase (*Gst*), Glutathion Peroxydase (*Gpx*) et Glutathion reductase (*Gsr*) n'est pas modifié quelle que soit la concentration de ^{90}Sr ou le temps d'exposition. Seuls les résultats pour les enzymes antioxydantes après 1 h et 7 jours de contamination sont représentés (**Figure 40**). Cependant, l'activité enzymatique de chacune de ces enzymes n'a pas été mesurée.

Ces résultats indiquent qu'aux concentrations utilisées au cours de cette étude, le ^{90}Sr ne permet pas d'induire une augmentation du niveau de stress oxydant dans la cellule, laissant supposer que les ERO ne sont pas la cause de l'apparition des CDB.

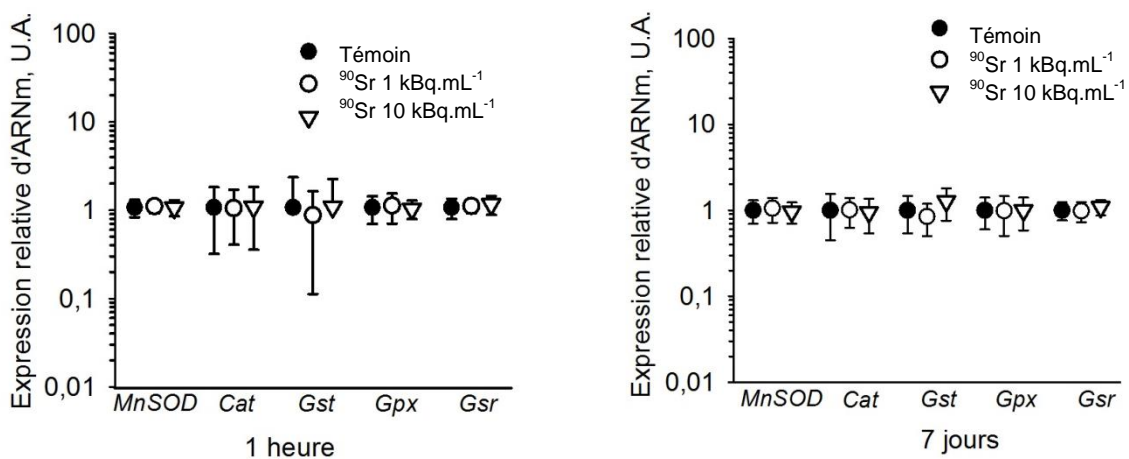


Figure 40: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes dans les MS5

Expression relative des ARNm des enzymes impliquées dans la défense antioxydante (*Cat*, *Gpx*, *Gsr*, *Gst*, *MnSOD*) après 1 h et 7 jours de contamination au ^{90}Sr à 1 ou 10 kBq.mL⁻¹. Aucune modification significative du niveau d'expression de ces marqueurs n'est observée quel que soit le temps ou la concentration de ^{90}Sr à laquelle les ont été exposées. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et représentés comme moyenne \pm SD.

1.5. La sénescence cellulaire

1.5.1. L'axe p53

L'une des réponses cellulaires des CDB provoquées par les RI est l'induction de la sénescence, caractérisée par l'activation de la voie de signalisation p53.

Tout d'abord, l'expression génique de *p21* et de *p53* a été analysée par RT-qPCR au bout de 7 jours de contamination. Une augmentation significative de l'expression de *p21* a été mise en évidence dans les cellules contaminées à la concentration de 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr (**Figure 41**, 1,65 ± 0,13 d'augmentation d'expression par rapport au contrôle, One-way ANOVA, p<0,05). Seule une légère augmentation est observée pour l'expression de *p53*, mais elle n'est pas significative.

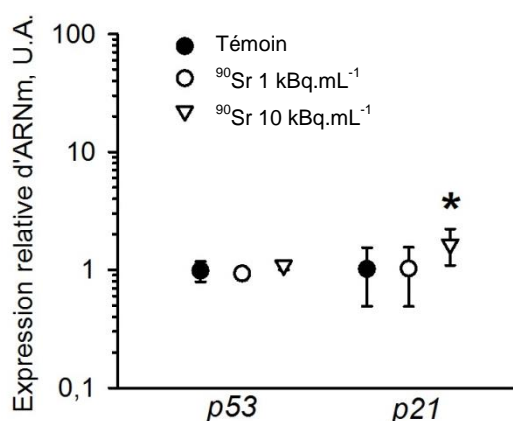


Figure 41: Niveau d'expression génique de *p53* et *p21* dans les MS5

Expression relative des ARNm *p53* et *p21* après 7 jours de contamination à 1 et 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr. Une augmentation significative de l'expression de *p21* est observée dans le groupe de contamination 10 kBq.mL⁻¹ (One-way ANOVA, *p<0,05). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés comme moyenne ± SD.

Afin de confirmer ces résultats, l'expression protéique de p21 a également été mesurée par western blot (**Figure 42**) et immunomarquage (**Figure 43**). Comme pour l'expression génique, une augmentation du niveau protéique de p21 a été observée dans le groupe de contamination à 10 kBq.mL⁻¹ par western blot. De même, la quantification des cellules p21 positives en immunomarquage a permis de démontrer une augmentation significative du nombre de cellules exprimant p21 lorsque celles-ci sont contaminées avec la plus forte concentration de ⁹⁰Sr (**Figure 45**, 10,2 ± 2,7 % de cellules marquées pour le groupe contaminé à 10 kBq.mL⁻¹ vs. 4,5 ± 0,01 % pour le groupe contrôle, t-test, p<0,05).

Ces résultats indiquent qu'à la plus forte concentration, le ⁹⁰Sr est capable d'induire une augmentation de l'expression génique et protéique de p21, suggérant une induction de la sénescence cellulaire après 7 jours d'exposition en réponse à l'apparition des CDB.

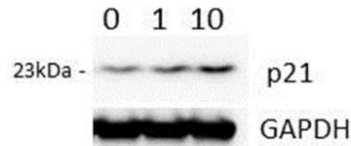


Figure 42: Expression protéique de p21 dans les MS5

Western blot représentatif de la protéine p21 après 7 jours dans les cellules contrôle (0) ou contaminées au ⁹⁰Sr à 1 kBq.mL⁻¹ (1) ou 10 kBq.mL⁻¹ (10). Une augmentation du niveau d'expression est observée dans les cellules contaminées aux deux concentrations de ⁹⁰Sr par rapport à la condition contrôle. La GAPDH est utilisée comme témoin de charge.

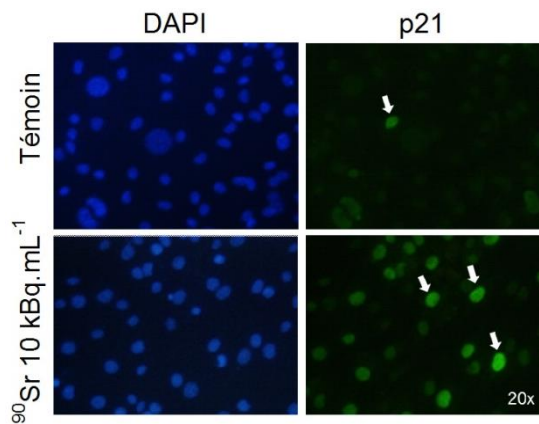


Figure 43: Image représentative de l'immunomarquage p21

Image représentative de l'immunomarquage p21 au grossissement 20x dans les cellules contrôle (partie supérieure) et après 7 jours de contamination à 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr (partie inférieure). Les cellules marquées par p21 apparaissent en vert (FITC) et sont indiquées par des flèches blanches, les noyaux apparaissent en bleu (DAPI).

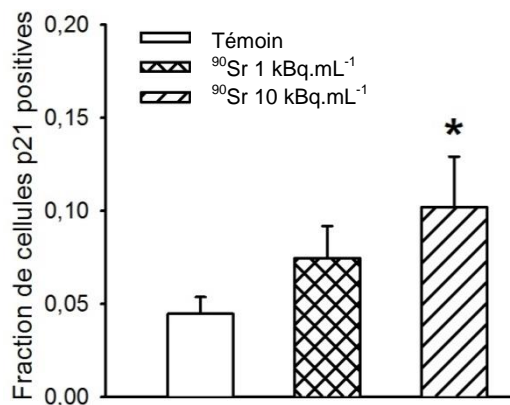


Figure 44: Quantification des MS5 p21 positives

Quantification du nombre de cellules p21 positives après 7 jours de contamination par 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Les différences significatives sont indiquées par *p<0,05 (t-test).

1.5.2. L'activité SA- β galactosidase

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'étude de p21, l'activité SA- β galactosidase, un autre marqueur de la sénescence cellulaire, a été évaluée par la réaction enzymatique en présence du substrat après 7 jours de contamination au ^{90}Sr .

La coloration obtenue n'a pas permis d'aboutir à des résultats quantitatifs exploitables, en effet, la plupart des cellules en culture présentent une coloration bleue dans le cytoplasme et ce, même pour la condition contrôle. Cependant, l'observation des MS5 au microscope optique a permis de mettre en évidence que les cellules sénescents présentent un noyau et un cytoplasme large. De plus, la coloration bleue témoin de l'activité SA- β Galactosidase y est très intense et de nombreuses vacuoles cytoplasmiques, signe de l'activation des lysosomes sont visibles (**Figure 45**).

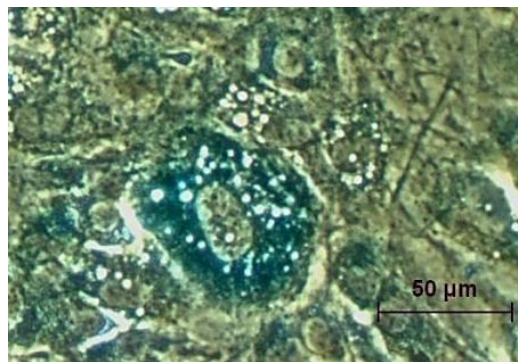


Figure 45: Activité SA- β galactosidase

Image représentative de la morphologie des MS5 sénescents, grossissement x20. Les cellules SA- β galactosidase positives présentent une coloration cytoplasmique bleue.

1.5.3. La prolifération cellulaire

La senescence est caractérisée par un arrêt stable de la cellule dans sa progression dans le cycle cellulaire. La capacité de prolifération des MS5 en réponse à la contamination a donc été testée. La lignée MS5 étant une lignée adhérente, elle possède la capacité à former des colonies, un test de formation de CFU-F a donc été réalisé (Castro-Malaspina *et al.* 1980) (**Figure 46**).

Pour ce test, la contamination par le ^{90}Sr a été faite après que les cellules aient atteint le stade de confluence ou alors lorsqu'elles étaient en prolifération. Les résultats obtenus démontrent que dans les deux conditions, le nombre de CFU-F formées est significativement diminué chez les MS5 contaminées avec 1 ou 10 $\text{kBq}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Two-way ANOVA, $p < 0,001$). Cet effet est plus

marqué avec la plus forte concentration (**Figure 47**). Cependant l'étude de la taille des colonies formées n'a pas été effectuée.

Ces résultats permettent de mettre en évidence une diminution de la prolifération cellulaire en réponse à la contamination au ^{90}Sr .



Figure 46: Coloration des CFU-F au May-Grünwald Giemsa

Image représentative d'une flasque 25 cm² colorée au May-Grünwald Giemsa. Les CFU-F sont colorées en violet et sont identifiées par les cercles bleus.

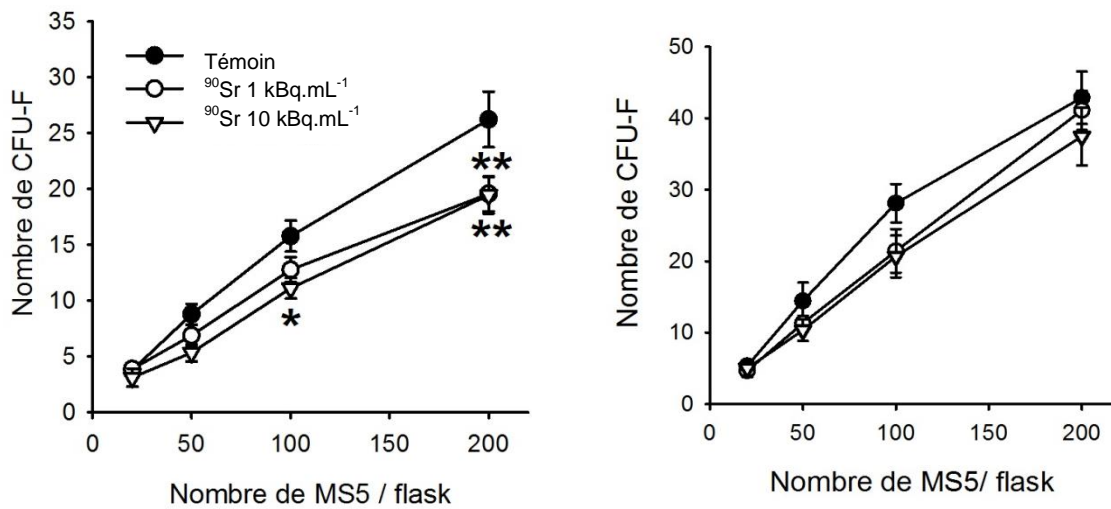


Figure 47: Prolifération des MS5

Quantification du nombre de CFU-F par flasque dans le groupe contrôle et contaminés par 1 kBq.mL⁻¹ ou 10 kBq.mL⁻¹ de ^{90}Sr . La contamination a été faite après le stade de confluence (image de gauche) ou lors de la phase de prolifération (image de droite). Les résultats sont représentés comme moyenne \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA).

1.5.4. L'arrêt dans le cycle cellulaire

Les différentes phases du cycle cellulaire ont été analysées afin de confirmer les résultats concernant la prolifération cellulaire. En réponse à la contamination, la mesure du pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M a été réalisée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium (IP) (**Figure 48**). Cette étude a été menée dans les deux conditions de contamination déjà mentionnées, une fois la confluence atteinte ou au cours de la prolifération. Les passages au cytomètre ont été réalisés 24 h, 48 h, 72 h, 96 h et 7 jours après le repiquage.

Contrairement aux CFU-F, aucune altération particulière du cycle cellulaire n'a été observée dans les deux conditions de contamination et quel que soit le temps d'analyse (**Figure 49**). Cependant, l'absence de modifications peut être dû à un manque de sensibilité de la technique utilisée. Par ailleurs, il est à noter que les cellules sont réparties dans les différentes phases du cycle cellulaire, ceci pouvant expliquer la difficulté à mettre en évidence un arrêt dans une phase spécifique.

Ces résultats suggèrent donc que malgré la contamination et une diminution de la prolifération des MS5, les concentrations de ^{90}Sr utilisées ne permettent pas un arrêt significatif dans le cycle cellulaire.

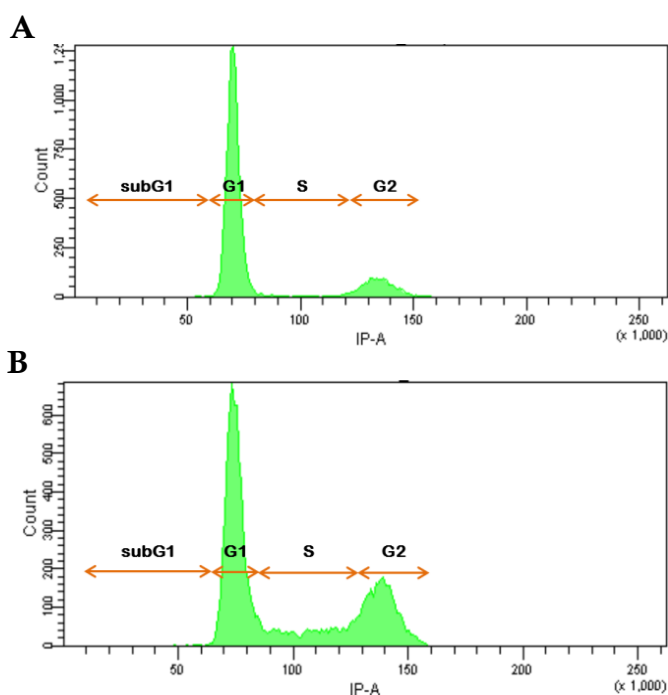


Figure 48: Stades du cycle cellulaire par cytométrie de flux

Profil cellulaire obtenu par cytométrie de flux après incorporation d'iodure de propidium lorsque les cellules sont au stade de confluence (A) ou lorsqu'elles sont en phase de prolifération (B). Les différentes phases sont délimitées par les flèches oranges.

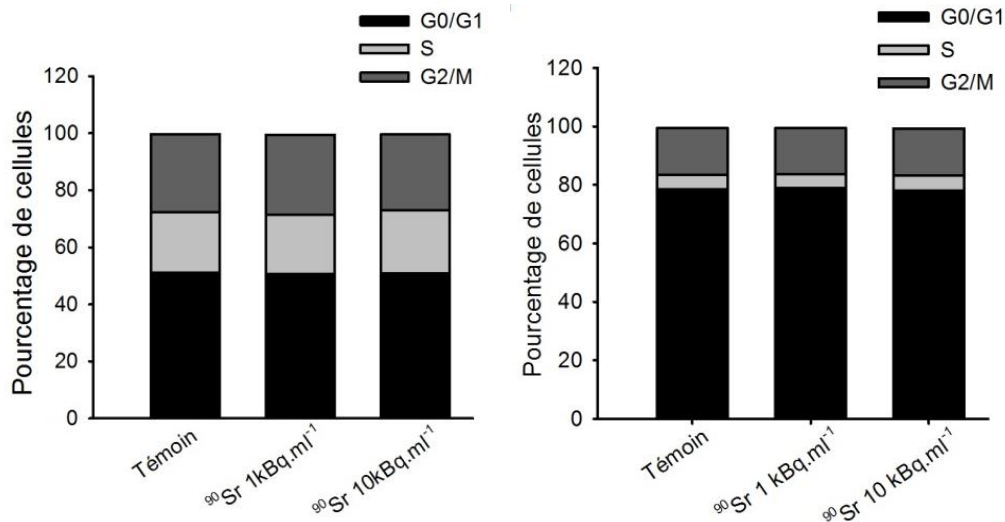


Figure 49: Répartition des MS5 dans les phases du cycle cellulaire

Quantification des stades du cycle cellulaire 24 h (image de gauche) et 7 jours (image de droite) après le repiquage. Ici la contamination a été effectuée après que les cellules aient atteint la confluence. Les résultats sont représentés en moyenne du pourcentage de cellules dans chacun des stades G0/G1, S et G2/M.

1.6. La mortalité

La mort cellulaire fait également partie des mécanismes induits par les RI. Pour démontrer une éventuelle augmentation de la mortalité en réponse à la contamination pouvant expliquer la diminution de la prolifération cellulaire, plusieurs tests ont été effectués. La mortalité des MS5 a été évaluée par dosage de la LDH extracellulaire permettant d'estimer la cytotoxicité du ⁹⁰Sr, ou par cytométrie en flux après incorporation d'IP en mesurant le pourcentage de cellules en phase subG1 du cycle cellulaire, spécifique de l'apoptose.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence que ce soit dans le taux de LDH extracellulaire, ou dans le pourcentage de cellules en phase subG1 pour chacune des concentrations de ⁹⁰Sr et pour chaque temps d'analyse (**Figures 50 et 51**).

Le ⁹⁰Sr utilisé aux concentrations de 1 et 10 kBq.ml⁻¹ ne semble pas contribuer à l'augmentation de la mortalité cellulaire qui pourrait expliquer la diminution de prolifération précédemment observée.

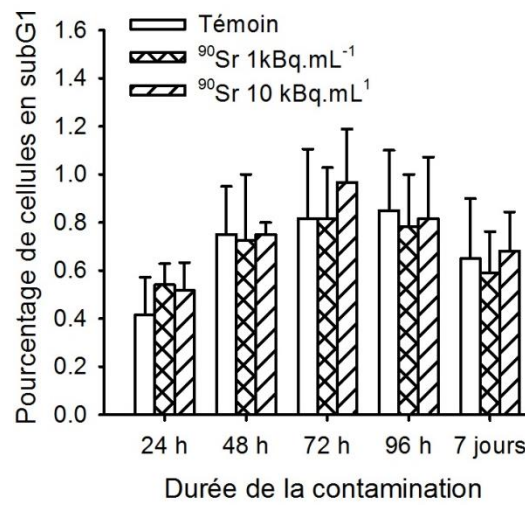


Figure 50: Fraction cellulaire en apoptose

Quantification du pourcentage de cellules en phase subG1 du cycle cellulaire dans le groupe témoin ou contaminés entre 24 h et 7 jours avec 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr. Les résultats sont présentés comme moyenne ± SEM.

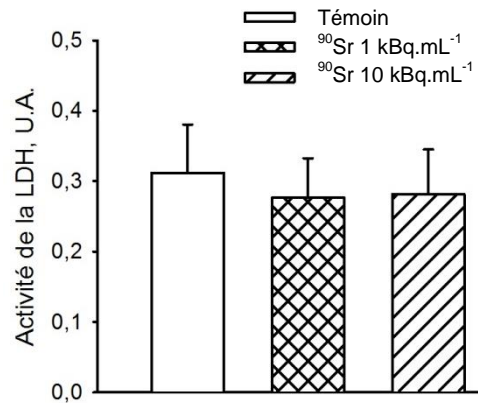


Figure 51: Cytotoxicité dans les MS5

Mesure de la LDH extracellulaire dans les surnageants témoin et après 7 jours de contamination à 1 et 10 kBq.mL⁻¹. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne ± SEM

1.7. La différenciation

La lignée MS5 utilisée au cours de ce travail appartient à la lignée mésenchymateuse stromale, cependant, elle présente un phénotype pré-adipocytaire. Cette caractéristique a été utilisée afin d'évaluer la capacité du ^{90}Sr à moduler la différenciation spontanée des MS5 en adipocytes.

Cette capacité a initialement été analysée grâce à la coloration des cellules par l'Oil Red O, un colorant spécifique des vacuoles lipidiques, marquant les cellules différenciées en adipocytes (**Figure 52**). Après 7 jours de contamination, une augmentation significative de la fréquence de cellules différenciées a été observée avec les concentrations de 1 et 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr par rapport aux cellules contrôle (**Figure 53**, $0,305 \pm 0,009$ et $0,304 \pm 0,019$ vs $0,213 \pm 0,011$ respectivement, One-way ANOVA $p < 0,001$). L'analyse plus détaillée des marqueurs de l'adipogénèse (*Lpl*, *Adipoq*, *Fabp4*) par RT-qPCR après 7 jours de contamination n'a pas montré de modification significative de leur expression entre les groupes (**Figure 54**). Ceci est très probablement dû au caractère pré-adipocytaire de la lignée MS5 qui présente au niveau basal un niveau d'expression élevé de ces marqueurs, masquant ainsi une éventuelle modulation.

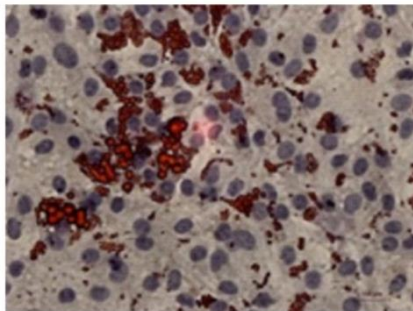


Figure 52: Image représentative de la différenciation adipocytaire

Image représentative de MS5 colorées à l'Oil red O. Les vacuoles lipidiques apparaissent en rouge alors que les noyaux sont contre-colorés en bleu.

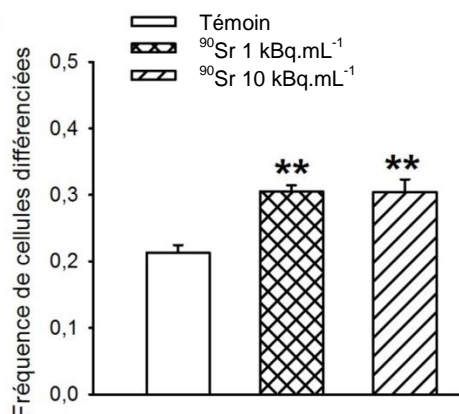


Figure 53: Quantification de la différenciation adipocytaire

Quantification de la fréquence de MS5 différenciées en adipocytes après 7 jours de contamination avec 1 ou 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr . Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par $**p < 0,001$ (One-way ANOVA).

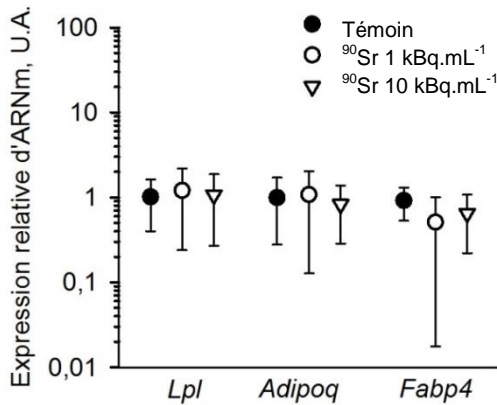


Figure 54: Niveau d'expression génique des marqueurs de l'adipogénèse

Expression relative des ARNm *Lpl*, *Adipoq* et *Fabp4* dans les MS5 après 7 jours de contamination dans les cellules témoin ou contaminées par 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés comme moyenne ± SD.

1.8. Fonction de soutien aux HSC

Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que le ⁹⁰Sr pourrait induire la sénescence cellulaire et entraîner des modifications dans la fonction cellulaire. En effet, une cellule sénescente est encore métaboliquement active bien qu'elle ne prolifère plus. La capacité des MS5 à soutenir la différenciation et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques a donc été évaluée. Le soutien de l'hématopoïèse constitue l'une des principales fonctions des cellules stromales mésenchymateuses. Par ailleurs les MS5 sont fréquemment utilisées comme stroma dans des expériences de co-culture avec des progéniteurs hématopoïétiques (Issaad *et al.* 1993; Sutherland *et al.* 1991). Leur fonctionnalité a donc été évaluée par une expérience de LTC-IC et une expérience de formation de CFC.

1.8.1. Les LTC-IC

Les conséquences de la contamination au ⁹⁰Sr sur la fonction de soutien des MS5 sur les progéniteurs hématopoïétiques a été analysée par une expérience de LTC-IC. Au cours de cette expérience, le stroma de MS5 est contaminé pendant 7 jours aux deux concentrations de ⁹⁰Sr puis est mis en présence de progéniteurs murins hématopoïétiques précoces Lin-Sca1⁺c-kit⁺. Les résultats obtenus démontrent que la fréquence de LTC-IC dans la condition contrôle est de 88,5 ± 55,6 pour 10⁵ cellules de moelle osseuse et que cette fréquence n'est pas significativement modifiée par l'exposition du stroma au ⁹⁰Sr à 1 ou 10 kBq.mL⁻¹ (**Figure 55**). De même, le nombre moyen de CFC par LTC-IC n'est pas significativement modifié malgré l'exposition du stroma de MS5 au ⁹⁰Sr (**Figure 56**).

Ces résultats indiquent que malgré la contamination, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques précoces ne sont pas altérées. Cela suggère que les molécules de contact entre les deux types cellulaires ne sont pas impactées par le ⁹⁰Sr.

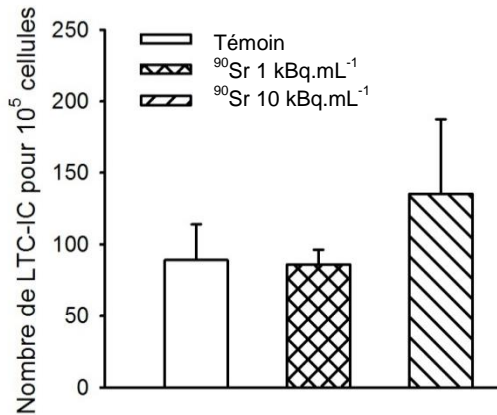


Figure 55: Nombre de LTC-IC formés

Fréquence moyenne de LTC-IC pour 10⁵ cellules de moelle osseuse. Aucune modification de la fréquence de LTC-IC en réponse à la contamination au ⁹⁰Sr n'est observée. Les résultats sont représentés comme moyenne ± SEM.

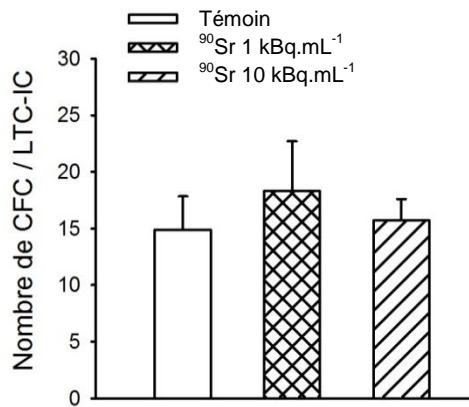


Figure 56: Nombre de CFC/LTC-IC

Nombre moyen de CFC par LTC-IC en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont représentés comme moyenne ± SEM.

1.8.2. Test de CFC

En regard des résultats obtenus avec les LTC-IC, une expérience de formation de CFC a été réalisée. Pour cela, des cellules médullaires murines totales sont mises en culture en présence de milieu conditionné provenant de MS5 contaminées pendant 7 jours. Ce milieu a été utilisé pour compléter un milieu de méthylcellulose. De plus, pour attester d'un éventuel effet direct du ⁹⁰Sr sur les progéniteurs de la moelle osseuse, du milieu de cellules contrôle a été complété avec 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr. Le comptage des CFC (CFU-G et BFU-E, **Figure 57**) a été évalué.

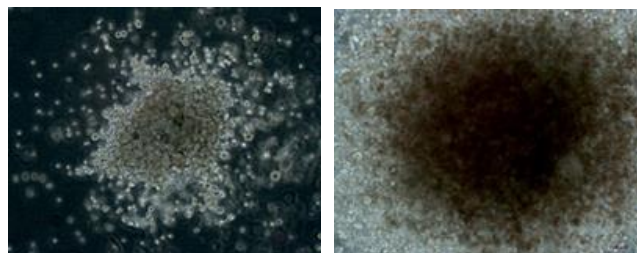


Figure 57: Les CFC

Images représentatives d'une CFU-G (à gauche) et d'une BFU-E (à droite).

Les résultats ont tout d'abord démontré une augmentation significative de la fréquence de CFU-G lorsque les cellules de moelle osseuse sont en présence de milieu conditionné de cellules contaminées avec du ^{90}Sr à 10 kBq.mL^{-1} par rapport au contrôle (**Figure 58**, respectivement $33,4 \pm 1,96$ CFU-G pour 2×10^4 cellules et $26,1 \pm 1,7$ CFU-G pour 2×10^4 cellules, One-way ANOVA, $p < 0,05$). Une augmentation similaire de la fréquence de CFU-G a été observée en présence de milieu conditionné supplémenté en érythropoïétine (EPO) (**Figure 58**, respectivement $33,3 \pm 2,2$ CFU-G pour 2×10^4 cellules et $25,5 \pm$ CFU-G pour 2×10^4 cellules, One-way ANOVA, $p < 0,001$). Aucune modification n'est observée avec le surnageant de cellules contaminées à 1 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr .

Concernant le nombre de BFU-E, celui-ci est augmenté en présence d'EPO. Cependant, aucune différence significative n'est mise en évidence, quel que soit le groupe de contamination.

En parallèle, lorsque les cellules sont en présence de surnageant contrôle supplémenté avec du ^{90}Sr à 10 kBq.mL^{-1} , aucune variation du nombre de CFU-G ou de BFU-E n'est visible (graphe non présenté). Ceci indique que l'effet précédemment observé est probablement dû à une modification dans les cytokines présentes dans le surnageant des cellules contaminées. Les cytokines impliquées semblent être spécifiques de la lignée granulocytaire plutôt que de la lignée érythrocytaire.

L'ensemble de ces résultats indique que la contamination au ^{90}Sr ne provoque pas de modifications au niveau des molécules de contact entre les MS5 et les progéniteurs Lin-. Cependant des modifications dans le profil de sécrétion de ces cellules pourraient jouer un rôle dans la modulation des CFC obtenues.

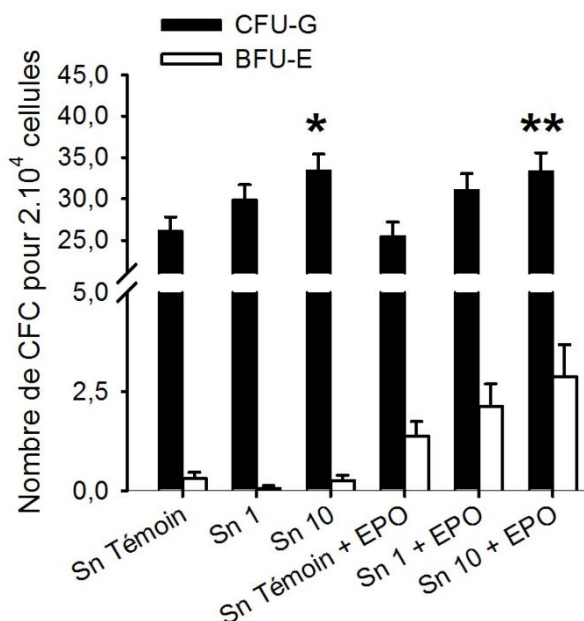


Figure 58: Nombre de CFU-G et BFU-E formés

Nombre de CFU-G (barres noires) et BFU-E (barres blanches) pour $2 \cdot 10^4$ cellules de moelle osseuse totale après 12 jours de culture en milieu conditionné de MS5 contaminées pendant 7 jours au ^{90}Sr . La partie de droite représente les cultures supplémentées en érythropoïétine (EPO). Les résultats sont présentés comme moyenne \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$ (One-way ANOVA).

Abréviations : Sn : Surnageant, 1 : 1 kBq.mL^{-1} , 10 : 10 kBq.mL^{-1}

1.9. Le profil de sécrétion

En se basant sur les précédents résultats, les cytokines majoritairement impliquées dans la différenciation et la prolifération de CFU-G ont été dosées par la méthode ELISA dans les surnageants de MS5 après 7 jours de contamination. Les cytokines dosées sont IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF et G-CSF. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans la concentration d'IL-6, SCF et G-CSF pour les deux concentrations de ^{90}Sr (**Figure 59**). Concernant les dosages de l'IL-3 et du GM-CSF, les valeurs obtenues sont en dessous de la limite de détection et ne sont pas exploitables.

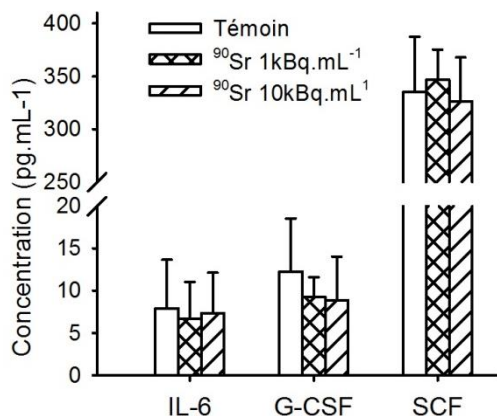


Figure 59: Dosage extracellulaire des cytokines impliquées dans la différenciation des CFU-G

Le dosage de l'IL-6, G-CSF et SCF a été réalisé dans les surnageants de cellules contaminées pendant 7 jours. Les résultats sont exprimés en pg.mL^{-1} et sont représentés en moyenne \pm SEM.

Afin de tester le plus largement possible l'ensemble des cytokines produites par les MS5, un cytokine array a été réalisé sur des extraits protéiques de MS5 contaminées pendant 72 h et 7 jours. Les résultats n'ont pas montré de différences dans le profil d'expression entre les différentes conditions pour les deux temps observés (**Figure 60**, expression à 7 jours). Les cytokines majoritairement présentes dans le cytoplasme des MS5 ont été identifiées comme étant IL-1ra, TIMP-1, M-CSF, MCP-1 et SDF-1. IL-1ra, TIMP-1, M-CSF et MCP-1 jouent un rôle dans le processus d'inflammation, alors que SDF-1 présente une fonction dans le maintien des CSH dans la niche et dans la régulation de leur différenciation. A défaut de pouvoir observer une différence dans le profil intracellulaire de ces cytokines malgré la contamination, leur concentration dans les surnageants de MS5 a été mesurée par la méthode ELISA après 72 h et 7 jours d'exposition au ^{90}Sr (**Figure 61**). Une augmentation significative de la concentration de TIMP-1 est mesurée dans les surnageants de cellules contaminées pendant 7 jours avec 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr (t-test $p < 0,05$). Une légère augmentation de la concentration de MCP-1 dans les surnageants de cellules contaminées à 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr est également observée. Au contraire, une tendance à la diminution du relargage de IL-1ra ainsi que de M-CSF est montrée après 7 jours de contamination à la plus forte concentration de ^{90}Sr . Aucune modification n'est observée pour la concentration de SDF-1 que ce soit après 72 h ou 7 jours de contamination.

Ces résultats suggèrent qu'après 7 jours de contamination à la plus forte concentration de ^{90}Sr , le profil de sécrétion des cellules semble être en faveur de la production de cytokines de type pro-inflammatoire telles que TIMP-1, au détriment de celles ayant un rôle anti-inflammatoire.

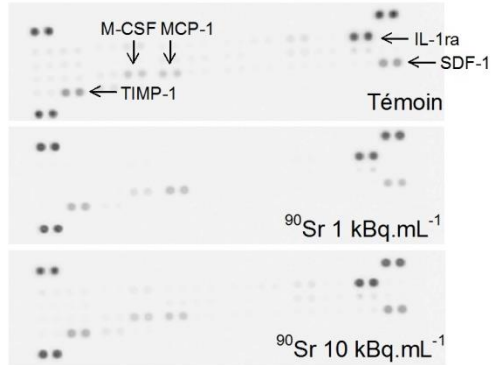


Figure 60: Profil de production protéique intracellulaire des MS5

Le profil de production intracellulaire de cytokines a été évalué après 7 jours de contamination par 1 et 10 kBq.mL^{-1} et dans les cellules contrôle. Aucune différence dans le profil de production n'est observée entre les différents groupes.

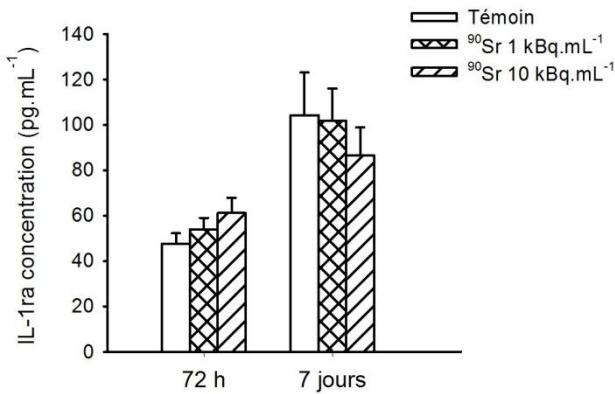
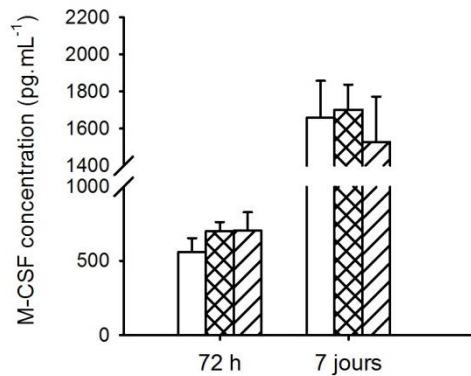
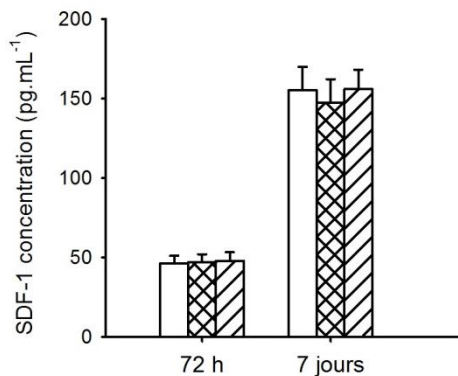
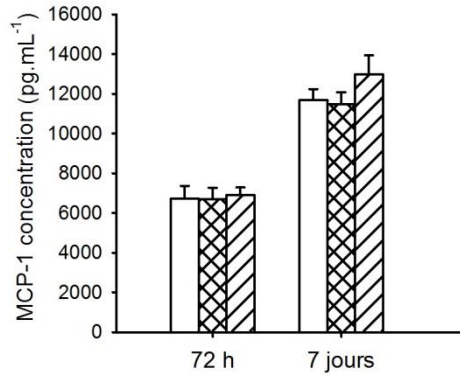
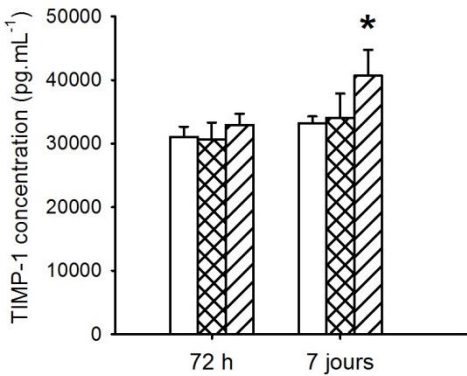


Figure 61: Dosage de cytokines extracellulaires

Dosages ELISA de IL-1ra, M-CSF, TIMP-1, MCP-1 et SDF-1 dans les surnageants de MS5 après 72 h et 7 jours de contamination par 1 et 10 kBq.mL^{-1} de ^{90}Sr . Les résultats sont exprimés en pg.mL^{-1} et sont représentés en moyenne \pm SEM. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ (t-test).



2. Résultats *in vivo*

2.1. Etat général des animaux

2.1.1. Les données de reproduction

2.1.1.1. Le nombre moyen de souriceaux par portée

Le suivi des naissances a été effectué pour l'expérimentation de dose-réponse. Au total, 80 groupes de reproduction constitués de 2 femelles et 1 mâle ont été utilisés (16 par groupe de contamination). Le nombre de portées par groupe varie entre 16 et 24, cependant le nombre moyen de souriceaux par portée n'est pas significativement modifié entre les groupes (One-way ANOVA, $p=0,474$) (**Figure 62**). La contamination par le ^{90}Sr n'influence pas le nombre d'animaux par portée.

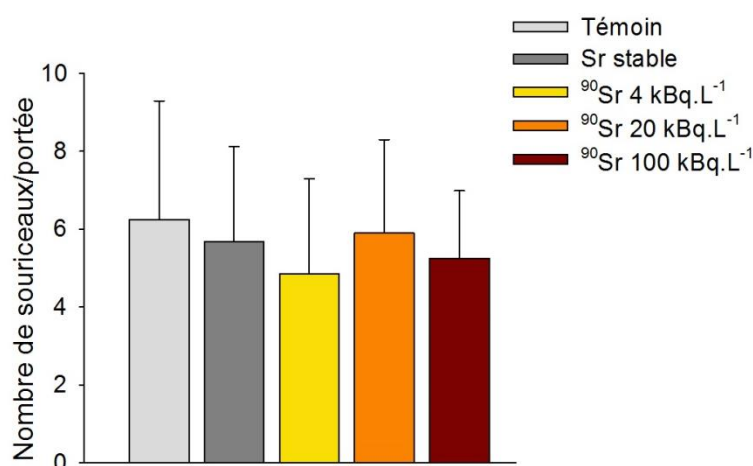


Figure 62: Suivi des naissances

Nombre moyen de souriceaux par portée dans chacun des groupes de contamination. Aucune modification significative du nombre de naissances en fonction des groupes n'est observée (One-way ANOVA, $p=0,474$). Les résultats sont représentés comme moyenne \pm SD.

2.1.1.2. Le sexe-ratio

Pour cette expérience de dose-réponse, seuls les mâles ont été utilisés afin d'éliminer un éventuel biais provoqué par les hormones sexuelles chez la femelle. En effet, ces hormones sont reconnues pour fortement influencer la régulation de la physiologie osseuse ainsi que la réponse immune. Le sexe ratio moyen pour l'ensemble de l'expérimentation est de $0,5 \pm 0,05$ et le sexe-ratio par portée n'est pas modifié entre les différents groupes, quelle que soit la concentration de ^{90}Sr ingérée par les parents (**Figure 63**, One-way ANOVA, $p=0,565$ pour les mâles et les femelles).

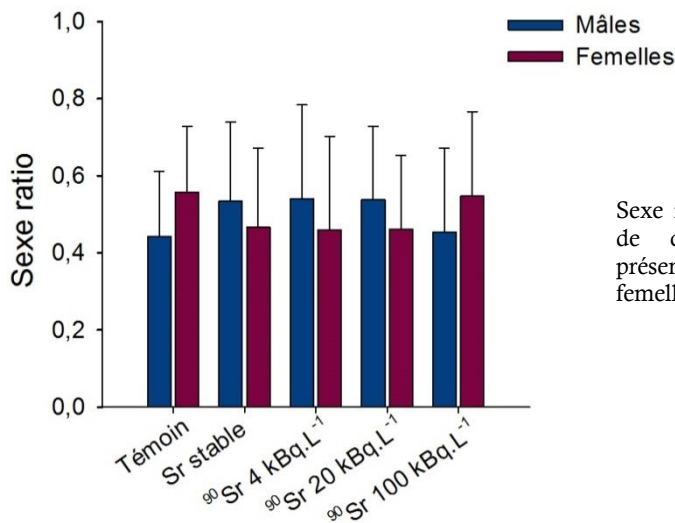


Figure 63: Sexe-ratio

Sexe ratio moyen pour chacun des groupes de contamination. Les résultats sont présentés comme moyenne de mâles et de femelles par groupe \pm SD.

2.1.1.3. Le poids des animaux

Le poids des animaux a été enregistré tout au long de l'expérimentation. Une prise de poids régulière a été observée entre la naissance et le dernier point de sacrifice, 24 semaines. En effet une augmentation significative du poids des animaux est obtenue en fonction de l'âge des souris (**Figure 64**, Two-way ANOVA, $F_{(21, 2085)}=1078,1$ $p<0,001$). Aucune modification significative du poids des animaux en fonction de la contamination n'est à noter, quel que soit le temps d'analyse.

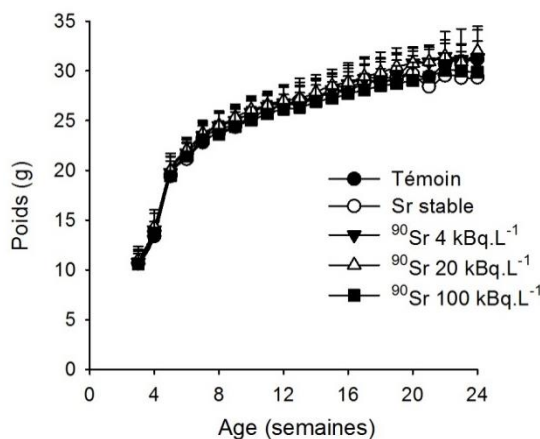


Figure 64: Suivi du poids des animaux

Evolution du poids des animaux entre 3 et 24 semaines pour chacun des groupes. Les résultats sont exprimés en g et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.1.1.4. La consommation d'eau et l'ingestion de ^{90}Sr

La consommation hydrique des animaux a été suivie de façon hebdomadaire et commence dès le sevrage (3 semaines). La consommation journalière des animaux a été calculée en fonction du nombre d'animaux par cage. Aucune variation dans la consommation hydrique des animaux en fonction de la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson n'a été observée (**Figure 65**).

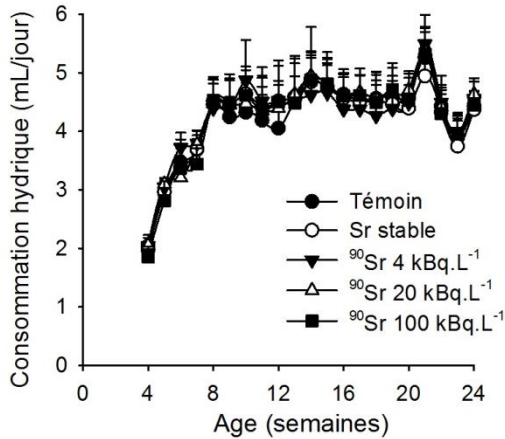


Figure 65: Suivi de la consommation hydrique des animaux

Evolution de la consommation hydrique quotidienne des animaux en fonction du temps pour chacun des groupes entre 3 et 24 semaines. Les résultats sont exprimés en mL d'eau/ jour et sont représentés comme moyenne \pm SD.

En se basant sur cette consommation, l'ingestion journalière de ^{90}Sr a pu être estimée. Pour chacune des concentrations de ^{90}Sr , les résultats obtenus indiquent que l'ingestion augmente rapidement entre 3 et 8 semaines puis se stabilise jusqu'à 24 semaines. Ceci est cohérent avec la croissance des souris. De plus, pour chacun des groupes, l'ingestion de ^{90}Sr augmente proportionnellement avec la concentration initiale dans l'eau de boisson. L'ingestion journalière de ^{90}Sr atteint une valeur moyenne à 24 semaines de $18,22 \pm 1,38$ Bq pour le groupe 4 kBq.L⁻¹, $92,57 \pm 5,42$ Bq pour le groupe 20 kBq.L⁻¹ et enfin $444,44 \pm 40,69$ Bq pour le groupe 100 kBq.L⁻¹ (**Figure 66**).

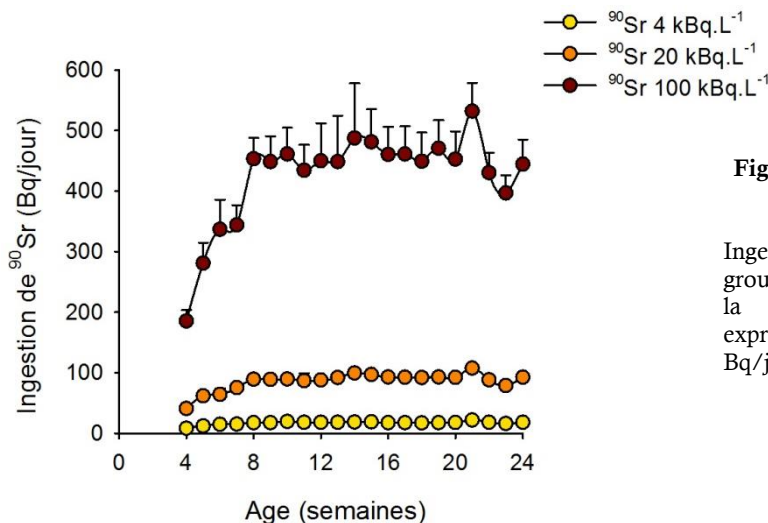


Figure 66: Suivi de l'ingestion de ^{90}Sr par les animaux

Ingestion quotidienne de ^{90}Sr pour chaque groupe de contamination. Les calculs basés sur la consommation hydrique journalière exprimés. Les résultats sont exprimés en Bq/jour et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.1.2. La concentration de ^{90}Sr dans l'os

La concentration de ^{90}Sr a été mesurée dans les tibias des animaux pour chacun des temps de sacrifice. Les résultats indiquent que le ^{90}Sr s'accumule dans l'os proportionnellement à la concentration initiale de ^{90}Sr présente dans l'eau de boisson. Une augmentation significative de la quantité de ^{90}Sr dans les tibias des animaux est observée en fonction de la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson (Two-way ANOVA, $F_{(2, 102)}=277,5$ $p<0,001$). D'autre part, le profil d'accumulation est analogue entre les concentrations de ^{90}Sr . L'accumulation est linéaire entre la naissance et 7 semaines, puis la concentration dans l'os se stabilise jusqu'à 24 semaines. Jusqu'à l'âge de 3 semaines les animaux ne reçoivent que le lait maternel, le ^{90}Sr retrouvé dans l'os chez les animaux entre 0 et 3 semaines provient donc uniquement d'une contamination *via* l'allaitement. La concentration maximale atteinte pour chacun des groupes à 24 semaines est de $22,18 \pm 2,64$ Bq/g d'os pour 4 kBq.L^{-1} , de $131,03 \pm 10,33$ Bq/g d'os pour 20 kBq.L^{-1} et enfin de $537,15 \pm 39,18$ Bq/g d'os pour le groupe 100 kBq.L^{-1} (**Figure 67**).

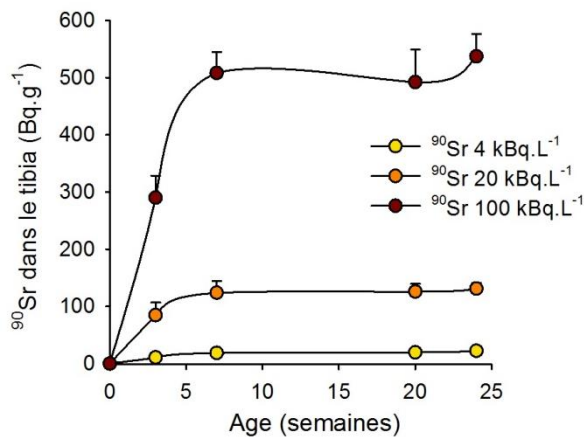


Figure 67: Contrôle de la contamination des animaux

Concentration de ^{90}Sr dans le tibia des animaux pour chacun des groupes à 3, 7, 20 et 24 semaines. Les quantités de ^{90}Sr mesurées dans l'os varient en fonction de la concentration initiale de ^{90}Sr dans l'eau de boisson. Les résultats sont exprimés en Bq/g d'os et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.1.3. Les calculs de la dose absorbée

Les calculs de la dose absorbée aux différents organes ainsi qu'au corps entier ont été réalisés grâce au logiciel RODES développé par l'IRSN. Le logiciel permet de calculer les doses absorbées soit au corps entier soit à différents organes en se basant sur la distribution des radionucléides dans l'organisme en utilisant des fantômes voxelisés de rat ou de souris.

Concernant la dose cumulée au corps entier, les résultats montrent une variation proportionnellement à la concentration initiale de ^{90}Sr dans l'eau de boisson. Celle-ci est très faible jusqu'à 7 semaines puis augmente de façon importante jusqu'à 24 semaines (**Figure 68**). Les valeurs obtenues à 24 semaines sont de $1,88$ mGy pour la concentration de 4 kBq.L^{-1} , de $11,5$

mGy pour la concentration de 20 kBq.L⁻¹ et enfin de 49 mGy pour la concentration de 100 kBq.L⁻¹.

Les calculs de la dose cumulée au squelette montrent un profil analogue à celui obtenu pour la dose cumulée au corps entier. La dose cumulée est faible entre 0 et 7 semaines, puis augmente de façon quasi-linéaire entre 7 et 24 semaines, ceci étant en accord avec l'évolution de la physiologie osseuse chez la souris. Les doses maximales cumulées à 24 semaines pour chacun des groupes de contamination sont de 11,37 mGy pour 4 kBq.L⁻¹, 70 mGy pour 20 kBq.L⁻¹ et de 296 mGy pour 100 kBq.L⁻¹ (**Figure 69**). Les doses cumulées au squelette sont nettement supérieures à celles cumulées au corps entier et s'expliquent par le fait que l'os est le site d'accumulation préférentiel du ⁹⁰Sr. Les calculs de la dose cumulée au thymus et à la rate ont aussi été établis et les résultats montrent une dose cumulée à ces organes qui est faible. Elle est d'environ 34 mGy au thymus à 24 semaines pour la concentration de 100 kBq.L⁻¹ et de 3,72 mGy pour la rate pour le même groupe (résultats non présentés).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de biocinétique précédemment obtenus avec la concentration unique de 20 kBq.L⁻¹ (Synhaeve *et al.* 2011). Ils montrent une importance de la dose cumulée au site d'accumulation majoritaire du ⁹⁰Sr, le squelette.

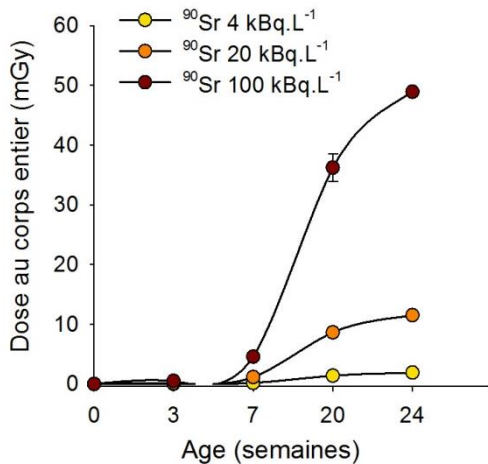


Figure 68: Evolution de la dose cumulée au corps entier

Dose cumulée au corps entier entre 0 et 24 semaines chez les souris en fonction de la concentration de ⁹⁰Sr dans l'eau de boisson. Les résultats sont exprimés en mGy et sont représentés en moyenne ± SD.

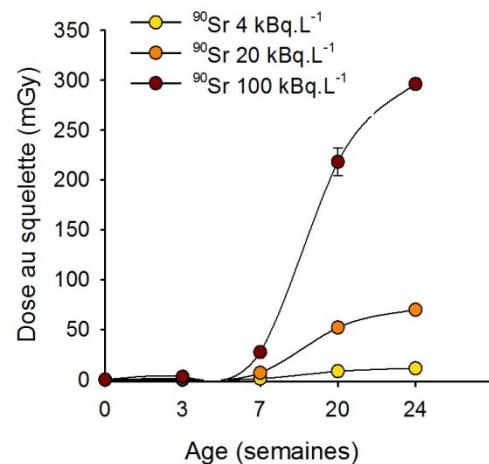


Figure 69: Evolution de la dose cumulée au squelette

Dose cumulée au squelette entre 0 et 24 semaines chez les souris en fonction de la concentration de ⁹⁰Sr dans l'eau de boisson. Les résultats sont exprimés en mGy et sont représentés en moyenne ± SD.

2.2. Validation du modèle

L'étude menée au cours de cette thèse est basée sur de précédents résultats obtenus pour une concentration de ^{90}Sr de 20 kBq.L^{-1} (Synhaeve *et al.* 2014). Dans un premier temps, l'étude des paramètres sanguins ainsi que l'analyse du système immunitaire en absence de stimulation externe (état dit de « steady-state ») et de la physiologie osseuse ont été réalisées afin de valider le modèle utilisé.

2.2.1. Les paramètres sanguins

L'étude de la formule sanguine comprenant la mesure de la concentration des leucocytes, érythrocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes et plaquettes a été réalisée pour tous les groupes et à chaque temps de sacrifice. L'hématocrite ainsi que l'hémoglobine ont également été mesurés. Les résultats démontrent une évolution significative de la formule sanguine en lien avec l'âge des animaux pour les érythrocytes, les plaquettes, l'hématocrite et l'hémoglobine (Two-way ANOVA, $p < 0,001$) mais pas en ce qui concerne les leucocytes. Cependant aucune modification statistique n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes de contamination, pour chacune des concentrations de ^{90}Sr et pour tous les temps analysés (**Figure 70**).

Ces résultats indiquent que les concentrations de ^{90}Sr utilisées dans ce modèle n'influencent pas les différents composants du compartiment sanguin.

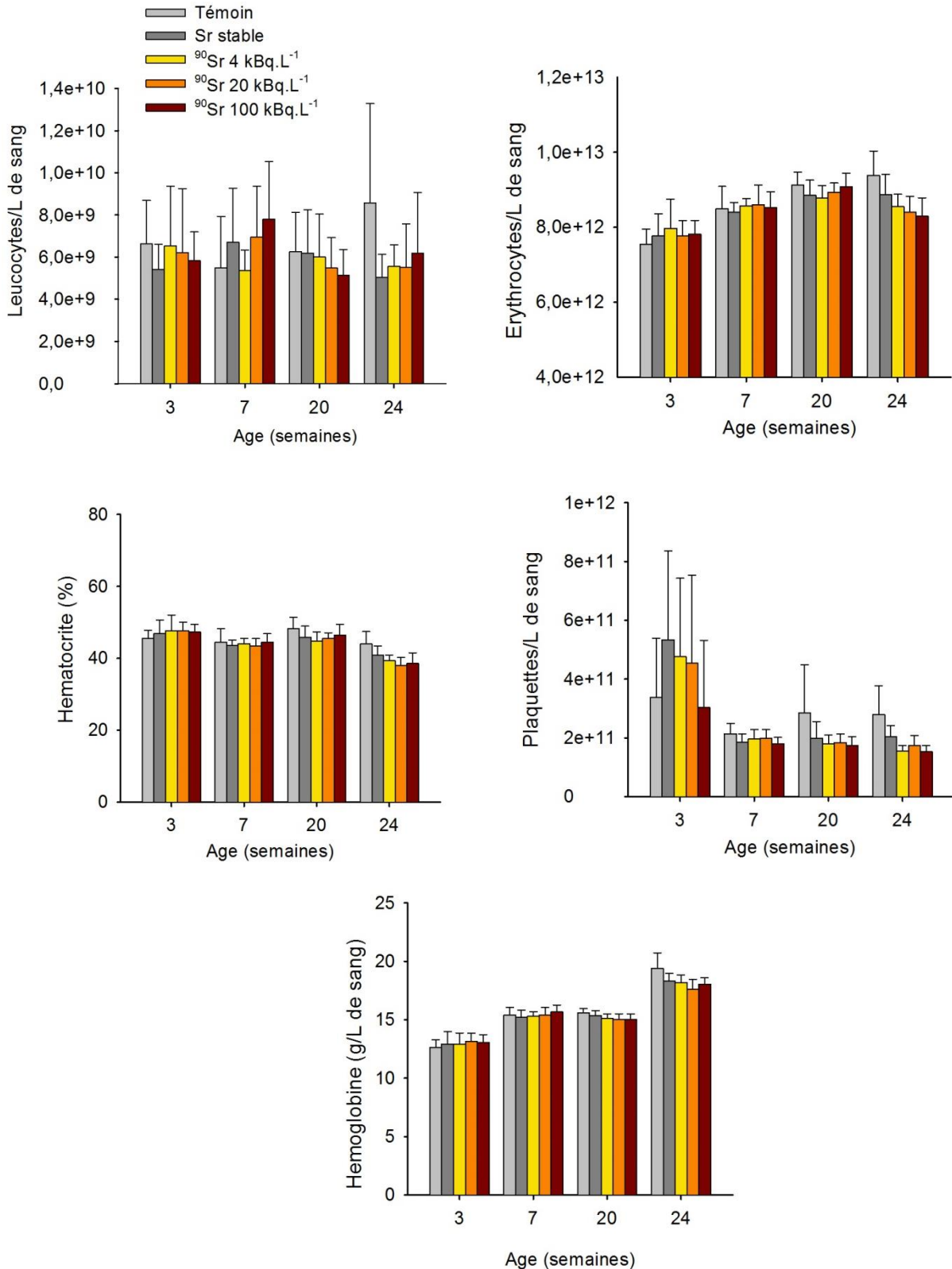


Figure 70: Suivi des paramètres sanguins

Evolution de la formule sanguine (leucocytes, érythrocytes, hémoglobine, hématocrite et plaquettes) des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines dans les différents groupes. Les résultats sont représentés comme moyenne \pm SD.

2.2.2. Le système immunitaire

Au cours de ce travail, l'étude du système immunitaire a tout d'abord été effectuée au niveau plasmatique par l'analyse des différents isotypes d'immunoglobulines circulantes, puis plus en détail au niveau de la rate en analysant les lymphocytes Th1, Th2 et Treg. Cependant, l'étude plus spécifique de la différenciation lymphocytaire B au sein de la moelle osseuse n'a pas pu être réalisée.

2.2.2.1. L'analyse des isotypes d'immunoglobulines circulantes

Les différents isotypes d'immunoglobulines circulantes (IgG1, Ig2a, Ig2b, IgG3, IgA et IgM) ont été mesurés dans le plasma des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines par la méthode multiplex. Les résultats obtenus montrent une variation significative de la concentration plasmatique de chaque isotype en fonction de l'âge des animaux (Two-way ANOVA, $p < 0,001$). Cependant, aucune variation entre les groupes de contamination n'a été observée quel que soit le temps analysé (Figure 71).

Ceci suggère que la concentration plasmatique en immunoglobulines n'est pas perturbée par la contamination au ^{90}Sr en absence de stimulation immune.

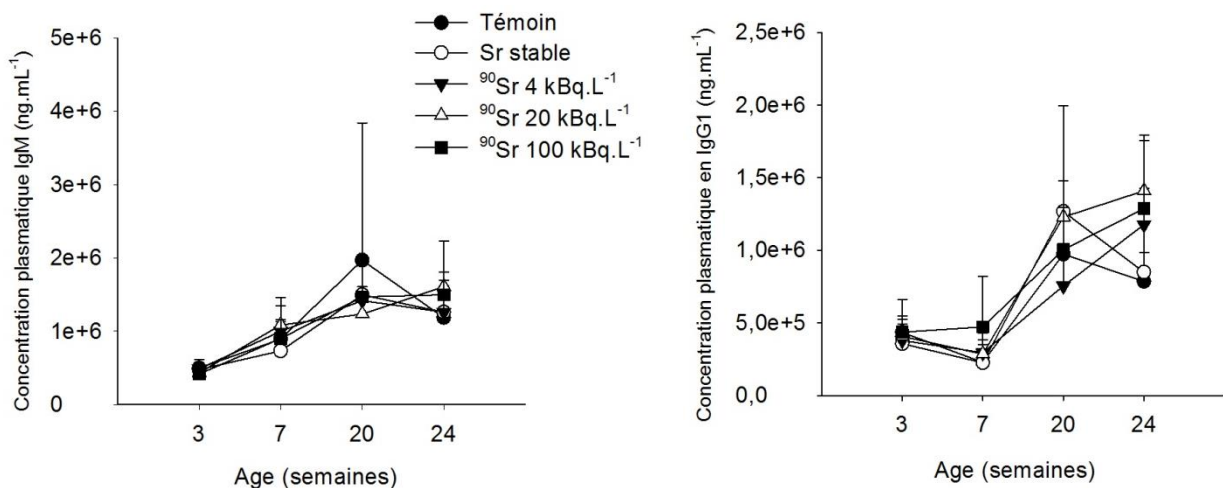


Figure 71: Concentration plasmatique des isotypes d'immunoglobulines circulantes

Suivi de l'évolution de la concentration plasmatique des isotypes d'immunoglobulines IgM et IgG1, chez les souris à 3, 7, 20 et 24 semaines. Les résultats sont exprimés en ng.mL⁻¹ et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.2.2.2. L'analyse de la balance Th1/Th2 Treg

L'évaluation de la balance Th1/Th2 et Treg a été réalisée à partir des prélèvements de rate des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines à la fois par expression génique et par le dosage des cytokines impliquées (n=8 à 10 animaux par groupe).

2.2.2.2.1. Expression des gènes

Afin de mettre en évidence l'évolution de l'équilibre Th1/Th2 et Treg dans la rate, l'expression génétique des marqueurs suivants : *T-bet*, *Ifn- γ* , *Gata3*, *Il-4*, *Foxp3* et *Il-10* a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats obtenus ne montrent pas de changements significatifs dans l'expression de ces gènes quel que soit le groupe de contamination et pour chacun des temps de sacrifice. Seuls les temps 3 semaines (**Figure 72 A**) et 24 semaines (**Figure 72 B**) sont représentés, les résultats obtenus étant similaires pour tous les temps.

Ces résultats démontrent que le ^{90}Sr n'entraîne pas de modifications de l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre Th1/Th2 et Treg en absence de stimulation immune.

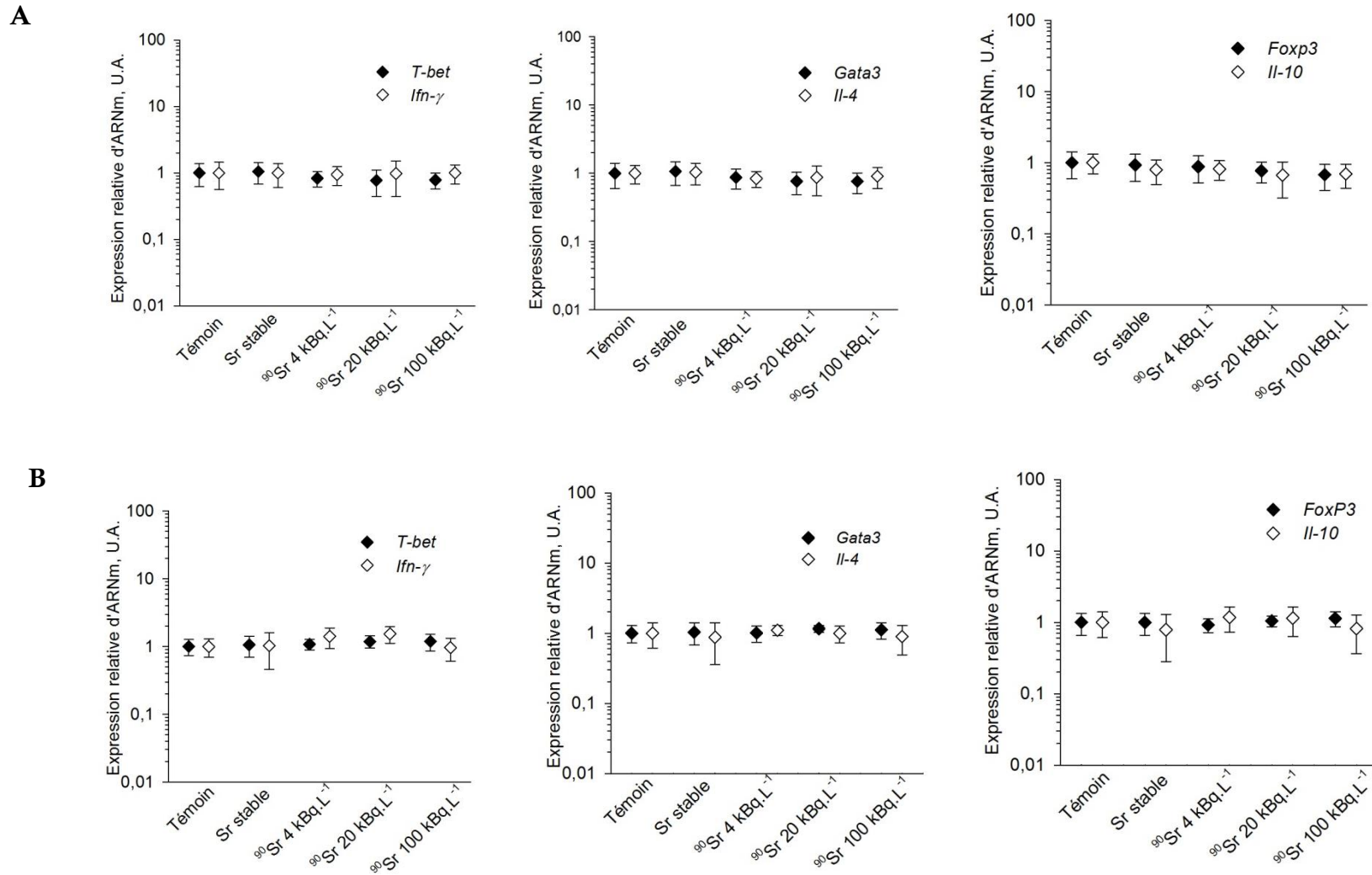


Figure 72: Niveau d'expression génique des marqueurs de l'équilibre Th1/Th2 et Treg dans la rate

Expression relative des ARNm des marqueurs des lymphocytes Th1 (*T-bet*, *Ifn-γ*), Th2 (*Gata3*, *Il-4*) et Treg (*Foxp3*, *Il-10*) dans la rate des animaux à 3 semaines (A) et à 24 semaines (B) en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.2.2.2.2. Mesure des cytokines

Afin de confirmer les résultats précédents, la quantité de cytokines en lien avec la balance Th1/Th2 et Treg a été mesurée par dosage ELISA de IL-4, IL-10 et IFN- γ à partir des extraits protéiques de rate. Le dosage de l'IL-10 n'a pas abouti à des résultats exploitables, les valeurs obtenues étant en dessous du seuil de détection du kit utilisé (dl : 1,97 pg.mL⁻¹). Concernant les dosages d'IL-4 et IFN- γ , les résultats ne montrent pas de variation de la concentration de ces cytokines entre les groupes, quelle que soit la concentration de ⁹⁰Sr ou le temps de sacrifice. Comme pour les expressions génétiques, seul les temps 3 semaines (**Figure 73 A**) et 24 semaines (**Figure 73 B**) sont représentés, les résultats obtenus étant similaires pour tous les temps.

Ces résultats confirment ceux obtenus par RT-qPCR et démontrent, tout comme les données concernant les isotypes d'immunoglobulines, que le ⁹⁰Sr n'a pas d'influence sur les paramètres immunitaires en absence de stimulation antigénique.

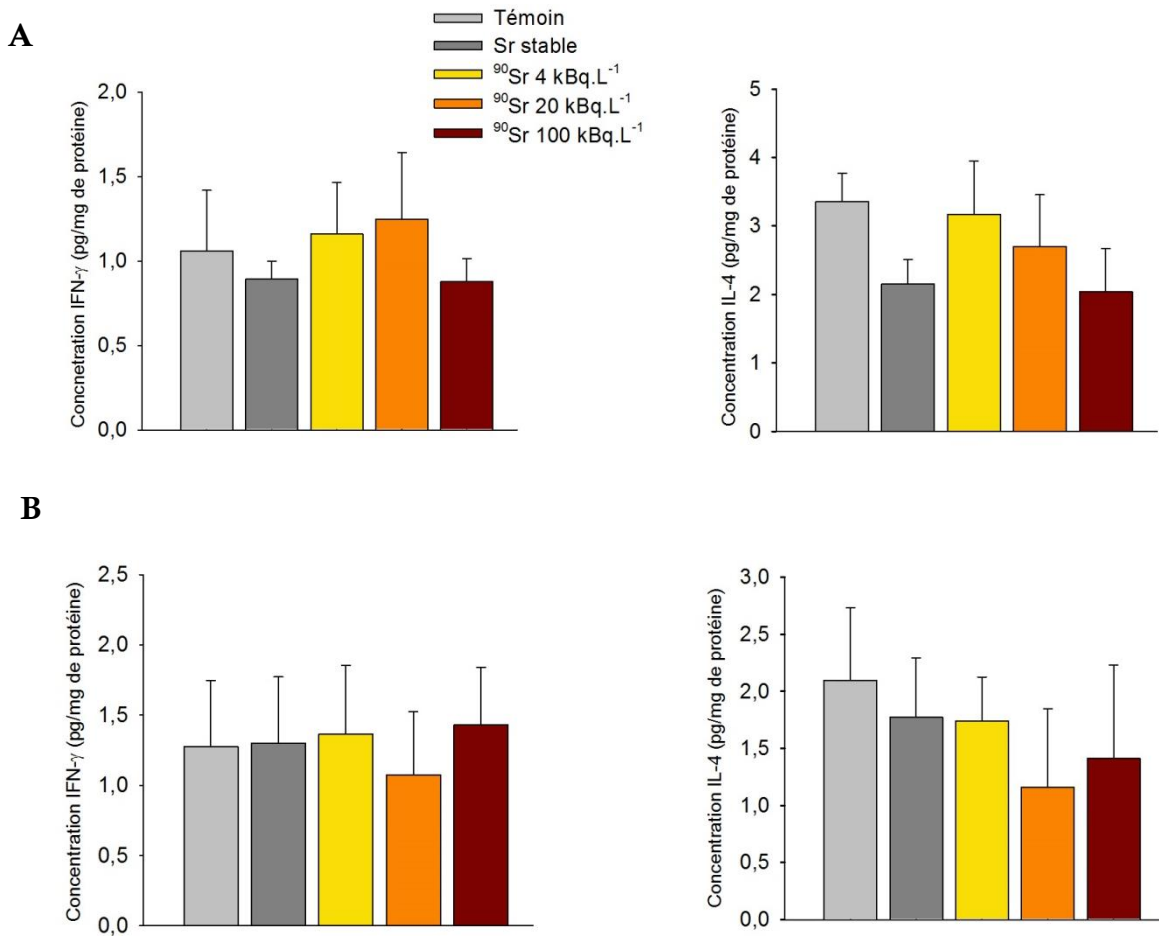


Figure 73: Concentrations spléniques des cytokines impliquées dans l'équilibre Th1/Th2

Dosage de IFN- γ et IL-4 dans la rate des animaux à 3 semaines (A) et 24 semaines (B) en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéine de rate et sont représentés en moyenne \pm SD.

2.2.3. La physiologie osseuse

L'étude de la physiologie osseuse a été réalisée en se basant sur les paramètres précédemment analysés et pour lesquels des différences significatives avaient été mises en évidence (Synhaeve *et al.* 2014). L'expression de marqueurs de la formation et de la résorption osseuse a tout d'abord été mesurée au niveau du fût fémoral des animaux. Puis les concentrations plasmatiques d'enzymes impliquées dans la balance formation/résorption osseuse ont été établies afin de confirmer les résultats déjà observés, mais également dans le but de démontrer un effet-dose du ^{90}Sr .

2.2.3.1. Expression génique des marqueurs de la résorption et de la formation

Les marqueurs de la résorption osseuse (*Trap5b*, *RankL*, *Opg*) et de la formation (*Alp*, *Bsp*, *Ocn*) ont été évalués par RT-qPCR dans les fûts fémoraux des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines (n=8 à 10 animaux par groupe). Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les groupes pour les animaux à 3 et 20 semaines. Au contraire, à 7 semaines, une diminution significative de l'expression de la *Bsp* est observée pour les souris contaminées à 20 et 100 kBq.L⁻¹ par rapport au contrôle (respectivement $0,41 \pm 0,26$ pour 20 kBq.L⁻¹ et $0,39 \pm 0,2$ pour 100 kBq.L⁻¹ vs. $1 \pm 0,74$ pour le groupe témoin, t-test, $p < 0,05$). A 24 semaines, des augmentations significatives de l'expression de *Trap5b* dans le groupe de souris ingérant de l'eau de boisson à 100 kBq.L⁻¹ par rapport au contrôle est à noter (respectivement $2,15 \pm 1,27$ vs $1 \pm 0,92$, t-test, $p < 0,05$). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de *RankL* dans les groupes de contamination 20 et 100 kBq.L⁻¹ est aussi mesurée (respectivement $1,79 \pm 1,5$ pour le groupe 20 kBq.L⁻¹ et $1,84 \pm 1,9$ pour le groupe 100 kBq.L⁻¹ vs. $1 \pm 0,51$ pour les animaux témoin, t-test, $p < 0,05$) (**Figure 74**).

Ces résultats suggèrent que le ^{90}Sr influence la physiologie osseuse en modulant l'expression de marqueurs de la résorption et de la formation osseuse comme déjà observé précédemment (Synhaeve *et al.* 2014).

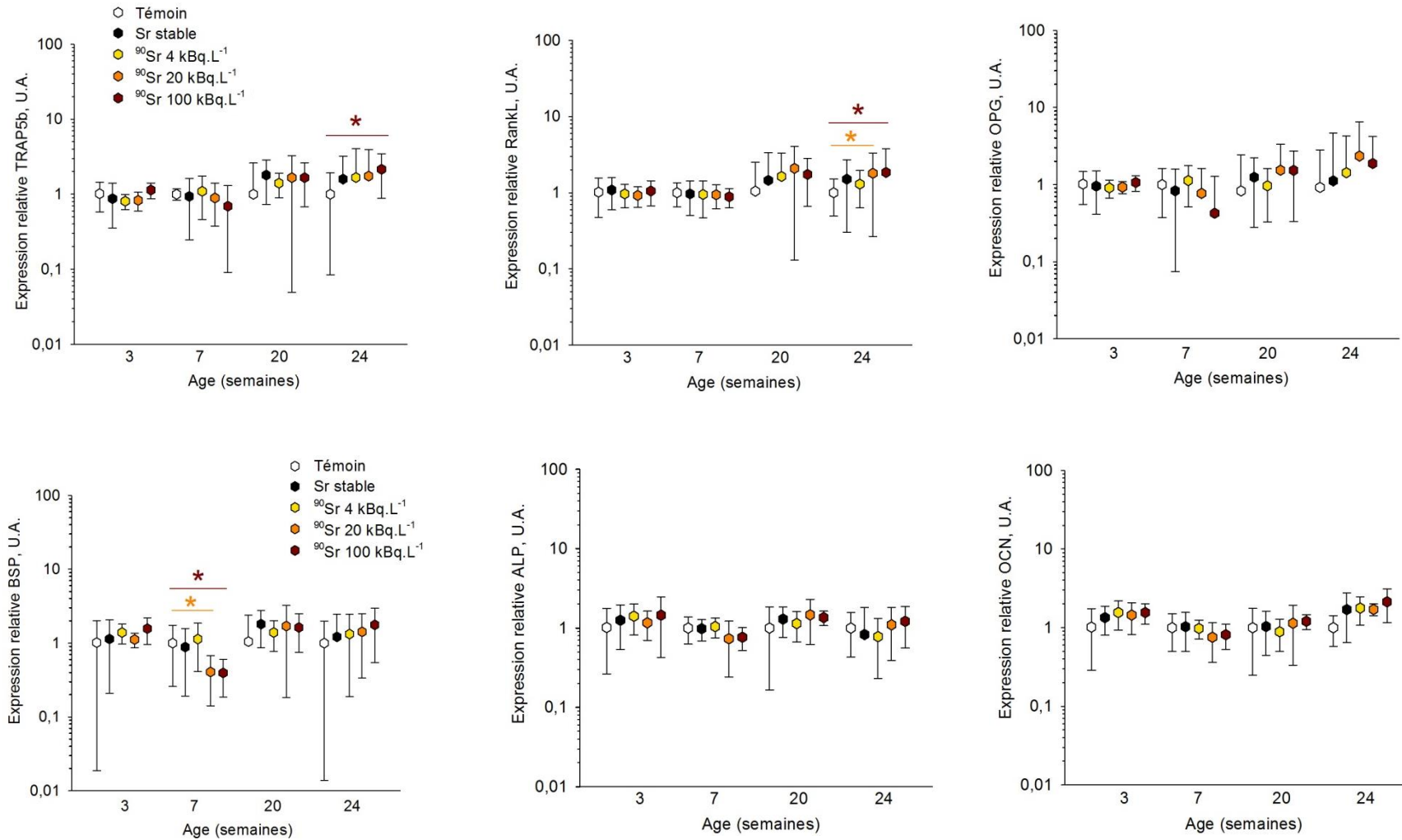


Figure 74: Niveau d'expression génique des marqueurs de la formation et de la résorption osseuse

Expression relative des ARNm des marqueurs de la résorption (*Trap5b*, *RankL*, *Opg*) et de la formation osseuse (*Bsp*, *Alp*, *Ocn*) à 3, 7, 20 et 24 semaines dans les fûts fémoraux des animaux pour les différents groupes de contamination. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne \pm SD. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ (t-test).

2.2.3.2. Dosage des enzymes de la résorption et de la formation

Les dosages plasmatiques des principaux marqueurs de la résorption osseuse (CTX et TRAP5b) et de la formation osseuse (ALP et OCN) ont été effectués à 3, 7, 20 et 24 semaines (n=8 à 10 animaux par groupe). Le choix de ces marqueurs a été fait au regard des précédents résultats obtenus au laboratoire (Synhaeve *et al.* 2014).

Les résultats montrent tout d'abord une modification significative de la concentration plasmatique de l'ALP, de l'OCN et la CTX en fonction de l'âge des animaux (Two-way ANOVA, $p < 0,01$). Ceci est en accord avec l'évolution de la physiologie osseuse chez la souris. En effet, les analyses effectuées permettent de clairement distinguer la phase de croissance osseuse jusqu'à 7 semaines, suivie de la phase de remodelage osseux au-delà.

Concernant la formation de l'os, que ce soit pour OCN ou pour ALP et pour tous les temps étudiés, les profils obtenus sont analogues et montrent une tendance à la diminution de la concentration plasmatique de ces marqueurs. Cette diminution semble être dépendante de la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson. Une diminution significative est observée à 20 semaines pour OCN dans le groupe de souris contaminées à 100 kBq.L^{-1} par rapport au groupe contrôle (respectivement $1595,3 \pm 194,71 \text{ pg.mL}^{-1}$ vs. $1867,35 \pm 273,18 \text{ pg.mL}^{-1}$, t-test, $p < 0,05$). Pour l'ALP, une diminution significative de la concentration plasmatique est mesurée à 3 semaines dans les groupes 20 et 100 kBq.L^{-1} par rapport à celles des animaux contrôles (t-test, $p < 0,05$). A 7 semaines cette même diminution significative est observée pour tous les groupes de contamination (t-test, $p < 0,05$). Enfin, à 20 semaines la diminution de la concentration plasmatique de l'ALP n'est obtenue que pour le groupe contaminé à 100 kBq.L^{-1} ($13,24 \pm 2,26 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le groupe 100 kBq.L^{-1} vs. $14,77 \pm 3,87 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le groupe témoin, t-test $p < 0,05$) (**Figure 75**).

L'analyse des marqueurs de la résorption, CTX et TRAP5b, démontre des profils analogues. Une forte tendance à l'augmentation de la concentration plasmatique en fonction de la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson est observée. L'augmentation est significativement différente pour CTX à 7 semaines entre le groupe témoin et le groupe d'animaux contaminés à 100 kBq.L^{-1} (respectivement $12,53 \pm 2,19 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour le groupe témoin vs. $15,17 \pm 3,02$ pour le groupe 100 kBq.L^{-1} , t-test $p < 0,05$). La concentration de CTX est significativement diminuée à 24 semaines pour le groupe de souris contaminées à 100 kBq.L^{-1} par rapport au groupe témoin. Aucune différence significative n'est mise en évidence pour TRAP5b pour laquelle les résultats obtenus présentent une grande variabilité (**Figure 75**).

Ces résultats sont concordants avec les résultats concernant l'expression génique des marqueurs et démontrent que la contamination au ^{90}Sr contribue à la diminution de la formation de l'os tout en augmentant sa résorption.

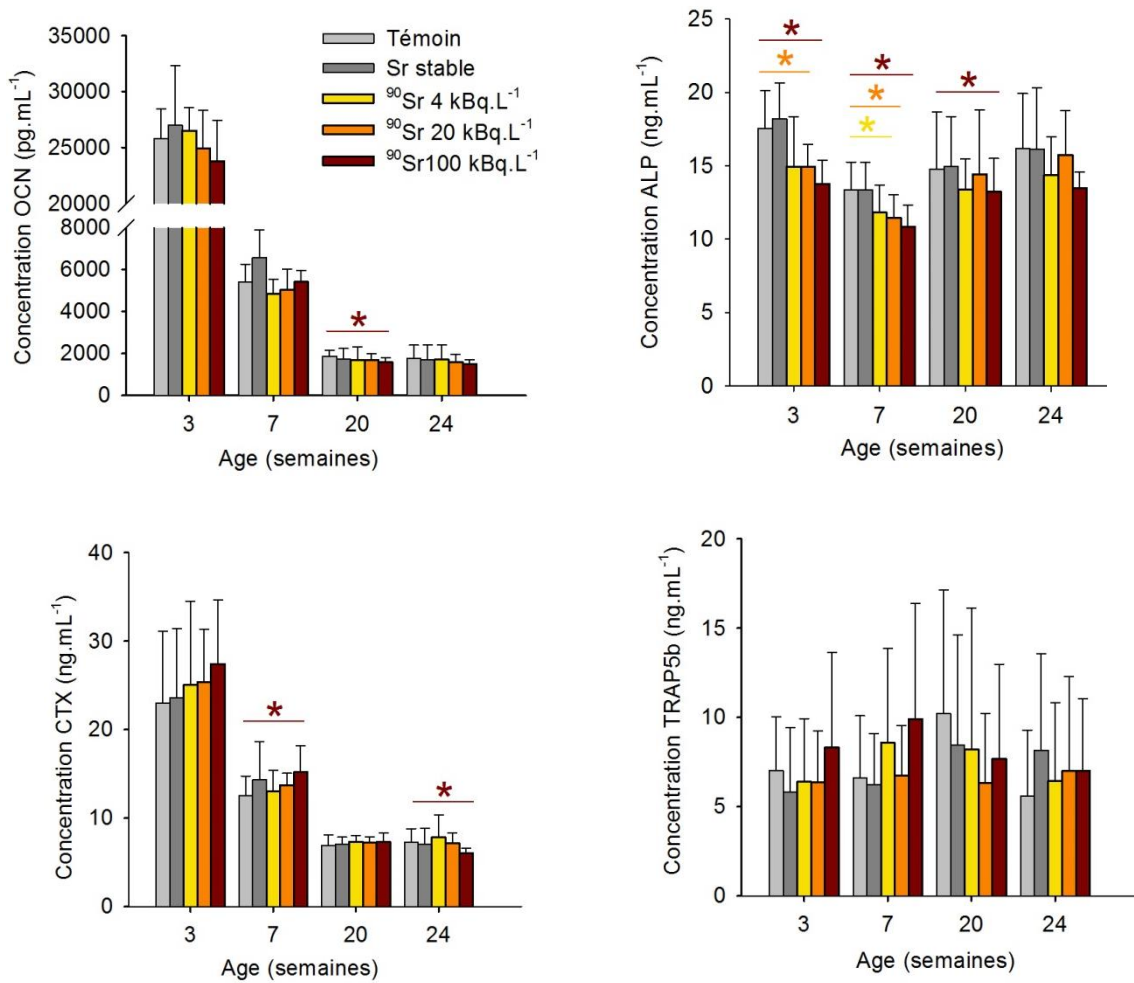


Figure 75: Concentrations plasmatiques des marqueurs de la résorption et de la formation osseuse

Dosage plasmatique par la méthode ELISA des marqueurs de la physiologie osseuse à 3, 7, 20 et 24 semaines. ALP (ng.mL⁻¹) et OCN (pg.mL⁻¹) reflètent le processus de formation alors que CTX (ng.mL⁻¹) et TRAP5b (ng.mL⁻¹) reflètent le processus de résorption de l'os. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SD. Les différences significatives sont indiquées par *p<0,05 (t-test).

2.3. Les mécanismes d'action

Le premier objectif de ce travail a été de valider le modèle expérimental, en démontrant que les effets obtenus au niveau du système immunitaire et de la physiologie osseuse étaient analogues à ceux précédemment observés avec la dose unique de 20 kBq.L⁻¹. Le deuxième but a été d'étudier les mécanismes d'action du ⁹⁰Sr *in vivo*, au niveau du site majoritaire d'accumulation, l'os. En se basant sur les résultats obtenus sur le modèle des MS5 décrit dans la première partie de ce chapitre, les mécanismes d'action d'intérêt sont les dommages à l'ADN, la mort cellulaire, le stress oxydant et la senescence. Dans ce modèle d'effet-dose, seuls le stress oxydant et la senescence ont été analysés, à la fois dans la moelle osseuse et dans le fut fémoral. Pour rappel, le fut fémoral correspond au fémur dépourvu de cellules médullaires. Les analyses ont été réalisées par RT-qPCR à 3, 7, 20 et 24 semaines.

2.3.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant a été évalué par la mesure de l'expression génétique des facteurs impliqués dans la défense antioxydante. Comme pour l'étude sur la lignée MS5, ces facteurs sont les enzymes *MnSOD*, *Gpx*, *Cat*, *Gsr* et le facteur de transcription *Nrf2*.

1.1.1.1. Dans la moelle osseuse

Les résultats obtenus concernant le stress oxydant dans la moelle osseuse ne montrent pas de modification significative de l'expression des gènes codant pour les enzymes *MnSOD*, *Gpx*, *Cat*, *Gsr* et pour le facteur de transcription *Nrf2* jusqu'à 20 semaines. Au temps 24 semaines, l'expression de la *Cat* est significativement augmentée pour le groupe d'animaux contaminés à 4 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,05$), mais également pour ceux contaminés à 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,001$). De même, pour le gène *Gpx* une augmentation significative est observée à 24 semaines pour les groupes contaminés à 20 et 100 kBq.L⁻¹ (Student's t-test, $p < 0,05$ et $p < 0,001$ respectivement) (**Figure 76**). Aucune variation significative n'est mise en évidence en fonction de la contamination à 24 semaines pour l'expression de *Gsr*, *MnSOD* et *Nrf2*.

Ces résultats démontrent une augmentation de l'expression de certaines enzymes antioxydantes, suggérant une possible induction du stress oxydant dans la moelle osseuse en réponse à la contamination par le ⁹⁰Sr.

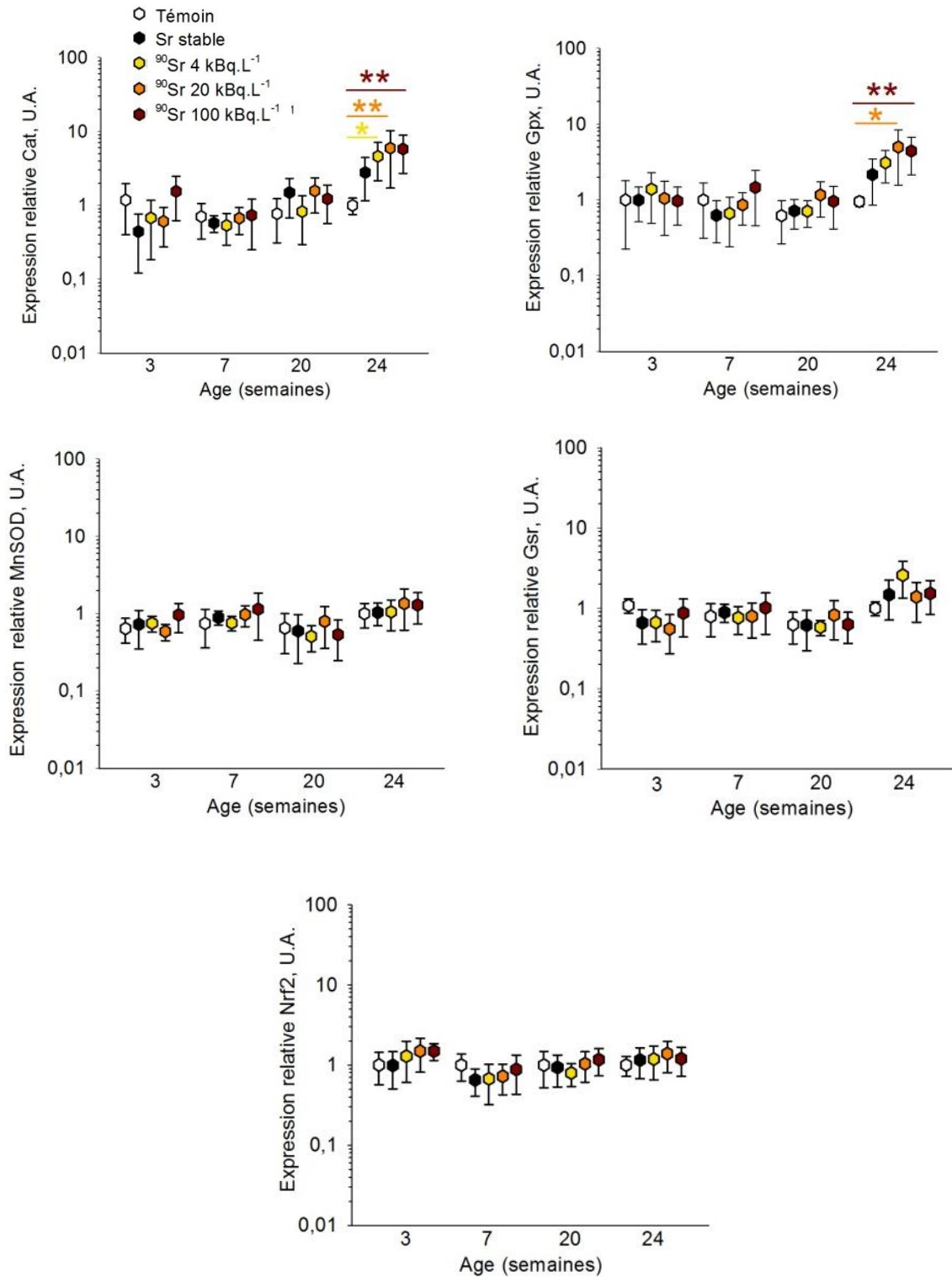


Figure 76: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes et de Nrf2 dans la moelle osseuse

Expression relative des ARNm des marqueurs de la défense antioxydante : *Cat*, *Gpx*, *MnSOD*, *Gsr* et *Nrf2* dans la moelle osseuse des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne \pm SD. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$ (t-test).

2.3.1.1. Dans le fut fémoral

Contrairement aux résultats sur la moelle osseuse, l'analyse de l'expression des gènes du stress oxydant dans le fut fémoral montre des différences significatives entre les groupes, dès 3 semaines de contamination.

Plus en détail, le niveau d'expression de la *Gsr* est statistiquement augmenté pour les groupes de contamination 4 et 100 kBq.L⁻¹ à 3 semaines (t-test $p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement). La même différence d'expression est retrouvée à 7 semaines pour les groupes contaminés à 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,001$). Concernant la *Cat*, le même profil que dans la moelle osseuse est observé, soit une augmentation significative de son expression pour les groupes de contamination 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,001$). Cependant cette augmentation est plus précoce, puisqu'elle apparaît dès 7 semaines de contamination. Les niveaux d'expression de *Gpx* et *MnSOD* sont statistiquement augmentés à 24 semaines pour les groupes d'animaux contaminés à 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,001$ et $p < 0,05$). Enfin, l'expression du facteur de transcription *Nrf2* est stable entre les différents groupes de contamination et pour chacun de temps de sacrifice. (**Figure 77**).

Ces résultats suggèrent une induction potentielle du stress oxydant dans le fut fémoral par le ⁹⁰Sr, montrée par une augmentation du niveau d'expression des enzymes antioxydantes à des temps plus précoces que dans la moelle osseuse. Ceci est en accord avec le site d'accumulation principal du ⁹⁰Sr, le tissu osseux.

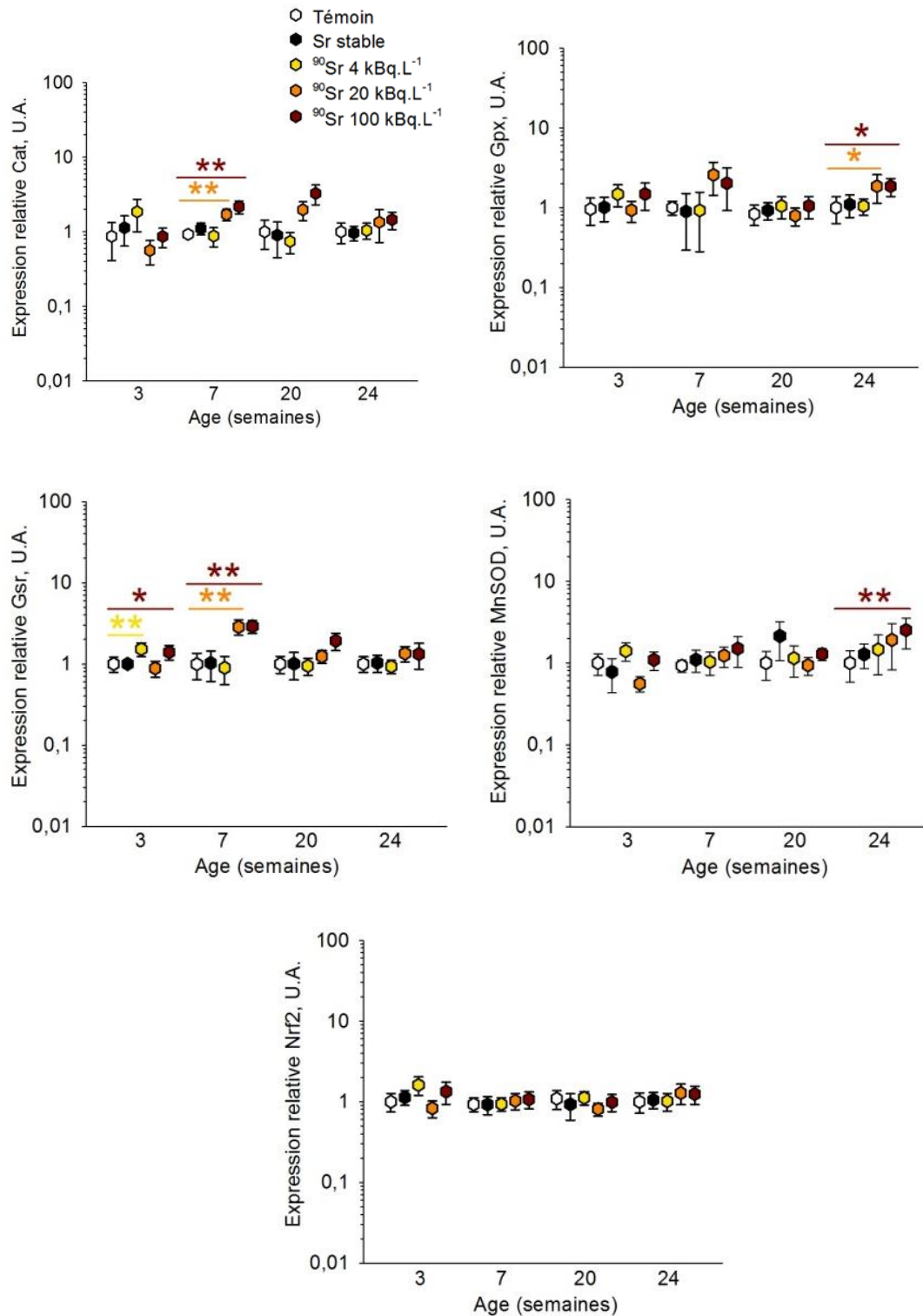


Figure 77: Niveau d'expression génique des enzymes antioxydantes et de Nrf2 dans le fut fémoral

Expression relative des ARNm des marqueurs de la défense antioxydante : *Cat*, *Gpx*, *MnSOD*, *Gsr* et *Nrf2* dans le fut fémoral des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne \pm SD. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$ (t-test).

2.3.2. La sénescence

La sénescence cellulaire a été évaluée dans la moelle osseuse et dans le fut fémoral comme déjà mentionné. Les marqueurs utilisés ont été *p21* et *Il-6*.

2.3.2.1. Dans la moelle osseuse

Au niveau de la moelle osseuse, seule une tendance à l'augmentation de l'expression de *p21* a pu être mise en évidence dans les groupes de contamination 4, 20 et 100 kBq.L⁻¹ dès 20 semaines. Cependant cette augmentation n'est pas significative. Concernant l'expression de l'*Il-6*, celle-ci est stable entre les différents groupes jusqu'à 20 semaines, puis à 24 semaines elle est significativement diminuée dans les groupes de souris contaminées à 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test $p < 0,05$ et $p < 0,001$) (**Figure 78**).

Ces résultats suggèrent que dans la moelle osseuse le ⁹⁰Sr modifie l'expression d'*Il-6* en la diminuant, mais pas celle de *p21*, ou du moins très légèrement.

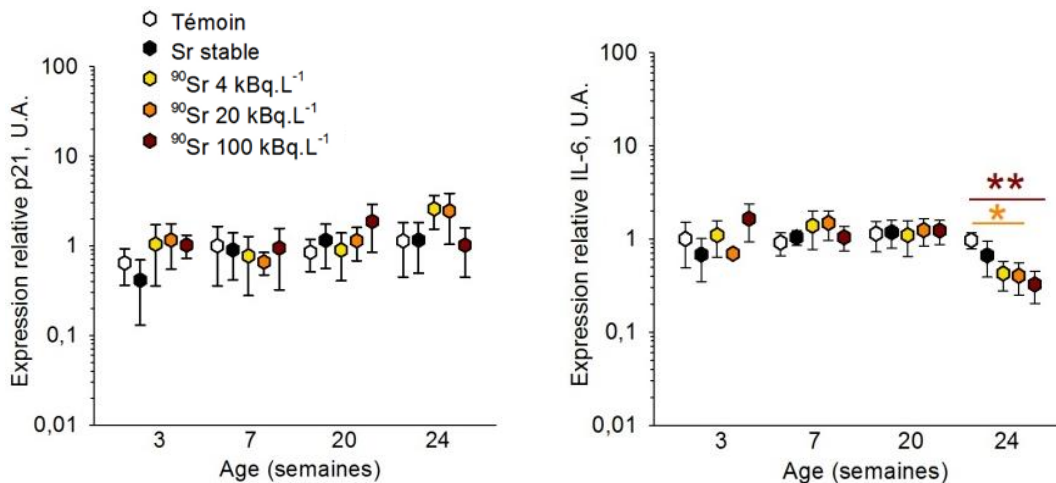


Figure 78: Niveau d'expression génique des marqueurs de la sénescence dans la moelle osseuse

Expression relative des ARNm des marqueurs de la sénescence cellulaire : *p21* et *Il-6* dans la moelle osseuse des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines en fonction du groupe de contamination. Seule une différence significative dans l'expression d'*Il-6* est observée. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne \pm SD. Les différences significatives sont indiquées par * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$ (t-test).

2.3.2.2. Dans le fut fémoral

La mesure de l'expression de *p21* et *Il-6* dans le fut fémoral a permis de démontrer une augmentation significative de l'expression de *p21* dans les groupes 20 et 100 kBq.L⁻¹ dès 7 semaines (t-test p<0,001). A 20 et 24 semaines, l'augmentation est toujours observée cependant elle n'est pas statistiquement différente des animaux contrôle. A 3 semaines, *p21* est au contraire sous-exprimé pour les groupes 20 et 100 kBq.L⁻¹.

Concernant *Il-6*, une augmentation significative de son expression à 7 semaines est observée pour les groupes 4, 20 et 100 kBq.L⁻¹ (t-test p<0,05), cette augmentation suit le même profil que pour l'expression de *p21*. A partir de 20 semaines, l'expression d'*Il-6* qui est diminuée, cette diminution étant également présente à 24 semaines (Figure 79).

Les résultats obtenus indiquent que l'expression du gène *p21* dans la moelle osseuse ainsi que dans le fut fémoral semble être augmentée proportionnellement à la concentration initiale de ⁹⁰Sr. Au contraire, l'expression de *Il-6* subit une augmentation à 7 semaines puis diminue à 20 et 24 semaines de façon inversement proportionnelle à la concentration de ⁹⁰Sr. En comparaison avec les résultats sur la moelle osseuse, ceci suggère une induction de la sénescence cellulaire dans le tissu osseux en réponse à l'accumulation de ⁹⁰Sr. Ces analyses doivent cependant être complétées par l'étude d'autres marqueurs de la sénescence cellulaire.

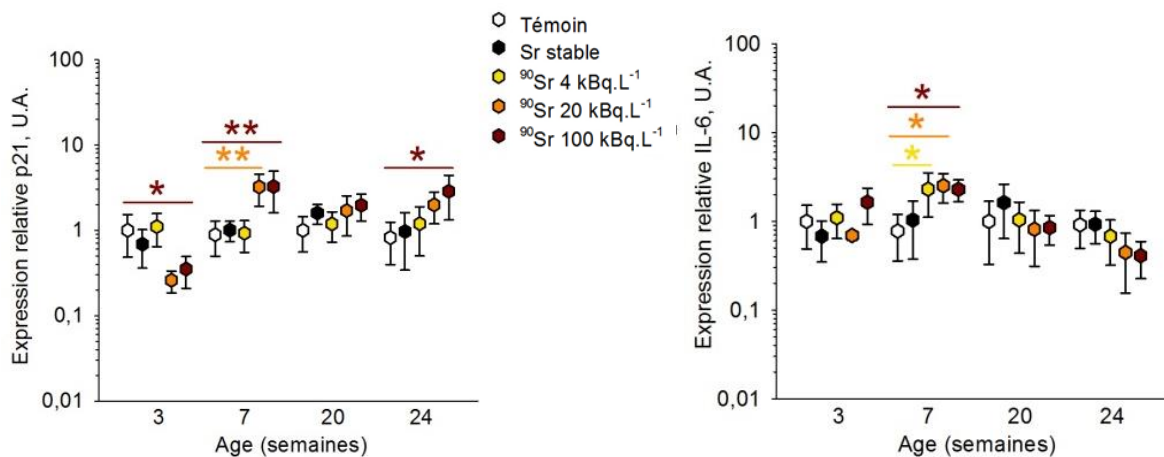


Figure 79: Niveau d'expression génique des marqueurs de la sénescence dans le fut fémoral

Expression relative des ARNm des marqueurs de la sénescence cellulaire : *p21* et *Il-6* dans le fut fémoral des animaux à 3, 7, 20 et 24 semaines en fonction du groupe de contamination. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.) et sont représentés en moyenne ± SD. Les différences significatives sont indiquées par *p<0,05 et **p<0,001 (t-test).

DISCUSSION

Au cours des dernières années, le but du programme ENVIRHOM a été d'étudier les effets d'une contamination chronique par de faibles concentrations de radionucléides sur la santé de l'homme. Plus particulièrement ce travail a été axé autour de la thématique de l'exposition post-accidentelle des populations vivant aux alentours des territoires contaminés, tels que ceux contaminés par l'accident de Tchernobyl et pour lesquelles de nombreux effets sur la santé ont été observés. Les effets touchent essentiellement le système immunitaire avec une augmentation de la survenue de leucémies entre autres, sans pour autant démontrer une corrélation claire entre la contamination par les radionucléides et la survenue de ces effets. Les données de la cohorte de la rivière Techa ont permis d'avoir une idée plus claire quant aux effets causés principalement par le ^{90}Sr et il a été mis en évidence une augmentation de la mortalité par leucémie en lien avec la dose cumulée à la moelle osseuse (Krestinina *et al.* 2013). D'autres effets tels qu'une aplasie sanguine partielle ou encore une diminution du taux de remodelage osseux ont été observés dans cette population, laissant suggérer une forte implication du ^{90}Sr . Les études expérimentales réalisées sur différents modèles animaux ont surtout contribué à améliorer les connaissances sur le comportement du ^{90}Sr dans l'organisme, mais elles n'ont pas permis de réellement modéliser la situation des populations vivant sur les territoires contaminés.

Les précédentes études du laboratoire ont démontré l'effet d'une contamination chronique par une concentration représentative de ^{90}Sr sur les territoires contaminés à la fois sur le système immunitaire et sur la physiologie osseuse (Synhaeve *et al.* 2014). Les effets observés étaient une augmentation de la résorption osseuse chez les animaux contaminés, ainsi qu'une diminution de la réponse immunitaire à la suite d'une vaccination. Le but de cette thèse a été d'amener des éléments de réponse sur les mécanismes d'action du ^{90}Sr permettant d'expliquer les effets précédemment observés. Pour cela deux modèles ont été utilisés, un premier modèle *in vitro* afin de mieux cerner les mécanismes d'action impliqués dans la biologie des rayonnements ionisants β -émis par le ^{90}Sr (dommages à l'ADN, stress oxydant, mortalité et senescence) et un deuxième modèle *in vivo* d'effet dose, pour essayer de confirmer les observations obtenues grâce au modèle cellulaire ou dans les études antérieures.

Beaucoup d'études sur les mécanismes d'action des RI sont disponibles, mais celles-ci sont essentiellement focalisées sur des irradiations externes et souvent avec des doses d'irradiation supérieures à 2 Gy. Dans le cadre du programme ENVIRHOM, les études se sont plus particulièrement intéressées aux effets d'une contamination interne par de faibles concentrations de radionucléides suite à une ingestion (Uranium appauvri, Césium 137, Strontium 90) sur différents systèmes physiologiques tels que le système nerveux central (Lestaevel *et al.* 2013; Legrand *et al.* 2015), le système cardiovasculaire (Le Gallic *et al.* 2015), le système rénal (Poisson *et al.* 2014) ou encore le système hématopoïétique (Bertho *et al.* 2010) ou le système immunitaire

(Bertho *et al.* 2011). De façon plus générale, les études concernant les effets des faibles doses d'irradiation (inférieures à 1 Gy) sont peu nombreuses et les résultats obtenus sont très variables d'une étude à l'autre du fait de manque de linéarité entre les effets observés et la dose appliquée (Manda *et al.* 2014).

Le but de ce travail a été de contribuer à l'amélioration des connaissances mécanistiques sur les effets d'une irradiation β - provoquée par la contamination interne au ^{90}Sr . En effet, bien que les effets des rayonnements X ou γ soient bien documentés, les données concernant les effets des particules β - sont plus rares, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Par ailleurs, l'étude de l'impact de ce rayonnement sur les cellules souches présente un intérêt particulier puisque, du fait de leur faible taux de renouvellement, ces cellules vont cumuler les effets des expositions qui à long terme peuvent avoir des conséquences physiologiques.

De même, afin de mieux comprendre les mécanismes *in vivo*, le modèle d'effet dose dans lequel les souris sont contaminées *via* l'eau de boisson permet de mimer plus spécifiquement les effets d'une contamination sur des enfants nés sur les territoires contaminés à la suite des accidents nucléaires.

1. Le modèle *in vitro*

1.1. Le choix du modèle MS5

Afin d'étudier l'hypothèse selon laquelle le ^{90}Sr pourrait avoir une action sur les CSM, les premières expérimentations de ce travail ont été menées sur des cultures primaires de cellules stromales mésenchymateuses issues de moelle osseuse de rat (CSM-MO). Que ce soit au niveau des analyses phénotypiques ou au niveau de la quantification des cassures double brin (CDB) obtenues avec ces cellules, une grande dispersion des données avait été observée. Bien que ces cellules soient utilisées pour modéliser les effets des RI sur les cellules souches mésenchymateuses, la lignée MS5 a été choisie pour la suite de ce travail. Cette lignée est depuis de nombreuses années bien caractérisée dans la littérature et a déjà été utilisée en tant que support de CSH en culture (Suzuki *et al.* 1992; Issad *et al.* 1993). Elle permet, entre autres, d'éviter le biais provoqué par la variabilité des données, améliorant ainsi la reproductibilité des différentes manipulations, notamment dans le contexte d'études sur les effets d'une exposition chronique à faible débit de dose. De plus, les études précédentes du laboratoire ont été menées sur un modèle murin, il était donc important de pouvoir garder la même espèce en tant que support de ce travail. Cependant, cette lignée présente ses limites, notamment par le fait qu'elle possède un phénotype pré-adipocytaire et qu'elle est plutôt radiorésistante, cette lignée ayant été obtenue par dérivation à partir d'un stroma médullaire de souris irradiée à 9 Gy (Itoh *et al.* 1989). Malgré ces

caractéristiques, elle reste l'une des lignées murines le plus utilisées pour modéliser l'interaction dans la moelle osseuse entre les CSM et les progéniteurs hématopoïétiques.

Les études *in vitro* déjà menées avec le ^{90}Sr ont utilisé ce dernier en tant que source extérieure d'irradiation β^- sur des lymphocytes issus de prélèvements sanguins, l'irradiation se faisant en dose unique flash (Vulpis & Scarpa 1986; Hall & Wells 1988; Mill *et al.* 1996; de Oliveira *et al.* 2001). Contrairement aux études préexistantes, le ^{90}Sr est utilisé pour ce travail directement dans le milieu de culture afin de mimer au mieux la situation *in vivo* dans laquelle le ^{90}Sr s'accumule dans le tissu osseux et agit sur les cellules à proximité. Par ailleurs, en comparaison avec les études préexistantes, la concentration de ^{90}Sr de 1 kBq.mL^{-1} utilisée au cours de ce travail est en accord avec les concentrations de ^{90}Sr retrouvées *in vivo* dans les tibias de souris contaminées avec 100 kBq.L^{-1} dans l'eau de boisson. La concentration de 10 kBq.mL^{-1} est utilisée pour attester d'un éventuel effet-dose du ^{90}Sr et permet de confirmer sa toxicité radiologique. Les débits de dose résultants dans ce modèle sont faibles ($6,5 \text{ mGy.jour}^{-1}$ pour la concentration de 10 kBq.mL^{-1}) et permettent de mimer l'effet d'une accumulation du ^{90}Sr *in vivo*. Dans ce modèle, le mode d'action du ^{90}Sr est multiple. Il peut agir sur les MS5 à la fois par l'irradiation émise au cours de sa désintégration mais également en s'accumulant dans les cellules et en irradiant directement les différents compartiments cellulaires, comme le noyau. En effet, le Sr possède un comportement analogue à celui du Ca, capable de rentrer dans la cellule. L'analyse de l'accumulation intracellulaire du ^{90}Sr pourrait être réalisée afin de vérifier cette hypothèse.

1.2. Les dommages à l'ADN et le stress oxydant

Ce travail a été axé sur les mécanismes d'action précoces d'une irradiation à faible concentration de ^{90}Sr et faible débit de dose ($6,5 \text{ mGy.h}^{-1}$ pour la plus forte concentration de ^{90}Sr) sur les CSM, bordant le tissu osseux. Les résultats obtenus ont pour la première fois démontré que l'un des effets d'une contamination chronique à de faibles concentrations de ^{90}Sr (1 et 10 kBq.mL^{-1}) était l'induction de cassures double brin de l'ADN, après seulement 30 min de contamination, à la fois dans les CSM-MO de rat et dans la lignée murine MS5. L'évolution dans le temps de la fréquence des CDB est analogue entre les deux types cellulaires ce qui conforte le rôle du ^{90}Sr en tant qu'inducteur de CDB. Ce rôle est d'autant plus renforcé par le fait que les CDB sont des dommages induits par les RI (Mahaney *et al.* 2009). Dès 24 h, un retour à un niveau comparable au témoin négatif de ces foci était observé, suggérant que les mécanismes de réparation cellulaire étaient activés. Le profil d'apparition/réparation des CDB obtenu est en accord avec la cinétique observée dans d'autres modèles cellulaires en irradiation externe à plus forte dose (Mariotti *et al.* 2013) et avec une induction de CDB dose-dépendante (Grudzenski *et al.* 2010; Sugrue *et al.* 2013). Cependant, de récents travaux sur l'induction de dommages à l'ADN à la suite d'irradiation à

faible dose (5 mGy par rayons X), dans le cas de mammographies pour le dépistage de cancers du sein, ont permis de mettre en évidence l'augmentation de CDB dans les lymphocytes issus de prélèvements sanguins effectués chez les patientes (Depuydt *et al.* 2013). Ceci démontre que la molécule d'ADN est sensible même à de faibles doses de rayonnements ionisants.

A 7 jours, une diminution du nombre de CDB est également été observée dans les cellules contrôle par rapport au J 0. Ceci s'explique par la progression des cellules dans le cycle cellulaire. En effet, les immunomarquages des foci γ -H2AX ont été réalisés sur des cellules à sub-confluence afin d'éviter au maximum le biais dû aux CDB formées au cours du processus de réplication de l'ADN (Bassing & Alt 2004) ou par des stress endogènes (Takahashi & Ohnishi 2005). Cependant, la progression des MS5 jusqu'au stade de confluence au bout de 7 jours a contribué à une diminution du niveau basal de CDB par cellule. Tout comme les foci γ -H2AX, la protéine p53-binding protein 1 (53PB1) est aussi impliquée dans le recrutement des protéines de la réparation (Rappold *et al.* 2001) et l'étude de sa cinétique permettrait d'avoir des informations supplémentaires quant à l'induction des dommages à l'ADN et de leur réparation.

La diminution entre 30 min et 24 h d'exposition du niveau de CDB dans les cellules contaminées à 10 kBq.mL^{-1} a fortement suggéré que la cellule était capable d'activer ses mécanismes de réparation afin de pallier aux dommages créés par le ^{90}Sr . Des études ont montré qu'à faible dose d'irradiation (environ 1 Gy et en dessous), la cinétique de diminution des γ -H2AX était similaire à celle de l'activation des voies de réparation (Rothkamm *et al.* 2003). De plus, il a été montré qu'entre 5 mGy et 1 Gy d'irradiation, l'augmentation des foci γ -H2AX se fait de façon dose-dépendante et que la cinétique de réparation est analogue quelle que soit la dose d'irradiation initiale (Asaithamby & Chen 2009). Ceci démontre que même en cas de faible taux de dommages, les mécanismes de réparation semblent se mettre en place et les résultats observés sur les MS5 sont donc en cohérence avec les données de la littérature. Dans notre modèle, aucune augmentation significative de l'expression des protéines impliquées dans la réparation cellulaire dans les cellules contaminées par rapport au contrôle n'a été mesurée. De plus, l'expression simultanée des protéines de la voie NHEJ et HR confirme que les cellules ne se trouvent pas toutes dans la même phase du cycle cellulaire. L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que le niveau basal de ces protéines est suffisant pour garantir la réparation des CDB induites par le niveau d'exposition utilisé. En effet, même dans les cellules contrôle, Ku70, Mre11 et Rad51 sont exprimées quel que soit le temps de prélèvement. Ceci s'explique par le fait que ces protéines sont exprimées de façon constitutive au niveau des cellules, puisqu'elles doivent être rapidement recrutées au niveau du site de lésion sur la molécule d'ADN, en particulier au cours de la division cellulaire (Polo & Jackson 2011). Une meilleure information aurait pu être obtenue en évaluant de façon distincte la fraction cytosolique et nucléaire de ces protéines afin de mettre en évidence

une translocation nucléaire plus importante dans les cellules contaminées par rapport à la condition contrôle. Par ailleurs, l'état de phosphorylation de ces protéines permettrait également d'évaluer leur activation au sein de la cellule. En effet, l'activation des voies de la réparation induit une cascade de phosphorylations successives aboutissant à la formation de complexes nécessaires à la réparation de l'ADN (Lee *et al.* 2015; Mahajan & Mahajan 2015). Cependant, et contrairement aux travaux disponibles dans la littérature, dans notre modèle le ^{90}Sr est présent dans le milieu de culture tout au long de l'expérimentation. Malgré la réparation des CDB, observée par la diminution des foci $\gamma\text{-H2AX}$ à 24 h, il n'est pas exclu que certaines cellules accumulent des dommages mal réparés du fait de la présence continue de ^{90}Sr dans le milieu de culture. La réparation de l'ADN est un processus finement régulé, cependant les erreurs de réparation peuvent survenir avec une fréquence variable selon la voie mise en jeu, la voie HR étant plus fidèle que la voie NHEJ. La réparation continue des dommages engendrés par le ^{90}Sr pourrait augmenter la fréquence de survenue d'erreurs et donc conduire à une accumulation de mauvaises réparations dans certaines des cellules en culture.

De plus, au cours de ces dernières années, une nouvelle théorie concernant les voies de réparation, l'Alternative End-Joining (A-EJ) a fait son apparition. Cette voie de réparation ne met pas en jeu les acteurs moléculaires classiques et induirait plutôt des instabilités chromosomiques (Frit *et al.* 2014). Elle permet donc une réparation erronée des CDB et pourrait être une piste à explorer dans le cas de notre modèle. Une indication supplémentaire sur la réparation aurait pu également être donnée par la taille des foci résiduels à 7 jours. En effet, bien que la diminution des foci soit observée, la taille des foci pourrait donner une information quant à son état actif. Des études ont démontré qu'après irradiation, le nombre de CDB augmente puis diminue progressivement. Cependant, malgré la diminution de leur nombre, la taille de ces foci résiduels est augmentée par rapport à celle dans la condition contrôle, attestant de la présence de la machinerie de la réparation au niveau du site de lésion, même dans les jours suivant le pic de foci (Bracalente *et al.* 2013).

L'une des causes pouvant expliquer l'apparition de CDB est l'induction de stress oxydant. Les résultats obtenus au cours de ce travail n'ont pas montré d'augmentation de la production de ERO ni d'induction d'enzymes antioxydantes en réponse à la contamination par le ^{90}Sr . Ces résultats sont surprenants puisque l'un des effets immédiats des RI dans la cellule est la production de ERO *via* la réaction de radiolyse de l'eau (Houee-Levin & Bobrowski 2013). Par ailleurs, la plupart des études qui démontrent l'apparition de CDB suite aux RI montrent en parallèle l'augmentation de la production de ERO (Azzam *et al.* 2012; Yamaguchi & Kashiwakura 2013). Cependant, la plupart des études ont été réalisées en réponse à des doses d'irradiation de l'ordre du Gy ou de la dizaine de Gy et toujours en irradiation externe. Dans

notre modèle, le faible débit de dose résultant de l'exposition au ^{90}Sr pourrait donc induire un niveau de ERO trop faible pour être détecté par les méthodes utilisées.

Les résultats obtenus indiquent qu'à de faibles concentrations et à un faible débit de dose, le ^{90}Sr est capable d'induire des dommages à l'ADN dès 30 minutes d'exposition sans induction d'un niveau de stress oxydant suffisant pour être observé. Les CDB formées semblent être réparées par la machinerie cellulaire. Mais dans notre modèle le ^{90}Sr est présent tout au long de l'exposition. Ceci laisse penser que malgré la réparation des dommages, certaines cellules pourraient accumuler de mauvaises réparations conduisant à l'apparition d'effets délétères.

1.3. La sénescence cellulaire et la différenciation

L'une des conséquences possibles des dommages à l'ADN induits par les RI est l'induction de la sénescence cellulaire. En effet, il a été démontré que les cellules sénescents présentaient de nombreux foci résiduels, témoins d'une mauvaise réparation ou d'une réparation incomplète de l'ADN (Minieri *et al.* 2015; Siddiqui *et al.* 2015). L'évaluation de la sénescence après 7 jours de contamination par le ^{90}Sr , a démontré une augmentation significative de l'expression génique et protéique de p21 dans les cellules contaminées par 10 kBq.mL^{-1} sans modification de l'expression de p53. Ce résultat est surprenant puisque p53 est l'activateur majoritaire de p21 dans la cascade de signalisation de la sénescence et de nombreux travaux démontrent une augmentation de la sénescence cellulaire après irradiation (d'Adda di Fagagna 2008). Les résultats de notre étude suggèrent que l'induction de p21 serait indépendante de l'activation de p53. Ceci a déjà été observé à la fois *in vitro* dans un modèle d'irradiation de cellules mésenchymateuses de rat (Galderisi *et al.* 2008) et *in vivo* chez la souris (Le *et al.* 2010). Cette dernière étude a été réalisée sur des souris p53^{-/-} irradiées à 5 Gy en corps entier et pour lesquelles des dommages à l'ADN suivis de l'expression de marqueurs de la sénescence ont été observés. Toutefois, l'augmentation de l'expression de p21 mesurée dans notre modèle est en accord avec de nombreuses études démontrant l'induction de p21 dans les cellules sénescents en réponse aux RI (Mehrara *et al.* 2010; Cao *et al.* 2014).

Afin de confirmer le profil sénescents des cellules, l'étude de la prolifération cellulaire a été menée, une cellule sénescents étant une cellule qui arrête de proliférer. Les résultats obtenus ont mis en évidence une diminution de la capacité des MS5 à proliférer, sans pour autant observer un arrêt dans une phase spécifique du cycle cellulaire. Pourtant, dans une étude récente (Alessio *et al.* 2014) il a été montré une diminution significative de la progression de CSM humaines en phase S pour des doses uniques d'irradiation de 40 mGy. Cette diminution de la prolifération s'accompagne d'une augmentation de la sénescence. Ceci démontre que même pour de faibles doses d'irradiation il est possible d'observer un arrêt dans le cycle cellulaire. L'absence de ce

phénomène dans notre modèle est peut-être dû à un manque de sensibilité de la technique utilisée, du fait de la faible proportion de cellules sénescents résultantes en culture mais également à cause de la dispersion des cellules dans les différentes phases du cycle.

Afin de confirmer les observations obtenues avec l'étude de p21 et l'induction de sénescence, une analyse de l'activité SA- β galactosidase a été menée sans être concluante. Cependant des analyses qualitatives ont pu être réalisées et il a été mis en évidence que la plupart des cellules fortement colorées en bleu présentaient une morphologie spécifique de cellule sénescence, c'est à dire un noyau et un cytoplasme élargis et de nombreuses vacuoles témoignant de l'activité des lysosomes (Lee *et al.* 2006). Afin de compléter l'étude sur la sénescence, l'analyse par cytométrie en flux de la granulosité des cellules permettrait de mettre en évidence une modification de celle-ci en réponse à la contamination puisqu'elle serait le reflet de l'activité lysosomale des cellules (Kurz 2000). De plus, l'analyse de l'autre voie de signalisation impliquée dans la sénescence cellulaire, la voie p16/ink4 (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007) pourrait également permettre de compléter les précédentes observations.

Les voies de signalisation activées par la sénescence cellulaire, passant par p53 ou p16, sont impliquées dans d'autres processus et de récents travaux ont permis d'établir un lien entre la sénescence et la différenciation cellulaire (Wang *et al.* 2012; Despars *et al.* 2013; Fei *et al.* 2014). Dans notre modèle, le caractère pré-adipocytaire des MS5 a été utilisé pour l'étude de la différenciation cellulaire. Une augmentation significative de la fréquence de cellules différenciées a été mise en évidence en réponse à la contamination au ^{90}Sr que ce soit avec 1 ou 10 kBq.mL^{-1} sans observer d'augmentation de l'expression génique des marqueurs associés. Les résultats obtenus dans notre modèle peuvent paraître contradictoires par rapport à certaines études ayant démontré une perte de la capacité de différenciation des CSM en réponse à une irradiation (Mehrara *et al.* 2010). Au contraire d'autres études ont montré une rétention de la capacité de CSM médullaires humaines à se différencier en réponse à une irradiation de 4 ou 10 Gy sans moduler l'expression génique du marqueur *PPAR γ* , un marqueur bien connu de la différenciation adipocytaire (Nicolay *et al.* 2013). Par ailleurs, de récents travaux ont mis en évidence une augmentation de la différenciation de CSM médullaires à des doses d'irradiation de 2, 4 et 16 Gy (Islam *et al.* 2015). De même, une étude *in vivo* d'irradiation du tissu osseux a récemment démontré une perte de la capacité des cellules à se différencier vers la voie ostéoblastique et en parallèle, une différenciation adipocytaire favorisée. Ceci est confirmé par un important infiltrat adipeux observé au niveau de la moelle osseuse (Wang *et al.* 2016). En effet, au cours du vieillissement, la moelle osseuse rouge se transforme progressivement en tissu adipeux et devient la moelle jaune (Justesen *et al.* 2001). Cette augmentation de la différenciation adipocytaire serait donc en lien avec la sénescence et le vieillissement.

L'un des mécanismes pouvant expliquer ce phénomène implique la voie Wnt/ β -caténine. En effet, comme décrit en introduction, la voie Wnt est la voie de signalisation principale qui permet de contrôler à la fois le maintien de l'état souche des cellules mais également leur prolifération et leur différenciation (Ling *et al.* 2009; Visweswaran *et al.* 2015). Des études ont démontré une implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la sénescence du tissu osseux notamment (Liu *et al.* 2007). De plus, il semblerait que cette voie soit également impliquée dans le devenir sénescence des cellules. En effet, il a été montré que la stimulation de la voie Wnt conduit à l'induction des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN (DDR) menant à la sénescence cellulaire (Zhang *et al.* 2011). Par ailleurs, ceci a également été démontré *in vivo* en induisant l'expression de la β -caténine dans les thymocytes de souris *p53*^{-/-}. Cette expression a pour conséquence l'induction de la sénescence des cellules, due à l'activation des mécanismes de DDR p53-indépendants (Xu *et al.* 2008). La sénescence et de la différenciation cellulaire partagent donc des voies de signalisation communes et il est très probable que ces deux mécanismes soient dépendants l'un de l'autre. De plus, dans ce travail, seule la voie de différenciation adipocytaire a été analysée et il serait donc intéressant d'aller explorer les autres voies de différenciation des CSM (ostéoblastique et chondrocytaire) afin d'observer une éventuelle altération en réponse à la contamination.

Globalement, le ⁹⁰Sr à faible concentration et à faible débit de dose présent en continu dans le milieu de culture entraîne des CDB dans le noyau des MS5 à des temps précoces. Bien que le processus de réparation soit activé, la survenue de la sénescence d'une fraction des cellules atteste d'une possible accumulation d'infidélités de réparation, conduisant à la mise en place de mécanismes de protection par la cellule. La sénescence est l'un de ces mécanismes. En parallèle, l'augmentation de la différenciation adipocytaire en réponse à la contamination pourrait contribuer au devenir sénescence des cellules puisque ces deux phénomènes partagent des voies de signalisation communes.

1.4. La mortalité

La mortalité cellulaire est un autre des effets provoqués par les RI. Au regard des résultats précédents et notamment sur la diminution de prolifération observée en réponse à la contamination, la mortalité cellulaire a été évaluée. Les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la mortalité en réponse à la contamination, que ce soit par l'apoptose (grâce à la fraction subG1) ou encore de la cytotoxicité générale par la mesure de la LDH après 7 jours de contamination par le ⁹⁰Sr. Ces résultats sont en accord avec des études d'irradiation chronique à faible dose sur des cellules endothéliales (HUVEC) dans lesquelles il avait été observé l'induction de CDB sans altération de la viabilité cellulaire (Cervelli *et al.* 2014). De

même, d'autres études ne démontrent pas d'augmentation de la mortalité en réponse à des irradiations externes avec des doses d'irradiation plus fortes, allant jusqu'à 20 Gy (Cmielova *et al.* 2012). La plupart de ces études démontrent en parallèle la survenue de la sénescence cellulaire en réponse à l'irradiation, au détriment des processus de mortalité, comme l'apoptose par exemple, même pour de fortes doses. En effet, l'apoptose et la sénescence mettent en jeu la même voie de signalisation impliquant p53 et il a été montré que l'induction de p21 entraîne l'inhibition de l'apoptose (Sohn *et al.* 2006; Garner & Raj 2008; Wu *et al.* 2014). De plus, l'induction de la sénescence serait un mécanisme de protection de la part de la cellule, favorisé par rapport à la mort cellulaire. Au cours de ce travail, les observations concernant la mortalité n'ont été que descriptives. Des analyses plus précises de l'apoptose par cytométrie en flux (marquage de l'annexine V) ou encore par une étude plus détaillée de l'activation des caspases (caspase 3 et 8 clivées) ou même par la technique d'UTP nick end labelling (TUNEL) permettraient de compléter nos résultats.

En parallèle, l'analyse de l'autophagie, un autre type de mort cellulaire programmée, pourrait être une nouvelle piste d'étude. Depuis quelques années, l'autophagie semble être également un processus par lequel la cellule répond aux différents stress. Tout comme l'apoptose, c'est un mécanisme étroitement lié à la sénescence par l'implication de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, commune dans les deux processus (Young *et al.* 2009; Alessio *et al.* 2014). L'autophagie pourrait être analysée par l'observation de la morphologie des cellules, notamment par la formation des autophagosomes, spécifiques de ce type de mort (Galluzzi *et al.* 2012). Les autophagosomes sont marqués par les protéines microtubule-associated protein 1 light chain 3 (L3C) dont la conversion de l'isoforme L3C-I en L3C-II est spécifique au processus d'autophagie (Tanida *et al.* 2008).

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont donc montré l'apparition de la sénescence cellulaire en réponse à l'apparition de CDB dans les MS5, ainsi qu'une augmentation de la différenciation adipocytaire. Ces deux mécanismes sont mis en place par la cellule en réponse à la contamination et semblent être des alternatives au mécanisme de mort cellulaire. Aux concentrations utilisées au cours de ce travail, les dommages induits par le ^{90}Sr à faible débit de dose ne semblent pas être en mesure d'altérer la viabilité cellulaire, mais plutôt d'activer des mécanismes alternatifs ayant des conséquences au niveau fonctionnel.

1.5. Les conséquences fonctionnelles

Les cellules sénescents sont des cellules métaboliquement actives bien qu'elles aient arrêté de proliférer (Campisi *et al.* 2005). La fonctionnalité des MS5 a donc été évaluée dans ce modèle, tout d'abord lors d'une expérience de LTC-IC et également lors d'une expérience de prolifération

et différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en milieu conditionné. Les résultats obtenus avec les LTC-IC n'ont pas montré de différence significative dans la fréquence des LTC-IC entre les cultures témoin et les cultures sur un stroma de MS5 contaminées. De même aucune modification du nombre moyen de CFC par LTC-IC n'a été montrée. Ceci suggère que les contacts cellulaires entre les cellules stromales et les progéniteurs hématopoïétiques ne sont pas altérés. En accord avec cette hypothèse, la protéine SDF-1, majoritairement impliquée dans le maintien des CSH dans la niche par les CSM, n'est pas modifiée en réponse à la contamination par le ^{90}Sr . Ceci peut sembler en contradiction avec les études concernant l'expression de SDF-1 en réponse à des irradiations. Une étude a montré une augmentation chez la souris de l'expression de SDF-1 en réponse à une irradiation corps entier à une dose de 3,75 Gy, ceci étant une réponse aux dommages à l'ADN (Ponomaryov *et al.* 2000). Plus généralement, des travaux ont démontré une modulation de l'expression des molécules d'adhésion en réponse à des irradiations et en fonction de leur rôle. Des molécules d'adhésion de type ICAM-1 ou encore VCAM-1, qui favorisent la réponse inflammatoire, voient leur expression augmenter après irradiation (Prabhakarandian *et al.* 2001; Haubner *et al.* 2013; Malik *et al.* 2015). Au contraire, d'autres molécules telles que PECAM-1 ayant un rôle anti-inflammatoire sont inhibées suite à une irradiation (Malik *et al.* 2015). Globalement, il semblerait que la conséquence d'une irradiation au niveau de l'expression des molécules de contact soit favorable à la création d'un environnement de type pro-inflammatoire. Cependant dans notre modèle, les résultats obtenus par les LTC-IC semblent suggérer qu'aux concentrations utilisées, le ^{90}Sr n'altère pas les molécules de contact impliquées dans la différenciation hématopoïétique.

Au contraire, la culture de progéniteurs hématopoïétiques issus de moelle osseuse en milieu conditionné provenant de cellules MS5 ayant été contaminées pendant 7 jours, a montré une augmentation significative du nombre de CFU-G pour la condition 10 kBq.mL⁻¹. Ces résultats suggèrent que les modifications observées au niveau de la différenciation et de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques seraient une réponse à une modification du profil de sécrétion des MS5. Cependant, la concentration extracellulaire des cytokines majoritairement impliquées dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques granulocytaires (IL-6, SCF, G-CSF, GM-CSF et IL-3) n'est pas modifiée malgré la contamination. De même, aucune modification du profil d'expression de cytokines par les MS5 n'a été observée. Cependant IL-1ra, SDF-1, TIMP-1, MCP-1 et M-CSF ont pu être identifiées comme étant les cytokines majoritairement exprimées par ces cellules. Leur niveau de sécrétion a été évalué car, avec les molécules d'adhésion, celles-ci sont responsables de la communication cellulaire et sont fortement impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence après 7 jours de contamination par 10 kBq.mL⁻¹ de ⁹⁰Sr, une augmentation significative du relargage de la cytokine pro-inflammatoire TIMP-1 accompagnée d'une légère augmentation du facteur MCP-1. En parallèle, une faible diminution de la concentration extracellulaire de IL-1ra, ayant une action plutôt anti-inflammatoire a été montrée, ainsi que la diminution de la concentration de M-CSF. Ces résultats suggèrent donc qu'en réponse à la contamination par la plus forte concentration de ⁹⁰Sr, les MS5 semblent induire une réponse dans le sens pro-inflammatoire. Ce profil de sécrétion est en accord avec le phénotype des cellules sénescents étant donné que l'un des marqueurs principaux est le SASP (senescence associated secretory profile) (Rodier & Campisi 2011) dans lequel les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important. Par ailleurs, la senescence est un mécanisme impliqué dans de nombreuses pathologies liées à l'âge, la plupart mettant en jeu des réponses de type inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou encore la maladie d'Alzheimer (Vasto *et al.* 2007; Franceschi & Campisi 2014). Des études concernant l'effet de faibles doses d'irradiation et à faible débit de dose (4,1 mGy.h⁻¹) sur des cellules endothéliales (HUVEC) ont également mis en évidence une augmentation de l'expression de cytokines de type pro-inflammatoire telles que MCP-1 (Ebrahimian *et al.* 2015). L'augmentation de la prolifération et de la différenciation des CFU-G observée dans ce travail pourrait donc être favorisée par la création d'un microenvironnement de type pro-inflammatoire de la part des MS5.

De plus, il est important de noter que les cytokines identifiées au cours de ce travail présentent un rôle dans de nombreuses pathologies du tissu osseux. En effet, TIMP-1 est une cytokine impliquée dans le remodelage de la matrice osseuse en régulant l'activité des métalloprotéases (MMP) et plus spécifiquement la MMP-9, qui dégrade cette matrice (Ries 2014). Des travaux ont montré que la concentration plasmatique de TIMP-1 est augmentée chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, ceci attestant d'une augmentation de la dégradation du tissu osseux en lien avec la pathologie (Murphy *et al.* 2009). Il en va de même pour MCP-1, un chimioattractant capable de recruter les acteurs impliqués dans le processus inflammatoire tels que les macrophages. Comme pour TIMP-1, des concentrations élevées de MCP-1 ont été mesurées dans le sang périphérique mais également au niveau des jonctions articulaires de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Ellingsen *et al.* 2001; Szekanecz *et al.* 2003). Enfin, IL-1ra ayant une action anti-inflammatoire est aussi retrouvé en concentrations élevées dans le sang de patients atteints de polyarthrite chronique et d'arthrite rhumatoïde (Palomo *et al.* 2015).

L'ensemble de ces données ont permis de démontrer qu'en réponse à la contamination par le ⁹⁰Sr, une fraction des cellules MS5 entre en senescence. Bien que les contacts cellulaires ne semblent pas être modifiés, la senescence induite a pour conséquence des modifications fonctionnelles telles que la modification du profil de sécrétion de ces cellules qui auront tendance à relarguer des

molécules impliquées dans le processus d'inflammation. Ce microenvironnement pourrait expliquer les effets précédemment observés.

Le mécanisme général du ^{90}Sr pour le modèle *in vitro* est résumé dans la **Figure 80** (page 186).

2. Modèle *in vivo*

Etant donné les résultats obtenus avec le modèle de cellules MS5, il est important de vérifier si une contamination *in vivo* par le ^{90}Sr est capable d'induire des mécanismes similaires. Pour cela, le modèle d'effet-dose a été utilisé.

2.1. Le modèle de contamination

Pour ce travail, la contamination des animaux *via* ingestion d'eau de boisson a été utilisée. Ce type de contamination est un modèle standardisé au laboratoire pour de nombreuses études (Bertho *et al.* 2010; Bertho *et al.* 2011; Synhaeve *et al.* 2014; Le Gallic *et al.* 2015; Legrand *et al.* 2015). En effet, il permet de mimer au mieux l'exposition des populations des territoires contaminés qui ingèrent quotidiennement des aliments et de l'eau contenant des radionucléides, tout en contrôlant le niveau de contamination des animaux. Dans ce modèle, les animaux ont été exposés dès le stade *in utero* par la contamination des parents qui commence avant l'accouplement. Les concentrations de ^{90}Sr dans l'eau de boisson choisies ont également déjà été utilisées au laboratoire, notamment pour des études sur le ^{137}Cs (Bertho *et al.* 2010; Bertho *et al.* 2011; Le Gallic *et al.* 2015). La concentration de 20 kBq.L⁻¹ est la concentration dite « de référence » puisqu'en estimant la consommation journalière d'eau par les souris (environ 5 mL), la quantité de ^{90}Sr ingérée est donc de 100 Bq/jour ce qui correspond aux estimations des quantités ingérées quotidiennement par les populations (Handl *et al.* 2003). Les concentrations de 4 et 100 kBq.L⁻¹ sont utilisées quant à elles pour encadrer la concentration de référence, permettant d'observer un éventuel effet-dose du ^{90}Sr pour confirmer les effets précédemment observés à la concentration unique de 20 kBq.L⁻¹. Afin d'éviter tout biais lié à un éventuel effet causé par le Sr stable, un groupe de souris ingérant de l'eau supplémentée avec 0,1 µg.L⁻¹ de Sr stable a été utilisé, ceci permettant de confirmer l'implication de la toxicité radiologique du ^{90}Sr . En effet, toutes les sources de $^{90}\text{SrCl}_2$ utilisées pour cette expérimentation sont diluées à la concentration voulue dans une solution de SrCl₂. La concentration de la solution de Sr stable a donc été choisie en se basant sur la plus forte concentration de SrCl₂ utilisée pour diluer la source de ^{90}Sr à la concentration de 100 kBq.L⁻¹. En parallèle, le taux de Sr stable a été également mesuré dans l'eau pour le groupe témoin et les résultats obtenus ont montré des valeurs moyennes d'environ 300 µg.L⁻¹ (données du laboratoire). D'après les recommandations de l'ANSES, la limite de Sr dans l'eau de boisson est fixée à 18 mg.L⁻¹ (ANSES 2013). La présence de Sr stable

est donc un élément constitutif du bol alimentaire et de fait, l'étude alimentaire totale 2 (EAT2, ANSES 2011) estime la consommation chez l'homme à environ 23,6 µg/ kg de poids corporel/ jour, l'eau constituant 40 % des apports quotidiens. Pour l'ensemble des paramètres étudiés dans ce modèle, aucune modification n'a été observée en réponse à l'ajout de Sr stable dans l'eau de boisson. Ceci confirme l'absence de toxicité chimique du Sr aux concentrations utilisées et confirme que le ^{90}Sr a essentiellement une action radiotoxique aux niveaux d'exposition rencontrés en situation post-accidentelle.

L'état général des animaux a été suivi tout au long de l'expérimentation. Aucune modification n'a été observée quant à l'ingestion d'eau ou de nourriture entre les groupes, quel que soit le temps ou la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson. L'ingestion d'eau contaminée n'a pas d'influence sur l'état général des animaux, estimé au travers de la prise de poids régulière tout au long de l'expérimentation. De même, les données concernant la reproduction des animaux n'ont pas mis en évidence de différences concernant le nombre de portées et le nombre de naissances par portée en fonction de la contamination. Quant au sexe ratio dans chacun des groupes, il n'est pas modifié en réponse à l'ingestion de ^{90}Sr . L'ensemble de ces résultats confirment les observations obtenues lors de précédentes études de contamination chronique par de faibles concentrations de radioéléments, que ce soit avec le ^{90}Sr ou d'autres radioéléments.

Concernant la vérification de la contamination des animaux par la mesure du ^{90}Sr dans les tibias des souris, les résultats obtenus montrent une accumulation du ^{90}Sr dans l'os qui varie en fonction de l'évolution de la physiologie osseuse chez les souris. En effet, jusqu'à 7 semaines c'est la phase de croissance osseuse au cours de laquelle l'os croît de façon longitudinale, l'accumulation de ^{90}Sr au cours de cette phase est linéaire. A 7 semaines, c'est le passage progressif à la physiologie osseuse de l'âge adulte et à la mise en place du remodelage osseux, contribuant au maintien de l'équilibre du tissu. A partir de ce point, l'accumulation de ^{90}Sr atteint un plateau et reflète l'activation des mécanismes de résorption et de formation osseuse, permettant un renouvellement du pool de Ca. Les résultats obtenus ici, sont en accord avec les résultats sur la biocinétique du ^{90}Sr réalisée à 20 kBq.L⁻¹ uniquement. De plus, le ^{90}Sr est mesuré dans l'os dès 3 semaines, attestant d'une contamination *via* le lait maternel. En effet, jusqu'à 3 semaines (âge du sevrage) les souris ne sont nourries que par allaitement. Ceci démontre qu'il y a bien un transfert par le lait maternel du ^{90}Sr , en accord avec les modèles de biocinétique disponibles (Synhaeve *et al.* 2011; Shagina *et al.* 2015a; Shagina *et al.* 2015b; Shagina *et al.* 2015c).

Dans l'organisme, l'accumulation de ^{90}Sr conduit à un dépôt de dose d'irradiation aux organes environnants. Les calculs de la dose absorbée au squelette et au corps entier ont été réalisés grâce au logiciel de calcul RODES (LEDI, IRSN). Que ce soit pour le squelette ou le corps entier, les profils des doses absorbées sont similaires. La dose cumulée est très faible jusqu'à 7 semaines,

puis une augmentation en fonction de la concentration de ^{90}Sr initialement présente dans l'eau de boisson est observée. Au corps entier, la dose maximale cumulée à 24 semaines pour le groupe 4 kBq.L^{-1} est de 1,87 mGy, de 11,48 mGy pour le groupe 20 kBq.L^{-1} et enfin de 49 mGy pour le groupe contaminé à 100 kBq.L^{-1} . Dans le squelette, pour le groupe de souris contaminées à 4 kBq.L^{-1} la dose cumulée est de 11,37 mGy, de 70 mGy pour 20 kBq.L^{-1} et enfin de 296 mGy pour le groupe contaminé à 100 kBq.L^{-1} . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de précédentes études et sont plus précis grâce à la possibilité de calculer la répartition de la dose entre les différents organes, ce que ne permet pas l'utilisation des coefficients du modèle de la CIPR.

Ces résultats confirment les observations précédentes concernant la biocinétique du ^{90}Sr qui ont démontré que l'os est le site préférentiel d'accumulation de ^{90}Sr . Cette accumulation est en relation avec la physiologie osseuse et varie proportionnellement avec la concentration de ^{90}Sr initialement présente dans l'eau de boisson. De plus, les calculs de la dose absorbée sont en accord avec la localisation du ^{90}Sr dans l'organisme, avec une dose cumulée au squelette beaucoup plus importante que celle au corps entier. Les effets du ^{90}Sr seront donc prépondérants au niveau du tissu osseux.

2.2. Effet sur le système hématopoïétique

Comme déjà mentionné, le ^{90}Sr s'incorpore préférentiellement dans l'os dans lequel le rayonnement émis au cours de sa désintégration peut irradier les cellules à proximité (ou du moins dans un rayon de 100 à 200 μm). L'une des populations cellulaires présentes dans l'os et susceptibles d'être atteintes par l'irradiation du ^{90}Sr sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Par ailleurs, la moelle osseuse est l'un des compartiments cellulaires les plus radiosensibles dans l'organisme. L'aplasie médullaire est l'un des effets secondaires les plus fréquents à la suite de traitements par radiothérapie (Mauch *et al.* 1995) et est la première cause de décès après exposition à des irradiations corps entier à des doses fortes (Testa *et al.* 1985). Dans le modèle de contamination interne chronique utilisé au cours de ce travail, le ^{90}Sr qui s'accumule dans l'os aura un effet probablement sur les CSH présentes dans la niche au vu de la portée du rayonnement β - émis au cours de sa désintégration.

De nombreuses études ont largement démontré une suppression de l'hématopoïèse en réponse à une irradiation de la moelle osseuse, notamment par réduction de la prolifération des CSH (Dainiak 2002). De même, l'induction de la sénescence cellulaire a également été décrite dans les CSH à la suite d'une irradiation (Wang *et al.* 2006; Shao *et al.* 2014). Cependant, la particularité de ces cellules est leur différenciation progressive dans la moelle osseuse et en fonction de leur localisation dans le compartiment médullaire, mais aussi selon leur état prolifératif ou quiescent,

leurs propriétés vont différer. Il a été montré que les cellules qui sont dans un état de différenciation plus avancé sont plus radiosensibles que les CSH de la niche. Les CSH sont dans un état quiescent et sont plus radiorésistantes que les autres types cellulaires de la moelle, puisqu'elles doivent assurer le renouvellement permanent des cellules sanguines et immunitaires (Gothot *et al.* 1997). Cette nature radiorésistante pourrait expliquer l'absence de modifications des paramètres sanguins dans notre modèle, en réponse à la contamination. Ceci est d'autant plus conforté par les valeurs faibles des doses maximales cumulées observées à 24 semaines dans le squelette (296 mGy pour la concentration de ^{90}Sr 100 kBq.L⁻¹) et en dessous du seuil d'apparition d'un syndrome hématopoïétique avec aplasie médullaire ou sanguine, qui est de 500 mGy. Cependant, certaines études expérimentales ont mis en évidence une diminution du pool de CSH en réponse à des agents chimiques, sans engendrer d'altération de la NFS à la suite du traitement, démontrant la capacité des cellules restantes à compenser la perte causée (van Os *et al.* 1998; van Os *et al.* 2000). Dans notre modèle il n'est donc pas exclu qu'il y ait une atteinte au niveau des CSH bien qu'aucune différence dans les paramètres sanguins n'ait été observée, ou du moins que ces atteintes ne soient pas assez délétères pour induire des effets visibles jusqu'à 24 semaines de contamination. En effet, du fait de leur faible taux de renouvellement et de l'irradiation continue émise par le ^{90}Sr dans l'os, les CSH exposées pourraient accumuler les dommages causés par une irradiation chronique. De plus, l'étude des populations de la rivière Techa a montré une atteinte progressive des cellules sanguines (Akleyev *et al.* 2010a; Akleyev *et al.* 2010b). Il est donc possible qu'une telle atteinte de l'hématopoïèse, sous forme de la diminution de la NFS, puisse être visible dans notre modèle mais pour des temps d'exposition au-delà de 24 semaines. Par ailleurs, au cours de ce travail aucune analyse des progéniteurs hématopoïétiques dans la rate ou dans la moelle osseuse n'a été menée contrairement à l'étude précédente (Synhaeve *et al.* 2014), mais en se basant sur les faibles niveaux de doses cumulées dans la rate, il est peu probable que des effets soient observés.

Ces résultats sont en accord avec les résultats observés à 20 kBq.L⁻¹ (Synhaeve *et al.* 2014) et pour lesquels aucune modification des paramètres sanguins n'avait été mise en évidence. De plus, ils démontrent qu'à ces niveaux de dose, la contamination par le ^{90}Sr ne semble pas avoir d'effet sur le système hématopoïétique, particulièrement sur la production des cellules sanguines. Ces observations ne permettent pas d'exclure que la contamination par le ^{90}Sr provoque des dommages sur les CSH. Cependant, ils confortent l'hypothèse selon laquelle l'altération de la réponse immunitaire précédemment observée serait une conséquence de l'atteinte du compartiment osseux dans lequel réside la moelle osseuse.

2.3. Effet sur le système immunitaire

A la suite de l'accident de Tchernobyl ou de la contamination de la rivière Techa, les effets sur la santé des populations vivant autour des territoires contaminés se sont manifestés essentiellement au niveau du système immunitaire. Chez les populations exposées juste après l'accident, des déficiences en lymphocytes T avaient été observées (Yarilin *et al.* 1993) ainsi que des modifications dans les taux d'IgG et IgM chez les enfants vivant sur les territoires contaminés (Titov *et al.* 1995). En accord avec les travaux précédemment réalisées au laboratoire, l'évaluation d'un effet de la contamination par le ^{90}Sr sur le système immunitaire a été réalisée dans la rate par l'étude des lymphocytes Th1, Th2 et des Treg mais également dans le plasma par le dosage des isotypes d'immunoglobulines circulantes. Pour les deux paramètres étudiés, aucune modification n'a été mise en évidence entre les différents groupes et ce, quelle que soit la concentration de ^{90}Sr ou le temps d'analyse. Ces mêmes paramètres avaient été analysés au cours de la précédente expérience à la concentration unique de 20 kBq.L^{-1} et aucune modification n'avait été mise en évidence en absence de stimulation antigénique (Synhaeve *et al.* 2016, sous presse). Cependant, ces résultats sont en accord avec les calculs de la dose absorbée à la rate, de l'ordre de $3,72 \text{ mGy}$ pour la plus forte concentration de ^{90}Sr à 24 semaines. De même, pour le thymus, pour lequel la dose cumulée maximale est de $34,5 \text{ mGy}$ à la concentration de 100 kBq.L^{-1} . Ces valeurs sont nettement en dessous des valeurs des doses cumulées maximales pour le corps entier et surtout pour le squelette. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les effets observés précédemment pourraient s'expliquer par un effet dans le tissu osseux, au niveau de la moelle osseuse plus spécifiquement, siège de la différenciation lymphocytaire B.

Au contraire, au cours des expériences de vaccination réalisées avec le KLH ou la TT, une diminution des anticorps anti-TT dans le groupe d'animaux contaminés à 20 kBq.L^{-1} avait été mise en évidence. Aucune modification n'avait été observée en réponse au KLH. En parallèle, une modification de l'équilibre Th1/Th2 dans la rate, avec une diminution des Th1 à 24 semaines avait été mise en évidence. La différence de réponse vaccinale aux deux antigènes s'explique par le fait que le KLH induise une réponse de type Th2 alors que la TT active à la fois les Th1 et les Th2. Il y aurait donc une modification au niveau de la régulation des Th1 engendrée par le ^{90}Sr . Afin de compléter ces résultats, des analyses de la population lymphocytaire B dans la moelle osseuse et la rate ont été effectuées par cytométrie en flux. Que ce soit en steady-state ou après la vaccination, une diminution de la population cellulaire $\text{CD45}^+\text{CD19}^+$ a été observée chez les animaux contaminés, à la fois dans la moelle osseuse et dans la rate (Synhaeve *et al.* 2016, sous presse). Ces marqueurs permettent l'identification des populations lymphocytaires B à différents stades de maturation. Ceci suggère que la diminution des Th1 observée à 24 semaines chez les souris contaminées au ^{90}Sr pourrait être une

conséquence de la diminution des LB dans la moelle osseuse et la rate observée dès 3 semaines de contamination, même en steady-state. En effet, du fait de la dose très faible accumulée au thymus et à la rate, la diminution des cellules CD45⁺CD19⁺ dans la rate pourrait à son tour être une conséquence de la diminution de cette même population cellulaire dans la moelle osseuse, puisque ce sont les LB de la moelle osseuse qui migrent dans la rate pour y terminer leur maturation (Melchers 2015).

L'une des perspectives majeures de ce travail serait d'analyser plus en détail les étapes de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse, afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications en réponse aux différentes concentrations de ⁹⁰Sr ingérées et confirmer les précédents résultats. Ceci est d'autant plus intéressant, car de précédentes études ont démontré que les LB sont une population cellulaire radiosensible. L'équipe de Nishii (1998) avait observé une augmentation de l'apoptose en réponse à une irradiation par rayons X avec des doses allant de 0,5 à 4 Gy (débit de dose 1 Gy.min⁻¹) dans des précurseurs de LB issus de moelle osseuse de souris Balb/c, l'apoptose étant plus ou moins importante en fonction du stade de différenciation. L'hypothèse émise est que l'accumulation de dommages à l'ADN, même faible (environ 10 CDB/ noyau) était capable d'activer les voies de mort p53-dépendantes et conduire à l'apoptose des différents précurseurs lymphocytaires (Nishii *et al.* 1998).

Plus récemment, une étude a démontré un impact à un stade plus précoce, au niveau de la cellule souche CD34⁺. Dans cette étude il a été observé une diminution de la capacité de CSH issues de souris irradiées par rayons X à 500 mGy en corps entier, à se différencier en LB lors de la mise en culture avec une lignée de cellules stromales et ce, même pour de faibles doses d'irradiation (Wang *et al.* 2015a). Cette diminution de la capacité à se différencier est accompagnée par la diminution de l'expression du gène codant pour le récepteur à l'IL-7 (interleukine responsable du passage au stade pro-B) mais aussi des facteurs de transcription EBF-1 et Pax5, qui empêchent la sortie des cellules vers la voie de différenciation B. De même, des travaux plus spécifiques quant à la transition du stade pro-B à pré-B, suite à une irradiation γ à 5 ou 10 Gy localisée sur la patte, ont montré une diminution globale des populations lymphocytaires dans la moelle osseuse jusqu'à deux semaines après irradiation. Cependant, malgré la diminution des populations pro et pré-B, la transition d'une population à l'autre était observée, ceci témoignant de la rétention de la capacité de ces cellules à se différencier (Han *et al.* 2012). A plus long terme, les différentes populations étaient restaurées dans la moelle osseuse, mettant en évidence un phénomène de compensation. Ceci pourrait être une explication au fait qu'aucune modification des isotypes d'immunoglobulines circulantes n'ait été observée dans notre modèle, laissant suggérer une compensation de production de ces immunoglobulines par les cellules en réponse à la diminution de LB dans la moelle osseuse.

Enfin, la différenciation lymphocytaire B est un phénomène clé dans notre modèle car au cours de ce travail une diminution significative de l'expression génique de l'*Il-6* dans la moelle osseuse en réponse à la contamination par le ^{90}Sr a pu être observée. IL-6 est un facteur impliqué dans de nombreux processus tels que l'inflammation ou encore la senescence (Hunter & Jones 2015), mais joue également un rôle dans la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse en interagissant avec d'autres cytokines. En effet, de récents travaux ont mis en évidence une diminution de la différenciation lymphocytaire B, en réponse à un traitement ciblé par G-CSF sur les cellules stromales de la moelle osseuse. Cette modification se traduit par la diminution de nombreux facteurs dont SDF-1, IGF-1, IL-7 et IL-6 (Day *et al.* 2015). Ceci suggère que la diminution d'IL-6 dans la moelle osseuse en réponse à la contamination par le ^{90}Sr pourrait indiquer un défaut de la différenciation des LB. Ceci reste à confirmer par une analyse plus spécifique de marqueurs exprimés par les LB tels que les IgM, IgD ou encore le B-cell receptor (BCR) et par l'étude *in situ* des différentes étapes du processus de différenciation afin de mettre en évidence un effet du ^{90}Sr sur un stade particulier.

L'ensemble de ces observations suggère que le ^{90}Sr pourrait engendrer des effets sur le processus de différenciation lymphocytaire B, à des stades de différenciation plus tardifs plutôt qu'au niveau des CSH. Ce processus est en partie régulé par les facteurs produits par les CSM, qui présentent un rôle également dans la physiologie osseuse.

2.4. Effet sur la physiologie osseuse

Au cours de ce travail, l'évaluation des effets du ^{90}Sr sur la physiologie osseuse a été menée en se basant sur les travaux antérieurs du laboratoire (Synhaeve *et al.* 2014). Les marqueurs choisis permettent de refléter à la fois le processus de formation osseuse (ALP, OCN, BSP) et celui de résorption (RankL, TRAP5b et OPG). Les mesures des concentrations ont été réalisées à partir du plasma, alors que l'analyse de l'expression génique a été menée sur les futs fémoraux, contrairement à l'étude précédente et pour laquelle l'expression génique de ces marqueurs avait été effectuée sur l'os entier, avec les cellules médullaires. Les modifications observées au cours de ce travail sont donc plus spécifiques du tissu osseux. Plus généralement, il a été observé une diminution de la formation osseuse et une augmentation de la résorption en réponse à la contamination par le ^{90}Sr . Ces résultats sont en accord avec l'étude de Synhaeve *et al.* (2014) pour laquelle la modification des marqueurs de la physiologie osseuse était en faveur d'une résorption. De même, le fait qu'il n'y ait pas de modifications notables dans le groupe d'animaux ingérant du Sr stable ainsi que l'augmentation des effets en fonction de la concentration de ^{90}Sr confirment à nouveau la toxicité radiologique du ^{90}Sr et l'absence de toxicité chimique à ces concentrations.

Les résultats observés au cours de notre étude, dans le cadre d'une contamination chronique par de faibles concentrations de ^{90}Sr , sont analogues à ceux observés avec de plus fortes doses d'irradiation, du moins en ce qui concerne les marqueurs étudiés. Une étude menée chez le rat (Zou *et al.* 2016) a permis de montrer qu'après irradiation localisée de la patte avec une source γ à 20 Gy ($0,8 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) une diminution de la densité et de la masse osseuse ainsi que de la fraction minéralisée était observée. Dans cette étude, les résultats ont également démontré une diminution de l'expression de marqueurs de la formation osseuse tels que l'*Ocn* et une augmentation de ceux spécifiques des ostéoclastes comme *Trap*. Le tout s'accompagne d'une augmentation de la différenciation adipocytaire dans la moelle osseuse, identifiée par l'augmentation de l'expression de *PPAR γ* , au détriment de la différenciation ostéoblastique, marquée par *Runx2*. De même, une autre étude chez la souris irradiée par rayon X au niveau de l'abdomen à des doses allant de 5 à 20 Gy, a également mis en évidence des atteintes au niveau du tissu osseux (Jia *et al.* 2011). Ces atteintes se traduisent par une diminution de la densité osseuse et une perte de la capacité à former de l'os, observée par la diminution de la concentration plasmatique de l'OCN en réponse à l'irradiation. Dans ces travaux, la concentration plasmatique de la TRAP n'est pas modifiée. Également, pour de plus faibles doses d'irradiation γ à 1 et 2 Gy en corps entier chez la souris, une étude a montré une diminution du volume d'os cortical ainsi qu'une augmentation des cellules TRAP positives, marquant les ostéoclastes (Kondo *et al.* 2009).

Concernant les effets pathologiques, il est décrit dans la littérature que l'irradiation directe ou indirecte de l'os, dans le cas des traitements des tumeurs par radiothérapie, peut induire des effets secondaires se traduisant par des atteintes du tissu osseux dans les mois ou les années suivant le traitement. Ces effets peuvent être une ostéopénie, une ostéoporose, une ostéonécrose ainsi qu'une augmentation du risque de fracture (Kwon *et al.* 2008; İğdem *et al.* 2010). Afin de mettre en évidence l'un de ces effets dans notre modèle, une contamination au-delà de 24 semaines avec les mêmes concentrations de ^{90}Sr pourrait être envisagée. Ceci permettrait d'observer d'éventuelles conséquences physiologiques et si la sévérité de celles-ci varie avec la concentration de ^{90}Sr ingérée. De même, l'utilisation d'un modèle d'animaux ovariectomisés (modèle prédisposé à l'ostéoporose) permettrait de démontrer si les effets de l'ostéoporose induite sont aggravés chez les animaux contaminés. Ce dernier modèle pourrait confirmer l'effet du ^{90}Sr sur la résorption osseuse.

Enfin, pour compléter les analyses sur la physiologie osseuse dans notre modèle, des analyses macroscopiques devraient être réalisées afin de démontrer d'éventuelles modifications de la minéralisation de l'os ou encore pour étudier le niveau de différenciation adipocytaire dans la moelle osseuse. En effet, comme démontré par les résultats obtenus sur le modèle *in vitro*, les MS5 présentent une capacité à se différencier en adipocytes qui est augmentée en réponse à la

contamination par le ^{90}Sr . Ce phénomène est retrouvé en réponse à l'irradiation dans le tissu osseux et constitue l'un des mécanismes en lien avec le vieillissement de l'os (Gimble & Nuttal 2004). Les marqueurs en association avec la différenciation adipocytaire, comme *PPAR γ* , ou de ceux impliqués dans la différenciation ostéoblastique, tels que *Runx2* ou encore les facteurs de la famille des BMP, pourraient être étudiés à la fois dans les futs fémoraux mais aussi dans la moelle osseuse. De plus, l'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine pourrait également apporter des éléments de réponse, celle-ci étant la voie principale qui entre dans la régulation de la différenciation du tissu osseux à partir des CSM.

L'ensemble de ces résultats démontre une atteinte du tissu osseux, lieu principal de stockage du ^{90}Sr , en réponse à la contamination. Les effets observés se traduisent par une diminution des marqueurs spécifiques de la formation osseuse et d'une augmentation de ceux impliqués dans le phénomène de résorption. Ces observations confirment les résultats précédemment obtenus (Synhaeve *et al.* 2014) et doivent cependant être complétés avec des analyses plus détaillées, notamment sur la différenciation cellulaire, afin de démontrer le lien entre les mécanismes observés *in vitro* sur les cellules MS5 et ceux observés *in vivo* sur le tissu osseux.

2.5. Les mécanismes d'action

Le but de ce travail a été de comprendre les mécanismes du ^{90}Sr qui pourraient expliquer les effets précédemment observés sur le système immunitaire et sur la physiologie osseuse. Pour cela, l'analyse du niveau de stress oxydant et de la senescence a été réalisée sur l'os, en se basant sur les résultats obtenus grâce au modèle *in vitro*. Les résultats obtenus ont montré tout d'abord une augmentation de l'expression génique de certaines enzymes impliquées dans la défense antioxydante dès 3 semaines de contamination dans le fut fémoral et seulement à 24 semaines dans la moelle osseuse. L'expression de ces marqueurs augmente en fonction de la concentration de ^{90}Sr dans l'eau de boisson. Ceci est en accord avec la localisation du ^{90}Sr qui se loge dans l'os cortical, les effets sont donc plus précoces dans le fut fémoral que dans la moelle osseuse. Bien que les marqueurs pro-oxydants, ni même les activités enzymatiques n'aient été étudiés au cours de ce travail, l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes suggère une implication potentielle du stress oxydant comme mécanisme de réponse de la contamination par le ^{90}Sr .

En effet, la résorption osseuse augmentée en réponse à la contamination par le ^{90}Sr pourrait s'expliquer par une augmentation de la production de ERO, puisqu'il est décrit dans la littérature que les ERO sont capables de stimuler l'activité des ostéoclastes et donc la résorption osseuse (Garrett *et al.* 1990). Des études ont également montré une augmentation de la production de ERO dans la moelle osseuse de souris irradiées à des doses de 2 Gy par une source de ^{137}Cs (Kondo *et al.* 2009). Dans notre modèle, un résultat surprenant est l'absence de modifications du

niveau d'expression du facteur de transcription Nrf2, alors que celui-ci est impliqué dans la régulation de la transcription des enzymes antioxydantes. Par ailleurs, il présente également un rôle indirect dans la régulation de l'ostéoclastogénèse, en régulant la production de ERO induite par la liaison RANK/RANKL dans les précurseurs d'ostéoclastes (Hyeon *et al.* 2013; Kanzaki *et al.* 2013; Kanzaki *et al.* 2014). Le stress oxydant est aussi impliqué dans de nombreuses pathologies liées au vieillissement de l'os et est dû en partie à une diminution des hormones stéroïdiennes avec l'âge (Almeida *et al.* 2007; Cervellati *et al.* 2013; Yang *et al.* 2014). Des travaux ont également mis en évidence une implication des ERO dans la différenciation cellulaire par l'interaction avec la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Hoogeboom & Burgering 2009). Il a été décrit que le facteur de transcription Forkhead box O (FoxO) peut se lier aux ERO et inhiber l'activation de la voie de signalisation Wnt. Cette inhibition contribue à l'activation de l'expression de *PPAR γ* , induisant la différenciation adipocytaire dans la moelle osseuse au détriment de la voie ostéoblastique. Ceci explique l'augmentation de moelle jaune au cours du vieillissement.

L'autre mécanisme qui a été en partie exploré au cours de ce travail a été la sénescence cellulaire par l'étude de *p21*, un marqueur clé de ce phénomène. Ce mécanisme est impliqué dans la survenue de nombreuses pathologies liées à l'âge (athérosclérose, cataracte, ostéoporose,...). Dans le modèle d'effet-dose utilisé au cours de ce travail, les résultats ont montré une augmentation dose-dépendante de l'expression de *p21* dans l'os des animaux dès l'âge de 7 semaines. Ceci suggère une possible induction de la sénescence en réponse à la contamination par le ^{90}Sr . En effet, une récente étude menée chez les liquidateurs de la centrale de Tchernobyl, a démontré des variations dans la longueur des télomères dans les cellules prélevées chez ces individus (Reste *et al.* 2014). De plus, dans cette cohorte il a été observé une précocité dans la survenue des pathologies liées au vieillissement par rapport à la population générale, ceci étant associé au raccourcissement des télomères dans les cellules. Néanmoins, les observations dans notre modèle restent à compléter avec l'étude d'autres marqueurs tels que p53 en amont de l'activation de *p21*, ou de *p16*, impliqué dans l'autre voie de signalisation menant à la sénescence cellulaire. En parallèle, les conséquences de la sénescence cellulaire telles que la formation d'un microenvironnement de type pro-inflammatoire pourrait aussi être étudié, en analysant plus spécifiquement les cytokines identifiées *in vitro* (IL-1ra, M-CSF, MCP-1, TIMP-1). La réponse inflammatoire est un mécanisme qui est aussi engendré par les ERO et est également impliquée dans de nombreuses pathologies liées à l'âge comme l'arthrose rhumatoïde par exemple (Filippin *et al.* 2008).

Ces résultats ne constituent qu'un début d'étude quant aux mécanismes d'action du ^{90}Sr dans l'os. Cependant l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes et de l'expression du

marqueur *p21* permettent de constituer un début de mécanisme dans le modèle *in vivo*. En se basant sur les résultats *in vitro*, les autres mécanismes qu'il faudrait étudier plus en détail sont l'induction de CDB, la production de ERO suggérée par nos analyses pouvant être à l'origine de ce phénomène. De plus, la mortalité cellulaire est également un mécanisme permettant d'expliquer la diminution de cellules CD45⁺CD19⁺ observée lors de l'étude du système immunitaire et pourrait s'expliquer en partie par l'accumulation cellulaire de ERO.

Le mécanisme général du ⁹⁰Sr pour le modèle *in vivo* est résumé dans la **Figure 80** (page 186).

3. Mécanisme général

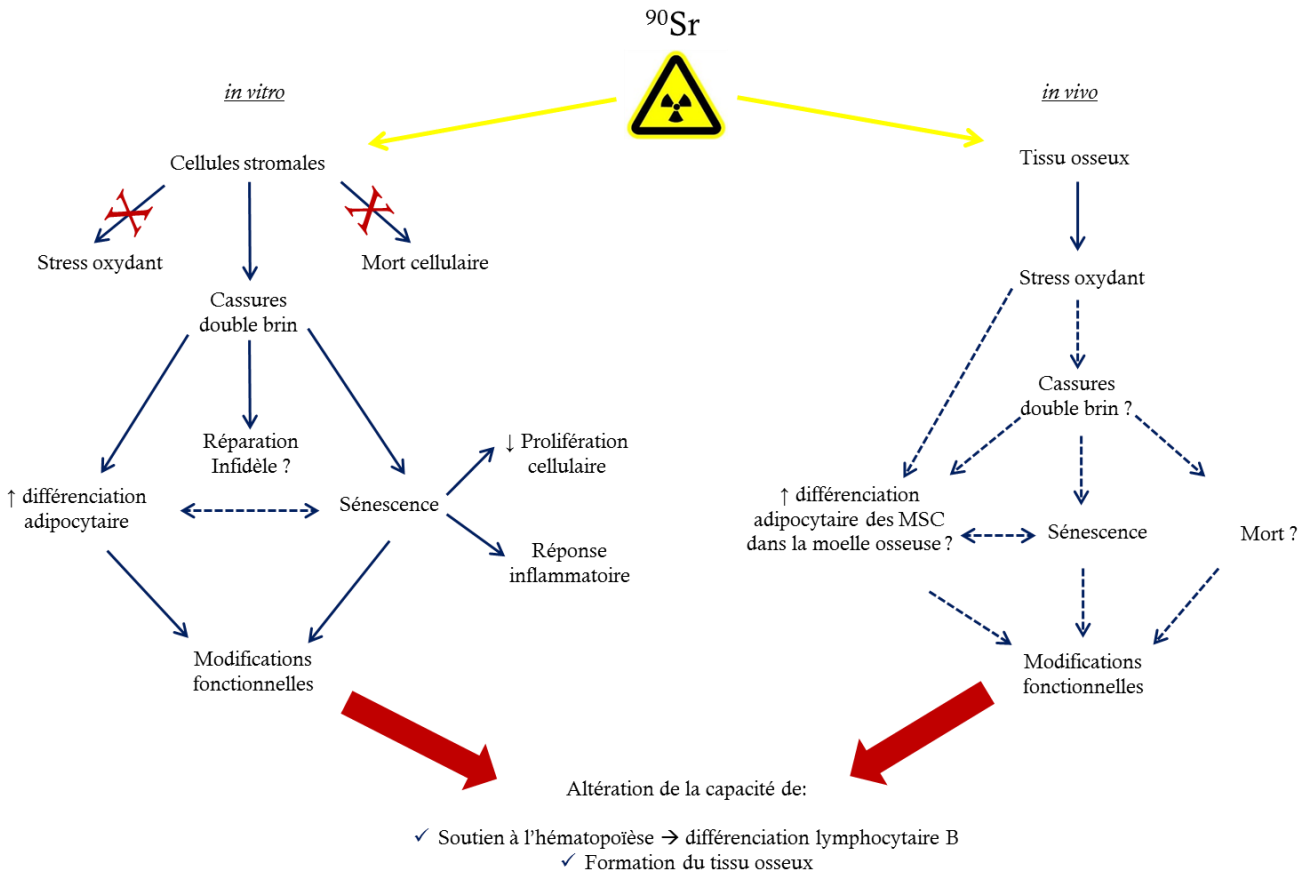


Figure 80: Mécanisme d'action général du ^{90}Sr *in vitro* et *in vivo*

Les flèches pleines indiquent les effets observés au cours de ce travail.

Les flèches en pointillé représentent les hypothèses à tester afin de compléter le modèle

4. Conclusion et perspectives

Le but de ce travail de thèse a été d'une part de confirmer les précédents résultats obtenus avec la concentration unique de ^{90}Sr à 20 kBq.L^{-1} , concentration de référence, mais également de comprendre les mécanismes d'action du ^{90}Sr dans son organe de stockage principal, l'os. Bien que des effets sur un type cellulaire spécifique, les cellules stromales, aient été mis en évidence grâce au modèle *in vitro* de cellules MS5, l'enjeu majeur de ce travail serait d'analyser plus spécifiquement la niche hématopoïétique. En effet, celle-ci se situe à l'interface entre l'os cortical et la moelle osseuse et est donc une cible privilégiée pour le rayonnement émis par le ^{90}Sr au cours de sa désintégration. Cette étude pourrait être réalisée *in vitro* en utilisant comme support un modèle de niche endostéale en 3 dimensions, composée par des CSH et des CSM issues de moelle osseuse (Leisten *et al.* 2012). Cependant, l'analyse *in vivo* sur des coupes de tissu osseux par immunomarquages spécifiques de la niche (N-caherine et nestine) pourraient améliorer la compréhension des mécanismes d'action. Il est donc possible que des dommages à l'ADN puissent être observés dans les cellules qui composent la niche : les CSH, les CSM et les ostéoblastes. Ces dommages pourraient être une conséquence du stress oxydant mis en évidence par l'étude de l'expression génique des enzymes impliquées dans la défense antioxydante *in vivo*. L'une des conséquences du stress oxydant pourrait être l'induction de la sénescence cellulaire aboutissant à des altérations de la fonction de soutien à la différenciation des CSH. D'après les résultats obtenus, c'est le processus de différenciation lymphocytaire B qui semble être altéré et dont les différentes étapes doivent être analysées plus en détail afin de démontrer un effet du ^{90}Sr à un ou plusieurs stades. Ces mécanismes pourraient expliquer les effets observés chez les personnes vivant autour des territoires contaminés. Ces effets se traduisent par l'augmentation de la mortalité par leucémie, par une diminution du taux de remodelage osseux mais aussi par l'apparition précoce de maladies liées au vieillissement comme l'ostéoporose. Des analyses phénotypiques au-delà de 24 semaines de contamination pourraient être réalisées pour mettre en évidence de tels effets pathologiques.

Le modèle *in vivo* de contamination chronique par l'eau de boisson, utilisé au cours de ce travail de thèse permet de modéliser au mieux la situation sur les territoires contaminés. Cependant, le ^{90}Sr n'est pas le seul radioélément rejeté à la suite des catastrophes nucléaires et dont la demi-vie est longue. Le ^{137}Cs fait également partie des rejets environnementaux majoritaires et est largement impliqué dans l'apparition de pathologies. Des études menées au laboratoire ont montré un effet du ^{137}Cs sur la physiologie cardiovasculaire, notamment lors de la progression de la pathologie athéromateuse (Le Gallic *et al.* 2015). Plus généralement, les études épidémiologiques tiennent compte de la contamination globale et de l'irradiation, sans distinction entre les effets spécifiques au ^{90}Sr ou au ^{137}Cs . Les études expérimentales concernant les effets de

contamination chronique par ces deux radionucléides ont permis de mettre en évidence pour chacun d'eux des effets bien précis sur la physiologie cardiovasculaire pour le ^{137}Cs et sur le système immunitaire et la physiologie osseuse pour le ^{90}Sr . Afin d'avoir un modèle vraiment représentatif de la situation actuelle sur les territoires contaminés, une étude toxicologique combinant une double exposition ^{137}Cs et ^{90}Sr pourrait être envisagée afin d'observer les effets d'une multipollution. Ce type d'étude a été mené dans les années 1970. Une première équipe s'était intéressée uniquement à la survie de rats en réponse à la co-contamination, sans analyser d'autres paramètres (Thomas & Thomas 1970). Cette étude avait démontré une augmentation de la mortalité précoce des animaux co-contaminés par rapport aux animaux contrôles ou aux animaux contaminés avec du ^{90}Sr ou du ^{137}Cs seuls. Une équipe avait réalisé une étude de contamination de souris sur 10 générations et s'était également intéressée à l'étude de paramètres généraux (reproduction, sexe-*ratio*, survie) en réponse à la co-contamination. Ces travaux ont permis de démontrer un effet sur la reproduction dès la deuxième génération dans le groupe de souris contaminées aux plus fortes concentrations de ^{90}Sr et ^{137}Cs , ainsi qu'une diminution de la durée de vie des souris, une modification du sexe-*ratio* et une diminution du nombre d'animaux par portée (Nishio *et al.* 1967; Nishio *et al.* 1968; Nishio 1971). Cependant dans cette dernière étude, aucune comparaison par rapport à une contamination unique de ^{90}Sr ou ^{137}Cs n'a été réalisée. Actuellement, ces études sont les seules disponibles concernant la co-contamination. Par ailleurs, les populations vivant sur les territoires contaminés ont essentiellement une activité agricole, il serait donc intéressant d'étudier la combinaison de ^{137}Cs et ^{90}Sr avec d'autres polluants environnementaux persistants (pesticides) dont certains sont des perturbateurs endocriniens. Ce modèle permettrait de vraiment modéliser une exposition quotidienne et trouve un intérêt majeur, puisque les études concernant les multi-expositions aux radionucléides sont inexistantes.

L'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse a permis compléter les données déjà existantes sur le ^{90}Sr mais aussi de mieux comprendre les mécanismes d'action du ^{90}Sr sur les cellules stromales médullaires qui sont au centre de la régulation immuno-hématopoïétique. A terme, ce travail pourrait conduire à l'amélioration de la radioprotection des populations vivant encore aujourd'hui sur les territoires contaminés.

VALORISATIONS

Liste des publications et présentations

Acceptées ou soumises

Senescence induction by Strontium 90 exposure at low concentration in mesenchymal stromal cells: functional consequences

S. Musilli, N. Nicolas, Z. El Ali, P. Orellana-Moreno, C. Grand, K. Tack, S. Kerdine-Römer, J.M. Bertho
Soumis, Scientific Reports

Immune system modifications induced in a mouse model of chronic exposure to ⁹⁰Sr

N. Synhaeve, S. Musilli, J. Stefani, N. Nicolas, O. Delissen, I. Dublineau, J.M. Bertho
Radiation Research 185(3):267-284. 2016

Chronic exposure to low concentrations of Strontium 90 affects bone physiology but not the hematopoietic system in mice

N. Synhaeve, M. Wade-Gueye, S. Musilli, J. Stefani, L. Grandcolas, G. Gruel, M. Souidi, I. Dublineau, J. M. Bertho
Journal of Applied Toxicology 34(1): 76-86. 2014

En préparation

Contamination interne en situation post-accidentelle: données récentes et perspectives

S. Musilli, J.M. Bertho

Autre

DNA damage and senescence induction in mesenchymal stromal cells during exposure to Strontium 90

S. Musilli, N. Nicolas, Z. El Ali, S. Kerdine-Römer, J. M. Bertho
Toxicology Letters 238(2, Supplement): S286-S287. 2015

Présentations orales

Etude des mécanismes d'action du Strontium 90 sur le système immunitaire à la suite d'une contamination chronique

14^{èmes} Journées de l'Ecole doctorale en Innovation Thérapeutique, 17 et 18 Juin 2014
Faculté de pharmacie, Châtenay-Malabry, France

Posters

DNA damage and senescence induction in mesenchymal stromal cells during exposure to Strontium 90

Eurotox, 13-16 Septembre 2015, Porto, Portugal

DNA damage and senescence induction in mesenchymal stromal cells during exposure to Strontium 90

15^{èmes} Journées de l'Ecole doctorale en Innovation Thérapeutique, 16 et 17 Juin 2015

Faculté de pharmacie, Châtenay-Malabry, France

Study of action mechanisms of Strontium 90 on mesenchymal stromal cells after chronic contamination

European Radiation Research society (ERR), 14-19 Septembre 2014, Rhodes, Grèce

Study of action mechanisms of ⁹⁰Sr on immune system after chronic contamination

Young Researchers in Life Science, 26-28 Mai 2014, Institut Pasteur, Paris, France

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Acosta, J. C. and Gil, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends in Cell Biology* **22**(4): 211-219.
- Ahmadzadeh, A., Norozi, F., Shahrabi, S., Shahjahani, M. and Saki, N. (2016). Wnt/beta-catenin signaling in bone marrow niche. *Cell and Tissue Research* **363**(2): 321-335.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**(4): 783-801.
- Akira, S. (2009). Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**(4): 143-156.
- Akleyev, A. V., Kossenko, M. M., Silkina, L. A., Degteva, M. O., Yachmenyov, V. A., Awa, A., Akiyama, M., Veremeyeva, G. A., Vozilova, A. V., Kyojumi, S. and et al. (1995). Health effects of radiation incidents in the southern Urals. *Stem Cells* **1**: 58-68.
- Akleyev, A. V., Akushevich, I. V., Dimov, G. P., Veremeyeva, G. A., Varfolomeyeva, T. A., Ukraintseva, S. V. and Yashin, A. I. (2010a). Early hematopoietic effects of chronic radiation exposure in humans. *Health Physics* **99**(3): 330-336.
- Akleyev, A. V., Dimov, G. P. and Varfolomeyeva, T. A. (2010b). Late effects in hemopoiesis and bone tissue among people with incorporated osteotropic isotope ⁹⁰Sr. *Health Physics* **98**(6): 819-824.
- Alessio, N., Del Gaudio, S., Capasso, S., Di Bernardo, G., Cappabianca, S., Cipollaro, M., Peluso, G. and Galderisi, U. (2015). Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget* **6**(10): 8155-8166.
- Allen, D. A., Breen, C., Yaqoob, M. M. and Macdougall, I. C. (1999). Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN- γ and TNF- α . *Journal of Investigative Medicine* **47**(5): 204-211.
- ANSES (2011). AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux résultats de l'étude nationale de surveillance des expositions alimentaires aux substances chimiques (Etude de l'Alimentation Totale 2-2006-2010). **Vol. 1**
- ANSES (2013). AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une évaluation des risques sanitaires liés à la présence de strontium dans les eaux destinées à la consommation humaine. Saisine n° 2012-SA-0262.
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Roberson, P. K., Kousteni, S., O'Brien, C. A., Bellido, T., Parfitt, A. M., Weinstein, R. S., Jilka, R. L. and Manolagas, S. C. (2007). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *The Journal of Biological Chemistry* **282**(37): 27285-27297.
- Asaithamby, A. and Chen, D. J. (2009). Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose γ -irradiation. *Nucleic Acids Research* **37**(12): 3912-3923.
- ATSDR (2004). Toxicological profile for Strontium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

- Ayala-Peña, S. (2013). Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **62**: 102-110.
- Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P. and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* **327**(1-2): 48-60.
- Baglio, S. R., Pegtel, D. M. and Baldini, N. (2012). Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Frontiers in Physiology* **3**.
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L. and van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**(7372): 232-236.
- Bassing, C. H. and Alt, F. W. (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* **3**(8-9): 781-796.
- Bauchinger, M., Salassidis, K., Braselmann, H., Vozilova, A., Pressl, S., Stephan, G., Snigiryova, G., Kozheurov, V. P. and Akleyev, A. (1998). FISH-based analysis of stable translocations in a Techa River population. *International Journal of Radiation Biology* **73**(6): 605-612.
- Becker, A. J., Mc, C. E. and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454.
- Bendall, L. J. and Bradstock, K. F. (2014). G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**(4): 355-367.
- Benjamin, S. A., Hahn, F. F., Chiffelle, T. L., Boecker, B. B., Hobbs, C. H., Jones, R. K., McClellan, R. O. and Snipes, M. B. (1975). Occurrence of Hemangiosarcomas in Beagles with Internally Deposited Radionuclides. *Cancer Research* **35**(7): 1745-1755.
- Bennett, B. G. (2002). Worldwide dispersion and deposition of radionuclides produced in atmospheric tests. *Health Physics* **82**(5): 644-655.
- Berek, C. (2016). Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clinical and Experimental Immunology* **183**(1): 57-64.
- Bertho, J. M., Demarquay, C., Frick, J., Joubert, C., Arenales, S., Jacquet, N., Sorokine-Durm, I., Chau, Q., Lopez, M., Aigueperse, J., Gorin, N. C. and Gourmelon, P. (2001). Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia. *International Journal of Radiation Biology* **77**(6): 703-712.
- Bertho, J.-M., Louiba, S., Faure, M.-C., Tournalias, E., Stefani, J., Siffert, B., Paquet, F. and Dublineau, I. (2010). Biodistribution of ¹³⁷Cs in a mouse model of chronic contamination by ingestion and effects on the hematopoietic system. *Radiation and Environmental Biophysics* **49**(2): 239-248.
- Bertho, J. M., Faure, M. C., Louiba, S., Tournalias, E., Stefani, J., Siffert, B., Paquet, F. and Dublineau, I. (2011). Influence on the mouse immune system of chronic ingestion of ¹³⁷Cs. *Journal of Radiological Protection* **31**(1): 25-39.

- Biancone, L., Bruno, S., Deregibus, M. C., Tetta, C. and Camussi, G. (2012). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrology Dialysis Transplantation* **27**(8): 3037-3042.
- Bieging, K. T., Mello, S. S. and Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* **14**(5): 359-370.
- Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research* **531**(1-2): 37-80.
- Blackburn, E. H., Epel, E. S. and Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* **350**(6265): 1193-1198.
- Bock, T. A. (1997). Assay systems for hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* **15**(S2): 185-195.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**(5349): 349-352.
- Book, S. A., Spangler, W. L. and Swartz, L. A. (1982). Effects of lifetime ingestion of ⁹⁰Sr in beagle dogs. *Radiation Research* **90**(2): 244-251.
- Borghesi, L. (2014). Hematopoiesis in Steady-State versus Stress: Self-Renewal, Lineage Fate Choice, and the Conversion of Danger Signals into Cytokine Signals in Hematopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology* **193**(5): 2053-2058.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**(5): 657-670.
- Bracalente, C., Ibañez, I. L., Molinari, B., Palmieri, M., Kreiner, A., Valda, A., Davidson, J. and Durán, H. (2013). Induction and Persistence of Large γ H2AX Foci by High Linear Energy Transfer Radiation in DNA-Dependent protein kinase-Deficient Cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **87**(4): 785-794.
- Bradley, E. W. and Drissi, M. H. (2010). WNT5A Regulates Chondrocyte Differentiation through Differential Use of the CaN/NFAT and IKK/NF- κ B Pathways. *Molecular Endocrinology* **24**(8): 1581-1593.
- Bradley, T. R. and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **44**(3): 287-300.
- Bradley-Whitman, M. A., Timmons, M. D., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Lynn, B. C. and Lovell, M. A. (2014). Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **128**(2): 294-304.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T. and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**(7051): 660-665.
- Burcham, P. C. (1999). Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutation Research* **443**(1-2): 11-36.

- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **276**(45): 42462-42467.
- Busby, C. C. (2009). Very Low Dose Fetal Exposure to Chernobyl Contamination Resulted in Increases in Infant Leukemia in Europe and Raises Questions about Current Radiation Risk Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **6**(12): 3105-3114.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**(6960): 841-846.
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer* **33**(5): 703-709.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**(4): 513-522.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**(9): 729-740.
- Canalis, E. (2013). Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nature Reviews Endocrinology* **9**(10): 575-583.
- Cao, L., Kawai, H., Sasatani, M., Iizuka, D., Masuda, Y., Inaba, T., Suzuki, K., Ootsuyama, A., Umata, T., Kamiya, K. and Suzuki, F. (2014). A Novel ATM/TP53/p21-Mediated Checkpoint Only Activated by Chronic γ -Irradiation. *PLoS One* **9**(8): e104279.
- Caplan, A. I. and Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* **98**(5): 1076-1084.
- Capulli, M., Paone, R. and Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **561**: 3-12.
- Cardis, E. and Hatch, M. (2011). The Chernobyl Accident — An Epidemiological Perspective. *Clinical Oncology* **23**(4): 251-260.
- Carpenter, A. C. and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology* **11**(8): 666-673.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H. and Moore, M. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* **56**(2): 289-301.
- Cervellati, C., Bonaccorsi, G., Cremonini, E., Bergamini, C. M., Patella, A., Castaldini, C., Ferrazzini, S., Capatti, A., Picarelli, V., Pansini, F. S. and Massari, L. (2013). Bone mass density selectively correlates with serum markers of oxidative damage in post-menopausal women. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **51**(2): 333-338.
- Cervelli, T., Panetta, D., Navarra, T., Andreassi, M. G., Basta, G., Galli, A., Salvadori, P. A., Picano, E. and Del Turco, S. (2014). Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **235**(2): 510-518.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(2, Supplement 2): S3-S23.

- Chapman, J. R., Taylor, M. R. and Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell* **47**(4): 497-510.
- Chaput, N. and Thery, C. (2011). Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology* **33**(5): 419-440.
- Chen, J. H., Hales, C. N. and Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?. *Nucleic Acids Research* **35**(22): 7417-7428.
- Chen, X. L. and Kunsch, C. (2004). Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Current Pharmaceutical Design* **10**(8): 879-891.
- Chen, X. L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H. and Kunsch, C. (2006). Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **290**(5): 9.
- Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X. and Weissman, I. L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(6): 3120-3125.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. and van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO reports* **15**(11): 1139-1153.
- Chimal-Monroy, J., Abarca-Buis, R. F., Cuervo, R., Diaz-Hernandez, M., Bustamante, M., Rios-Flores, J. A., Romero-Suarez, S. and Farrera-Hernandez, A. (2011). Molecular control of cell differentiation and programmed cell death during digit development. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **63**(10): 922-929.
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* **40**(2): 179-204.
- Cipriani, P., Ruscitti, P., Di Benedetto, P., Carubbi, F., Liakouli, V., Berardicurti, O., Ciccia, F., Triolo, G. and Giacomelli, R. (2015). Mesenchymal stromal cells and rheumatic diseases: new tools from pathogenesis to regenerative therapies. *Cytotherapy* **17**(7): 832-849.
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**(Supplement 3): S131-S139.
- Clarke, W. J., Palmer, R. F., Howard, E. B., Hackett, P. L. and Thomas, J. M. (1970). Strontium-90: effects of chronic ingestion on farrowing performance of miniature swine. *Science* **169**(3945): 598-600.
- Cmielova, J., Havelek, R., Soukup, T., Jiroutová, A., Visek, B., Suchánek, J., Vavrova, J., Mokry, J., Muthna, D., Bruckova, L., Filip, S., English, D. and Rezacova, M. (2012). Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology* **88**(5): 393-404.

- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D. and Serrano, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**(7051): 642.
- Cook, D. N. (1996). The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology* **59**(1): 61-66.
- Cooper, C., Fox, K. M. and Borer, J. S. (2014). Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: a nested case-control study in the CPRD. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **25**(2): 737-745.
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C. and Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development* **125**(10-11): 827-848.
- Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology* **15**(3): 185-189.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer* **8**(7): 512-522.
- Dainiak, N. (2002). Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Experimental Hematology* **30**(6): 513-528.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. and Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* **61**(5): 577-587.
- Davies, L. C. and Taylor, P. R. (2015). Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* **144**(4): 541-548.
- Davis, S., Stepanenko, V., Rivkind, N., Kopecky, K. J., Voillequé, P., Shakhtarin, V., Parshkov, E., Kulikov, S., Lushnikov, E., Abrosimov, A., Troshin, V., Romanova, G., Doroschenko, V., Proshin, A. and Tsyb, A. (2004). Risk of Thyroid Cancer in the Bryansk Oblast of the Russian Federation after the Chernobyl Power Station Accident. *Radiation Research* **162**(3): 241-248.
- Davis, S., Day, R. W., Kopecky, K. J., Mahoney, M. C., McCarthy, P. L., Michalek, A. M., Moysich, K. B., Onstad, L. E., Stepanenko, V. F., Voilleque, P. G., Chegerova, T., Falkner, K., Kulikov, S., Maslova, E., Ostapenko, V., Rivkind, N., Shevchuk, V. and Tsyb, A. F. (2006). Childhood leukaemia in Belarus, Russia, and Ukraine following the Chernobyl power station accident: results from an international collaborative population-based case-control study. *International Journal of Epidemiology* **35**(2): 386-396.
- Day, R. B., Bhattacharya, D., Nagasawa, T. and Link, D. C. (2015). Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphopoiesis in mice. *Blood* **125**(20): 3114-3117.
- Day, R. M., Snow, A. L. and Panganiban, R. A. M. (2014). Radiation-induced accelerated senescence: A fate worse than death?. *Cell Cycle* **13**(13): 2011-2012.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P. and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews* **20**(3): 161-171.

- De Bont, R. and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**(3): 169-185.
- de Bruin, A. M., Voermans, C. and Nolte, M. A. (2014). Impact of interferon- γ on hematopoiesis. *Blood* **124**(16): 2479-2486.
- de Graaf, C. A. and Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* **10**(10): 1582-1589.
- de Oliveira, E. M., Suzuki, M. F., Nascimento, P. A. d., da Silva, M. A. and Okazaki, K. (2001). Evaluation of the effect of ^{90}Sr β -radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **476**(1-2): 109-121.
- de Ruig, W. G. and van der Struijs, T. D. (1992). Radioactive contamination of food sampled in the areas of the USSR affected by the Chernobyl disaster. *Analyst* **117**(3): 545-548.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **5**(66): 2.
- Depuydt, J., Baert, A., Vandersickel, V., Thierens, H. and Vral, A. (2013). Relative biological effectiveness of mammography X-rays at the level of DNA and chromosomes in lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology* **89**(7): 532-538.
- Desmots, F., Rissel, M., Loyer, P., Turlin, B. and Guillouzo, A. (2001). Immunohistological analysis of glutathione transferase A4 distribution in several human tissues using a specific polyclonal antibody. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **49**(12): 1573-1580.
- Despars, G., Carbonneau, C. L., Bardeau, P., Coutu, D. L. and Beauséjour, C. M. (2013). Loss of the Osteogenic Differentiation Potential during Senescence Is Limited to Bone Progenitor Cells and Is Dependent on p53. *PLoS One* **8**(8): e73206.
- Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. and Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* **101**(8): 2999-3001.
- Dey, A., Allen, J. and Hankey-Giblin, P. A. (2015). Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood monocytes versus tissue macrophages. *Frontiers in Immunology* **5**.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S. and Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**(10): 3838-3843.
- Diamond, A. M. (2015). The subcellular location of selenoproteins and the impact on their function. *Nutrients* **7**(5): 3938-3948.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I. and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(20): 9363-9367.

- Dingli, D. and Pacheco, J. M. (2010). Modeling the architecture and dynamics of hematopoiesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2**(2): 235-244.
- Dougherty, J.H., Taylor, G.N., & Mays, C.W. (1972). 90Sr toxicity in adult beagles after acute exposure (CONF-710201--). United States
- Drouet M., Delaunay C., Grenier N, Garrigou P., Mayol J.F., Hérodin F (2008). Cytokines in combination to treat radiation-induced myelosuppression: evaluation of SCF + glycosylated EPO + pegylated G-CSF as an emergency treatment in highly irradiated monkeys. *Haematologica* **93**(3): 465-466
- Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N. and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature Immunology* **6**(3): 314-322.
- Dungworth, D. L., Goldman, M., Switzer, J. W. and McKelvie, D. H. (1969). Development of a Myeloproliferative Disorder in Beagles Continuously Exposed to 90Sr. *Blood* **34**(5): 610-632.
- Dürig, J., de Wynter, E. A., Kasper, C., Cross, M. A., Chang, J., Testa, N. G. and Heyworth, C. M. (1998). Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α Receptors in Human CD34+ Hematopoietic Cells and Their Modulation by Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ . *Blood* **92**(9): 3073-3081.
- Ebrahimian, T., Le Gallic, C., Stefani, J., Dublineau, I., Yentrapalli, R., Harms-Ringdahl, M. and Haghdoost, S. (2015). Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Radiation Research* **183**(4): 447-454.
- Eliasson, P. and Jönsson, J.-I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *Journal of Cellular Physiology* **222**(1): 17-22.
- Ellingsen, T., Buus, A. and Stengaard-Pedersen, K. (2001). Plasma monocyte chemoattractant protein 1 is a marker for joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* **28**(1): 41-46.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**(4): 495-516.
- European Medicines Agency (2014). European Medicines Agency recommends that Protelos/Osseor remain available but with further restrictions. EMA/84749/2014
- Endele, M., Etzrodt, M. and Schroeder, T. (2014). Instruction of hematopoietic lineage choice by cytokine signaling. *Experimental Cell Research* **329**(2): 207-213.
- Eyford, J. E. and Bodvarsdottir, S. K. (2005). Genomic instability and cancer: networks involved in response to DNA damage. *Mutation Research* **592**(1-2): 18-28.
- Fei, C., Zhao, Y., Guo, J., Gu, S., Li, X. and Chang, C. (2014). Senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells is accompanied by activation of p53/p21 pathway in myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology* **93**(6): 476-486.
- Feng, Y., Wang, J., Ling, S., Li, Z., Li, M., Li, Q., Ma, Z. and Yu, S. (2014). Differentiation of mesenchymal stem cells into neuronal cells on fetal bovine acellular dermal

- matrix as a tissue engineered nerve scaffold. *Neural Regeneration Research* **9**(22): 1968-1978.
- Feoktistova, M. and Leverkus, M. (2015). Programmed necrosis and necroptosis signalling. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **282**(1): 19-31.
- Filippin, L. I., Vercelino, R., Marroni, N. P. and Xavier, R. M. (2008). Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* **152**(3): 415-422.
- Finkel, M.P., Biskis, B.O., Greco, I. and Camden, R.W. (1972). 90Sr toxicity in dogs: status of Argonne study on influence of age and dosage pattern (CONF-710201). United States
- Fleming, H. E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K. M., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* **2**(3): 274-283.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. and Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* **2015**(421746).
- Fonteneau P (2002). *Immunologie, aide-mémoire illustré 2^e édition*, De Boeck Université
- Franceschi, C. and Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **69**(1).
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. and Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**(4): 331-340.
- Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D. and Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair* **17**: 81-97.
- Galderisi, U., Helmbold, H., Squillaro, T., Alessio, N., Komm, N., Khadang, B., Cipollaro, M., Bohn, W. and Giordano, A. (2008). In Vitro Senescence of Rat Mesenchymal Stem Cells is Accompanied by Downregulation of Stemness-Related and DNA Damage Repair Genes. *Stem Cells and Development* **18**(7): 1033-1042.
- Galle P. (1997) *Métabolisme et toxicité du Strontium*. In : *Toxiques nucléaires*. 2^e édition edn. Masson, Paris, pp105-122
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* **19**(1): 107-120.

- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G. and Linkermann, A. (2014). Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **35**: 24-32.
- Garner, E. and Raj, K. (2008). Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle* **7**(3): 277-282.
- Garrett, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O., Bonewald, L., Poser, J. and Mundy, G. R. (1990). Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* **85**(3): 632-639.
- Ghadge, S. K., Mühlstedt, S., Özcelik, C. and Bader, M. (2011). SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacology & Therapeutics* **129**(1): 97-108.
- Ghandhi, S. A., Weber, W., Melo, D., Doyle-Eisele, M., Chowdhury, M., Guilmette, R. and Amundson, S. A. (2015). Effect of 90Sr internal emitter on gene expression in mouse blood. *BMC Genomics* **16**(1): 1-15.
- Gimble, J. M. and Nuttall, M. E. (2004). Bone and fat: old questions, new insights. *Endocrine* **23**(2-3): 183-188.
- Gluzman, D. F., Sklyarenko, L. M., Zavelevich, M. P., Koval, S. V., Ivanivska, T. S. and Rodionova, N. K. (2015). Overview on association of different types of leukemias with radiation exposure. *Experimental Oncology* **37**(2): 89-93.
- Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N. C., Zhu, H., Shuman, S. and Glickman, M. S. (2005). Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nature Structural and Molecular Biology* **12**(4): 304-312.
- Gong, Z., Calkins, G., Cheng, E.-c., Krause, D. and Niklason, L. E. (2009). Influence of Culture Medium on Smooth Muscle Cell Differentiation from Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering. Part A* **15**(2): 319-330.
- Gothot, A., Pyatt, R., McMahon, J., Rice, S. and Srour, E. F. (1997). Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle. *Blood* **90**(11): 4384-4393.
- Green, D. E. and Rubin, C. T. (2014). Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone* **63**: 87-94.
- 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* **107**(32): 14205-14210.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **20**: 621-667.
- Hall, S. C. and Wells, J. (1988). Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter. Preliminary data following beta irradiation in vitro. *Journal of Radiological Protection* **8**(2): 97.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* **186**: 1-85.
- Hamada, N. and Fujimichi, Y. (2014). Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *Journal of Radiation Research* **55**(4): 629-640.
- Han, D., Zhang, M., Ma, J., Hong, J., Chen, C., Zhang, B., Huang, L., Lv, W., Yin, L., Zhang, A., Zhang, H., Zhang, Z., Vidyasagar, S., Okunieff, P. and Zhang, L. (2012). Transition Pattern and Mechanism of B-lymphocyte Precursors in Regenerated Mouse Bone Marrow after Subtotal Body Irradiation. *PLoS One* **7**(10): e46560.
- Handl, J., Beltz, D., Botsch, W., Harb, S., Jakob, D., Michel, R. and Romantschuk, L. D. (2003). Evaluation of radioactive exposure from ¹³⁷Cs in contaminated areas of northern Ukraine. *Health Physics* **84**(4): 502-517.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-460.
- Harrison, D. E., Jordan, C. T., Zhong, R. K. and Astle, C. M. (1993). Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Experimental Hematology* **21**(2): 206-219.
- Haubner, F., Ohmann, E., Pohl, F., Prantl, L., Strutz, J. and Gassner, H. G. (2013). Effects of radiation on the expression of adhesion molecules and cytokines in a static model of human dermal microvascular endothelial cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **54**(4): 371-379.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **25**: 585-621.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research* **37**: 614-636.
- Herberg, S., Kondrikova, G., Hussein, K. A., Johnson, M. H., Elsalanty, M. E., Shi, X., Hamrick, M. W., Isales, C. M. and Hill, W. D. (2015). Mesenchymal stem cell expression of stromal cell-derived factor-1 β augments bone formation in a model of local regenerative therapy. *Journal of Orthopaedic Research* **33**(2): 174-184.
- Hernandez, L. E., Sobrino-Plata, J., Montero-Palmero, M. B., Carrasco-Gil, S., Flores-Caceres, M. L., Ortega-Villasante, C. and Escobar, C. (2015). Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloids stress. *Journal of Experimental Botany* **66**(10): 2901-2911.
- Hernandez-Martinez, R. and Covarrubias, L. (2011). Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Development Growth and Differentiation* **53**(2): 245-258.
- Ho, C.-Y., Sanghani, A., Hua, J., Coathup, M., Kalia, P. and Blunn, G. (2015). Mesenchymal Stem Cells with Increased Stromal Cell-Derived Factor 1 Expression Enhanced Fracture Healing. *Tissue Engineering. Part A* **21**(3-4): 594-602.
- Hoffman, W., Lakkis, F. G. and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **11**(1): 137-154.

- Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P. S., Lacy, P., Kay, A. B. and Rothenberg, M. E. (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical & Experimental Allergy* **38**(5): 709-750.
- Holley, A. K., Bakthavatchalu, V., Velez-Roman, J. M. and St. Clair, D. K. (2011). Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Sciences* **12**(10): 7114-7162.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A. M. and Silberstein, L. E. (2006). Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors. *Stem Cells* **24**(4): 1030-1041.
- Hoogeboom, D. and Burgering, B. M. (2009). Should I stay or should I go: beta-catenin decides under stress. *Biochimica et Biophysica Acta* **2**: 63-74.
- Hopkins, B. J., Casarett, G. W., Baxter, R. C. and Tuttle, L. W. (1966). A roentgenographic study of terminal pathological changes in skeletons of strontium-90 treated rats. *Radiation Research* **29**(1): 39-49.
- Hosen, M. B., Islam, M. R., Begum, F., Kabir, Y. and Howlader, M. Z. (2015). Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **13**(9): 525-532.
- Hoshi, M., Yamamoto, M., Kawamura, H., Shinohara, K., Shibata, Y., Kozlenko, M. T., Takatsuji, T., Yamashita, S., Namba, H., Yokoyama, N. and et al. (1994). Fallout radioactivity in soil and food samples in the Ukraine: measurements of iodine, plutonium, cesium, and strontium isotopes. *Health Physics* **67**(2): 187-191.
- Houee-Levin, C. and Bobrowski, K. (2013). The use of the methods of radiolysis to explore the mechanisms of free radical modifications in proteins. *Journal of Proteomics* **92**: 51-62.
- Howard, E. B., Clarke, W. J., Karagianes, M. T. and Palmer, R. F. (1969). Strontium-90-induced bone tumors in miniature swine. *Radiation Research* **39**(3): 594-607.
- Howard, E. B. and Janke, C. C. (1970). Immunosuppressive effect of chronic strontium-90 administration to miniature swine. *Experientia* **26**(7): 785.
- Howe, G. R. (2007). Leukemia following the Chernobyl accident. *Health Physics* **93**(5): 512-515.
- Hunter, C. A. and Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* **16**(5): 448-457.
- Hwang, C., Sinsky, A. J. and Lodish, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**(5076): 1496-1502.
- Hyeon, S., Lee, H., Yang, Y. and Jeong, W. (2013). Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radical Biology and Medicine* **65**: 789-799.
- ICRP (1993). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides, part 2. Ingestion dose coefficients. Publication 67. In: *Annals of the ICRP*, vol **23**. vol 3-4. Pergamon press, Oxford
- İğdem, Ş., Alço, G., Ercan, T., Barlan, M., Ganiyusufoğlu, K., Ünalın, B., Turkan, S. and Okkan, S. (2010). Insufficiency Fractures After Pelvic Radiotherapy in Patients

- With Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics* **77**(3): 818-823.
- Islam, M. S., Stemig, M. E., Takahashi, Y. and Hui, S. K. (2015). Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells. *Journal of Radiation Research* **56**(2): 269-277.
- Issaad, C., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W. and Coulombel, L. (1993). A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* **81**(11): 2916-2924
- Italiani, P. and Boraschi, D. (2015). New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Network* **15**(4): 167-176.
- Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H. and Mori, K. J. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Experimental Hematology* **17**(2): 145-153.
- Ivanov, E. P., Tolochko, G. V., Shuvaeva, L. P., Ivanov, V. E., Iaroshevich, R. F., Becker, S., Nekolla, E. and Kellerer, A. M. (1998). Infant leukemia in Belarus after the Chernobyl accident. *Radiation and Environmental Biophysics* **37**(1): 53-55.
- Ivanov, V. K., Tsyb, A. F., Khait, S. E., Kashcheev, V. V., Chekin, S. Y., Maksoutov, M. A. and Tumanov, K. A. (2012). Leukemia incidence in the Russian cohort of Chernobyl emergency workers. *Radiation and Environmental Biophysics* **51**(2): 143-149.
- Iwanaga, M., Hsu, W. L., Soda, M., Takasaki, Y., Tawara, M., Joh, T., Amenomori, T., Yamamura, M., Yoshida, Y., Koba, T., Miyazaki, Y., Matsuo, T., Preston, D. L., Suyama, A., Kodama, K. and Tomonaga, M. (2011). Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *Journal of Clinical Oncology* **29**(4): 428-434.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* **16**(4): 343-353.
- Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., Maddika, S. and Los, M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **17**(1): 12-29.
- James, A. W. (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* **2013**.
- Jia, D., Gaddy, D., Suva, L. J. and Corry, P. M. (2011). Rapid loss of bone mass and strength in mice after abdominal irradiation. *Radiation Research* **176**(5): 624-635.
- Jiang, T., Chen, N., Zhao, F., Wang, X. J., Kong, B., Zheng, W. and Zhang, D. D. (2010). High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Research* **70**(13): 5486-5496.
- Johnston, B. D. and Ward, W. E. (2015). The Ovariectomized Rat as a Model for Studying Alveolar Bone Loss in Postmenopausal Women. *BioMed Research International* **2015**: 635023.

- Jones, G. N., Moschidou, D., Lay, K., Abdulrazzak, H., Vanleene, M., Shefelbine, S. J., Polak, J., de Coppi, P., Fisk, N. M. and Guillot, P. V. (2012). Upregulating CXCR4 in Human Fetal Mesenchymal Stem Cells Enhances Engraftment and Bone Mechanics in a Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta. *Stem Cells Translational Medicine* **1**(1): 70-78.
- Jowsey, J., Rayner, B., Tutt, M. and Vaughan, J. (1953). The Deposition of (90)Sr in Rabbit Bones Following Intravenous Injection. *British Journal of Experimental Pathology* **34**(4): 384-391.
- Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E. N., Mosekilde, L., Steiniche, T. and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* **2**(3): 165-171.
- Kalyan, S. and Prior, J. C. (2010). Bone Changes and Fracture Related to Menstrual Cycles and Ovulation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **20**(3): 213-233.
- Kang, S., Bennett, C. N., Gerin, I., Rapp, L. A., Hankenson, K. D. and MacDougald, O. A. (2007). Wnt Signaling Stimulates Osteoblastogenesis of Mesenchymal Precursors by Suppressing CCAAT/Enhancer-binding Protein α and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Journal of Biological Chemistry* **282**(19): 14515-14524.
- Kanzaki, H., Shinohara, F., Kajiya, M. and Kodama, T. (2013). The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *Journal of Biological Chemistry* **288**(32): 23009-23020.
- Kanzaki, H., Shinohara, F., Kajiya, M., Fukaya, S., Miyamoto, Y. and Nakamura, Y. (2014). Nuclear Nrf2 Induction by Protein Transduction Attenuates Osteoclastogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **77**: 239-248.
- Kaufman, G. N., Massoud, A. H., Dembele, M., Yona, M., Piccirillo, C. A. and Mazer, B. D. (2015). Induction of regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a bridge between adaptive and innate immunity. *Frontiers in Immunology* **6**.
- Kavasi, N., Sahoo, S. K., Arae, H., Yoshida, S., Sorimachi, A. and Tokonami, S. (2015). Measurement of ⁹⁰Sr in contaminated Fukushima soils using liquid scintillation counter. *Radiation Protection Dosimetry* **167**(1-3): 376-379.
- Kengo, K., Atsuko, O. and Ikuo, K. (2013). Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Radiological Protection* **33**(1): 71.
- Khosla, S., Oursler, M. J. and Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**(11): 576-581.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review* **8**(3): 223-246.
- Kiel, M. J. and Morrison, S. J. (2006). Maintaining Hematopoietic Stem Cells in the Vascular Niche. *Immunity* **25**(6): 862-864.
- Kim, W., Kim, M. and Jho, E. H. (2013). Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochemical Journal* **450**(1): 9-21.
- Kim, Y. R., Oh, J. E., Kim, M. S., Kang, M. R., Park, S. W., Han, J. Y., Eom, H. S., Yoo, N. J. and Lee, S. H. (2010). Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *The Journal of Pathology* **220**(4): 446-451.

- Kode, J. A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V. and Hardikar, A. A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* **11**(4): 377-391.
- Kondo, H., Searby, N. D., Mojarrab, R., Phillips, J., Alwood, J., Yumoto, K., Almeida, E. A., Limoli, C. L. and Globus, R. K. (2009). Total-body irradiation of postpubertal mice with (137)Cs acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts. *Radiation Research* **171**(3): 283-289.
- Kossenko, M. M. (1996). Cancer mortality in the exposed population of the Techa River area. *World Health Statistics Quarterly* **49**(1): 17-21.
- Kragelund, B. B., Weterings, E., Hartmann-Petersen, R. and Keijzers, G. (2016). The Ku70/80 ring in Non-Homologous End-Joining: easy to slip on, hard to remove. *Frontiers in Bioscience* **21**: 514-527.
- Krestinina, L. Y., Davis, F. G., Schonfeld, S., Preston, D. L., Degteva, M., Epifanova, S. and Akleyev, A. V. (2013). Leukaemia incidence in the Techa River Cohort: 1953–2007. *British Journal of Cancer* **109**(11): 2886-2893.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(21): 12072-12077.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes and Development* **24**(22): 2463-2479.
- Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M. and Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry* **45**(12): 863-873.
- Kuo, L. J. and Yang, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **22**(3): 305-309.
- Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., Agrawal, S., Schaffer, D. V. and Li, S. (2010). Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* **28**(4): 734-742.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* **113**(Pt 20): 3613-3622.
- Kusunoki, Y. and Hayashi, T. (2008). Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors. *International Journal of Radiation Biology* **84**(1): 1-14.
- Kusunoki, Y., Yamaoka, M., Kubo, Y., Hayashi, T., Kasagi, F., Douple, E. B. and Nakachi, K. (2010). T-Cell Immunosenescence and Inflammatory Response in Atomic Bomb Survivors. *Radiation Research* **174**(6b): 870-876.
- Kwon, J. W., Huh, S. J., Yoon, Y. C., Choi, S.-H., Jung, J. Y., Oh, D. and Choe, B. K. (2008). Pelvic Bone Complications After Radiation Therapy of Uterine Cervical Cancer: Evaluation with MRI. *American Journal of Roentgenology* **191**(4): 987-994.
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y. and Lim, S. K. (2015). Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **40**: 82-88.

- Lamb, C. A., Yoshimori, T. and Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**(12): 759-774.
- Lataillade, J. J., Doucet, C., Bey, E., Carsin, H., Huet, C., Clairand, I., Bottollier-Depois, J. F., Chapel, A., Ernou, I., Gourven, M., Boutin, L., Hayden, A., Carcamo, C., Buglova, E., Joussemet, M., de Revel, T. and Gourmelon, P. (2007). New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regenerative Medicine* **2**(5): 785-794.
- Le Gallic, C., Phalente, Y., Manens, L., Dublineau, I., Benderitter, M., Gueguen, Y., Lehoux, S. and Ebrahimian, T. G. (2015). Chronic Internal Exposure to Low Dose ¹³⁷Cs Induces Positive Impact on the Stability of Atherosclerotic Plaques by Reducing Inflammation in ApoE^{-/-} Mice. *PLoS One* **10**(6).
- Le, O. N., Rodier, F., Fontaine, F., Coppe, J. P., Campisi, J., DeGregori, J., Laverdiere, C., Kokta, V., Haddad, E. and Beausejour, C. M. (2010). Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* **9**(3): 398-409.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D. and Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**(2): 187-195.
- Lee, J.-K., Park, S.-R., Jung, B.-K., Jeon, Y.-K., Lee, Y.-S., Kim, M.-K., Kim, Y.-G., Jang, J.-Y. and Kim, C.-W. (2013). Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **8**(12): e84256.
- Lee, K. J., Saha, J., Sun, J., Fattah, K. R., Wang, S. C., Jakob, B., Chi, L., Wang, S. Y., Taucher-Scholz, G., Davis, A. J. and Chen, D. J. (2015). Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. *Nucleic Acids Research* **27**.
- Legrand, M., Elie, C., Stefani, J., Flores, N., Culeux, C., Delissen, O., Ibanez, C., Lestaevel, P., Eriksson, P. and Dinocourt, C. (2015). Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure. *Neurotoxicology* **52**: 34-45.
- Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M. S., Bovi, M., Neuss, S., Ziegler, P., Wagner, W., Knüchel, R. and Schneider, R. K. (2012). 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials* **33**(6): 1736-1747.
- Lestaevel, P., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P. and Taouis, M. (2013). Cerebral cortex and hippocampus respond differently after post-natal exposure to uranium. *The Journal of Toxicological Sciences* **38**(5): 803-811.
- Lewis, C. M. and Suzuki, M. (2014). Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Research and Therapy* **5**(2): 32.
- Li, W. B., Hollriegel, V., Roth, P. and Oeh, U. (2006). Human biokinetics of strontium. Part I: intestinal absorption rate and its impact on the dose coefficient of ⁹⁰Sr after ingestion. *Radiation and Environmental Biophysics* **45**(2): 115-124.

- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**(6422): 709-715.
- Lindgren, A., Stepanova, E., Vdovenko, V., McMahon, D., Litvinetz, O., Leonovich, E. and Karmaus, W. (2015). Individual whole-body concentration of ¹³⁷Cesium is associated with decreased blood counts in children in the Chernobyl-contaminated areas, Ukraine, 2008-2010. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **25**(3): 334-342.
- Ling, L., Nurcombe, V. and Cool, S. M. (2009). Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* **433**(1-2): 1-7.
- Little, M. P. (2009). Cancer and non-cancer effects in Japanese atomic bomb survivors. *Journal of Radiological Protection* **29**(2A): A43.
- Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, II, Schimel, D., Kuo, C. J., Gutkind, J. S., Hwang, P. M. and Finkel, T. (2007). Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* **317**(5839): 803-806.
- Liu, L.-F., Shen, W.-J., Zhang, Z. H., Wang, L. J. and Kraemer, F. B. (2010). Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR γ and adiponectin. *Journal of Cellular Physiology* **225**(3): 837-845.
- Lo Celso, C., Fleming, H. E., Wu, J. W., Zhao, C. X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Cote, D., Rowe, D. W., Lin, C. P. and Scadden, D. T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* **457**(7225): 92-96.
- Long, F. and Ornitz, D. M. (2013). Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**(1).
- Lopatina, T., Kalinina, N., Karagyaur, M., Stambolsky, D., Rubina, K., Revischin, A., Pavlova, G., Parfyonova, Y. and Tkachuk, V. (2011). Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth *De Novo*. *PLoS One* **6**(3): e17899.
- Lord, B. I., Testa, N. G. and Hendry, J. H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* **46**(1): 65-72.
- Los, M., Burek, C. J., Stroh, C., Benedyk, K., Hug, H. and Mackiewicz, A. (2003). Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discovery Today* **8**(2): 67-77.
- Lowe, S. W., Cepero, E. and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**(7015): 307-315.
- Ludwig, A.-K. and Giebel, B. (2012). Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **44**(1): 11-15.
- Ma, K., Fox, L., Shi, G., Shen, J., Liu, Q., Pappas, J. D., Cheng, J. and Qu, T. (2011). Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurological Research* **33**(10): 1083-1093.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **53**: 401-426.

- Mackie, E. J., Tatarczuch, L. and Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology* **211**(2): 109-121.
- Madabhushi, R., Pan, L. and Tsai, L. H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* **83**(2): 266-282.
- Maeda, K., Takahashi, N. and Kobayashi, Y. (2013). Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *Journal of Molecular Medicine* **91**(1): 15-23.
- Mahajan, K. and Mahajan, N. P. (2015). Cross talk of tyrosine kinases with the DNA damage signaling pathways. *Nucleic Acids Research* **43**(22): 10588-10601.
- Mahaney, B. L., Meek, K. and Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal* **417**(3): 639-650.
- Malik, I. A., Stange, I., Martius, G., Cameron, S., Rave-Frank, M., Hess, C. F., Ellenrieder, V. and Wolff, H. A. (2015). Role of PECAM-1 in radiation-induced liver inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **19**(10): 2441-2452.
- Malik, Q. and Herbert, K. E. (2012). Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Free Radical Research* **46**(4): 554-564.
- Malinovsky, G., Yarmoshenko, I., Zhukovsky, M., Starichenko, V. and Modorov, M. (2013). Strontium biokinetic model for mouse-like rodent. *Journal of Environmental Radioactivity* **118**(0): 57-63.
- Manda, K., Kavanagh, J. N., Buttler, D., Prise, K. M. and Hildebrandt, G. (2014). Low dose effects of ionizing radiation on normal tissue stem cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **761**: 6-14.
- Mao, F., Xu, W. R., Qian, H., Zhu, W., Yan, Y. M., Shao, Q. X. and Xu, H. X. (2010). Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis. *Inflammation Research* **59**(3): 219-225.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. and Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* **2**: 535-562.
- Mariotti, L. G., Pirovano, G., Savage, K. I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K. M. and Schettino, G. (2013). Use of the γ -H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures. *PLoS One* **8**(11): e79541.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **16**(10): 577-586.
- Mauch, P., Constine, L., Greenberger, J., Knospe, W., Sullivan, J., Liesveld, J. L. and Deeg, H. J. (1995). Hematopoietic stem cell compartment: Acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **31**(5): 1319-1339.

- Medina, K. L., Pongubala, J. M. R., Reddy, K. L., Lancki, D. W., DeKoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R. and Singh, H. (2004). Assembling a Gene Regulatory Network for Specification of the B Cell Fate. *Developmental Cell* **7**(4): 607-617.
- Mehrra, B. J., Avraham, T., Soares, M., Fernandez, J. G., Yan, A., Zampell, J. C., Andrade, V. P., Cordeiro, A. P. and Sorrento, C. M. (2010). p21cip/WAF is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. *The FASEB Journal* **24**(12): 4877-4888.
- Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation* **125**(6): 2203-2210.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. and Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**(7308): 829-834.
- Mendez-Ferrer, S., Scadden, D. T. and Sanchez-Aguilera, A. (2015). Bone marrow stem cells: current and emerging concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 12641.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**(2): 485-491.
- Michaelis, J., Kaletsch, U., Burkart, W. and Grosche, B. (1997). Infant leukaemia after the Chernobyl accident. *Nature* **387**(6630):246.
- Mill, A. J., Wells, J., Hall, S. C. and Butler, A. (1996). Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiation Research* **145**(5): 575-585.
- Miller, C. L., Dykstra, B. and Eaves, C. J. (2008). Characterization of Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Current Protocols in Immunology* **Chapter 22**: Unit 22B.2. John Wiley & Sons.
- Minieri, V., Saviozzi, S., Gambarotta, G., Lo Iacono, M., Accomasso, L., Cibrario Rocchietti, E., Gallina, C., Turinetto, V. and Giachino, C. (2015). Persistent DNA damage-induced premature senescence alters the functional features of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **19**(4): 734-743.
- Miyazaki, K., Miyazaki, M. and Murre, C. (2014). The establishment of B versus T cell identity. *Trends in Immunology* **35**(5): 205-210.
- Mizrahi, K. and Askenasy, N. (2014). Physiological functions of TNF family receptor/ligand interactions in hematopoiesis and transplantation. *Blood* **124**(2): 176-183.
- Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M. R., Barry-Holson, K., Le Beau, M. M., Morrison, C. G. and Passegué, E. (2010). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* **7**(2): 174-185.
- Mouiseddine, M., Mathieu, N., Stefani, J., Demarquay, C. and Bertho, J.-M. (2008). Characterization and Histological Localization of Multipotent Mesenchymal

- Stromal Cells in the Human Postnatal Thymus. *Stem Cells and Development* **17**(6): 1165-1174.
- Mück, K., Sinojmeri, M., Whilidal, H. and Steger, F. (2001). The Long-term Decrease of ⁹⁰Sr in the Environment and its Transfer to Man after a Nuclear Fallout. *Radiation Protection Dosimetry* **94**(3): 251-259.
- Murphy, E., Roux-Lombard, P., Rooney, T., Fitzgerald, O., Dayer, J. M. and Bresnihan, B. (2009). Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and periarticular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* **28**(3): 285-291.
- Muruganandan, S., Roman, A. A. and Sinal, C. J. (2009). Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**(2): 236-253.
- Naito, T. and Taniuchi, I. (2010). The network of transcription factors that underlie the CD4 versus CD8 lineage decision. *International Immunology* **22**(10): 791-796.
- Nakashima, T., Hayashi, M. and Takayanagi, H. (2012). New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **23**(11): 582-590.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6): 703-716.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S. and Pickett, C. B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(7): 4536-4541.
- Nicolay, N. H., Sommer, E., Lopez, R., Wirkner, U., Trinh, T., Sisombath, S., Debus, J., Ho, A. D., Saffrich, R. and Huber, P. E. (2013). Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* **87**(5): 1171-1178.
- Nilsson, A. and Book, S. A. (1987). Occurrence and distribution of bone tumors in beagle dogs exposed to ⁹⁰Sr. *Acta Oncologica* **26**(2): 133-138.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M. and Coverdale, J. A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**(8): 2293-2299.
- Nishii, K., Gibbons, D. L., Titley, I., Papworth, D., Goodhead, D. T. and Greaves, M. (1998). Regulation of the apoptotic response to radiation damage in B cell development. *Cell Death and Differentiation* **5**(1): 77-86.
- Nishio, K., Megumi, T. and Yonezawa, M. (1967). Effects of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr administered continuously and through generations upon mice (V). Annual Report of the radiation Center of Osaka prefecture, **Vol.8**: 123-128.
- Nishio, K., Megumi, T. and Yonezawa, M. (1968). Effects of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr administered continuously and through generations upon mice (VI). Annual Report of the radiation Center of Osaka prefecture, **Vol.9**: 86-93.

- Nishio K. (1971). Effects of ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs administered continuously upon mice, (VIII). Abnormality of reproductive function Annual Report of the radiation Center of Osaka prefecture, **Vol.12**: 111-112.
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. and Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology* **15**(3): 160-171.
- O'Shea, J. J. and Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4(+) T cells. *Science* **327**(5969): 1098-1102.
- Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M. and Hirohashi, S. (2008). Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Research* **68**(5): 1303-1309.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience* **14**: 453-501.
- Oriya, A., Takahashi, K., Inanami, O., Miura, T., Abe, Y., Kuwabara, M. and Kashiwakura, I. (2008). Individual differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *The Journal of Radiation Research* **49**(2): 113-121.
- Osmond, D. G. (1985). The ontogeny and organization of the lymphoid system. *Journal of Investigative Dermatology* **85**(1 Suppl): 2s-9s.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M. and Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* **22**(3): 377-384.
- Otsuka, A. and Kabashima, K. (2015). Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy* **70**(2): 131-140.
- Owen, M., Sissons, H. A. and Vaughan, J. (1957). The Effect of a Single Injection of High Dose of (⁹⁰)Sr (500-1000 µc./Kg.) in Rabbits. *British Journal of Cancer* **11**(2): 229-248.
- Palomo, J., Dietrich, D., Martin, P., Palmer, G. and Gabay, C. (2015). The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine* **76**(1): 25-37.
- Pan, Q., Yu, Y., Chen, Q., Li, C., Wu, H., Wan, Y., Ma, J. and Sun, F. (2008). Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *Journal of Cellular Physiology* **217**(1): 228-241.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. and Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**(6): 1039-1056.
- Park, S. B., Kim, C. H., Hong, M., Yang, H.-J. and Chung, C. K. (2016). Effect of a selective estrogen receptor modulator on bone formation in osteoporotic spine fusion using an ovariectomized rat model. *The Spine Journal* **16**(1): 72-81.
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**(5): 985-1001.

- Pastwa, E. and Blasiak, J. (2003). Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochimica Polonica* **50**(4): 891-908.
- Petridou, E., Trichopoulos, D., Dessypris, N., Flytzani, V., Haidas, S., Kalmanti, M., Kolioukas, D., Kosmidis, H., Piperopoulou, F. and Tzortzatou, F. (1996). Infant leukaemia after in utero exposure to radiation from Chernobyl. *Nature* **382**(6589): 352-353.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**(9): e45.
- Pinchuk, I. and Lichtenberg, D. (2014). Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chemistry and Physics of Lipids* **178**: 63-76.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **284**(5411): 143-147.
- Poisson, C., Stefani, J., Manens, L., Delissen, O., Suhard, D., Tessier, C., Dublineau, I. and Gueguen, Y. (2014). Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radical Research* **48**(10): 1218-1231.
- Polo, S. E. and Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes and Development* **25**(5): 409-433.
- Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R. S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., Nagler, A., Lahav, M., Szyper-Kravitz, M., Zipori, D. and Lapidot, T. (2000). Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of Clinical Investigation* **106**(11): 1331-1339.
- Prabhakarapandian, B., Goetz, D. J., Swerlick, R. A., Chen, X. and Kiani, M. F. (2001). Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation* **8**(5): 355-364.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C. and Melton, D. A. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**(5593): 597-600.
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. and Chen, J. (2001). Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *The Journal of Cell Biology* **153**(3): 613-620.
- Reginster, J.-Y. (2014). Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opinion on Drug Safety* **13**(9): 1209-1213.
- Reginster, J. Y., Brandi, M. L., Cannata-Andía, J., Cooper, C., Cortet, B., Feron, J. M., Genant, H., Palacios, S., Ringe, J. D. and Rizzoli, R. (2015). The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. *Osteoporosis International* **26**(6): 1667-1671.
- Rein, K. and Stracker, T. H. (2014). The MRE11 complex: an important source of stress relief. *Experimental Cell Research* **329**(1): 162-169.

- Rehman, A. G., Booth, C. and Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important?. *The British Medical Journal* **322**(7301): 1536-1538.
- Reste, J., Zvigule, G., Zvagule, T., Kurjane, N., Eglite, M., Gabruseva, N., Berzina, D., Plonis, J. and Miklasevics, E. (2014). Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *Journal of Radiation Research* **55**(6): 1089-1100.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**(6938): 409-414.
- Rieger, M. A., Hoppe, P. S., Smejkal, B. M., Eitelhuber, A. C. and Schroeder, T. (2009). Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science* **325**(5937): 217-218.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**(4): 659-672.
- Roach, H. I. and Clarke, N. M. (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *Journal of Bone and Joint Surgery* **82**(4): 601-613.
- Rodier, F. and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology* **192**(4): 547-556.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**(10): 5858-5868.
- Romito, A. and Cobellis, G. (2016). Pluripotent Stem Cells: Current Understanding and Future Directions. *Stem Cells International* **2016**: 20.
- Roth, K. A. and D'Sa, C. (2001). Apoptosis and brain development. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* **7**(4): 261-266.
- Rothenberg, E. V. (2014). Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annual Review of Immunology* **32**: 283-321.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **23**(16): 5706-5715.
- Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. and Rouard, H. (2011). Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques. *Transfusion Clinique et Biologique* **18**(1): 1-12.
- Royall, J. A. and Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2,7-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **302**(2): 348-355.
- Russell, R. C., Yuan, H. X. and Guan, K. L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research* **24**(1): 42-57.
- Ryu, C. H., Park, S. A., Kim, S. M., Lim, J. Y., Jeong, C. H., Jun, J. A., Oh, J. H., Park, S. H., Oh, W.-i. and Jeun, S.-S. (2010). Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis

- via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **398**(1): 105-110.
- Sabin, R. J. and Anderson, R. M. (2011). Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integrity* **2**(1): 2041-9414.
- Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V. and Avigliano, L. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(5): 10497-10538.
- Savitskaya, M. A. and Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry* **80**(11): 1393-1417.
- Schenten, D. and Medzhitov, R. (2011). Chapter 3 - The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System. *Advances in Immunology*. Frederick, Academic Press. **Vol. 109**: 87-124.
- Schonfeld, S. J., Krestinina, L. Y., Epifanova, S., Degteva, M. O., Akleyev, A. V. and Preston, D. L. (2013). Solid Cancer Mortality in the Techa River Cohort (1950–2007). *Radiation Research* **179**(2): 183-189.
- Seita, J. and Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2**(6): 640-653.
- Shabbir, A., Cox, A., Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M. and Van Badiavas, E. (2015). Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells and Development* **24**(14): 1635-1647.
- Shagina, N. B., Tolstykh, E. I., Zalyapin, V. I., Degteva, M. O., Kozheurov, V. P., Tokareva, E. E., Anspaugh, L. R. and Napier, B. A. (2003). Evaluation of age and gender dependences of the rate of strontium elimination 25-45 years after intake: analysis of data from residents living along the Techa river. *Radiation Research* **159**(2): 239-246.
- Shagina, N. B., Fell, T. P., Tolstykh, E. I., Harrison, J. D. and Degteva, M. O. (2015a). Strontium biokinetic model for the pregnant woman and fetus: application to Techa River studies. *Journal of Radiological Protection* **35**(3): 659.
- Shagina, N. B., Tolstykh, E. I., Degteva, M. O., Anspaugh, L. R. and Napier, B. A. (2015b). Age and gender specific biokinetic model for strontium in humans. *Journal of Radiological Protection* **35**(1): 87.
- Shagina, N. B., Tolstykh, E. I., Fell, T. P., Smith, T. J., Harrison, J. D. and Degteva, M. O. (2015c). Strontium biokinetic model for the lactating woman and transfer to breast milk: application to Techa River studies. *Journal of Radiological Protection* **35**(3): 677.
- Shao, L., Feng, W., Li, H., Gardner, D., Luo, Y., Wang, Y., Liu, L., Meng, A., Sharpless, N. E. and Zhou, D. (2014). Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner. *Blood* **123**(20): 3105-3115.

- Siddiqui, M. S., Francois, M., Fenech, M. F. and Leifert, W. R. (2015). Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research* **766**: 1-19.
- Sies, H. and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **311**(1152): 617-631.
- Simon, S. L. and Bouville, A. (2015). Health effects of nuclear weapons testing. *The Lancet* **386**(9992): 407-409.
- Sims, N. A. and Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKey Reports* **3**.
- Singh, V. K., Fatanmi, O. O., Singh, P. K. and Whitnall, M. H. (2012). Role of radiation-induced granulocyte colony-stimulating factor in recovery from whole body gamma-irradiation. *Cytokine* **58**(3): 406-414.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1986). Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Laboratory Investigation* **55**(3): 363-371.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R. U. (2006). p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Research* **66**(23): 11254-11262.
- Souma, T., Suzuki, N. and Yamamoto, M. (2015). Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Frontiers in Physiology* **6**.
- Squillaro, T., Peluso, G. and Galderisi, U. (2015). Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation* **29**: 29.
- Stepanova, E., Karmaus, W., Naboka, M., Vdovenko, V., Mousseau, T., Shestopalov, V. M., Vena, J., Svendsen, E., Underhill, D. and Pastides, H. (2008). Exposure from the Chernobyl accident had adverse effects on erythrocytes, leukocytes, and platelets in children in the Narodichesky region, Ukraine: a 6-year follow-up study. *Environmental Health* **7**(21): 7-21.
- Stevens, J. B., Abdallah, B. Y., Liu, G., Horne, S. D., Bremer, S. W., Ye, K. J., Huang, J. Y., Kurkinen, M., Ye, C. J. and Heng, H. H. (2013). Heterogeneity of cell death. *Cytogenetic and Genome Research* **139**(3): 164-173.
- Stone, K. D., Prussin, C. and Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(2, Supplement 2): S73-S80.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. and Keyes, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**(5): 1119-1130.
- Sugrue, T., Brown, J. A., Lowndes, N. F. and Ceredig, R. (2013). Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem Cells* **31**(1): 137-145.

- Sutherland, H., Eaves, C., Lansdorp, P., Thacker, J. and Hogge, D. (1991). Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* **78**(3): 666-672.
- Suyama, K., Watanabe, M., Sakabe, K., Otomo, A., Okada, Y., Terayama, H., Imai, T. and Mochida, J. (2014). GRP78 suppresses lipid peroxidation and promotes cellular antioxidant levels in glial cells following hydrogen peroxide exposure. *PLoS One* **9**(1).
- Suzuki, J., Fujita, J., Taniguchi, S., Sugimoto, K. and Mori, K. J. (1992). Characterization of murine hemopoietic-supportive (MS-1 and MS-5) and non-supportive (MS-K) cell lines. *Leukemia* **6**(5): 452-458.
- Suzuki, T. and Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine* **88**(Pt B): 93-100.
- Synhaeve, N., Stefani, J., Tournalias, E., Dublineau, I. and Bertho, J.-M. (2011). Biokinetics of ⁹⁰Sr after chronic ingestion in a juvenile and adult mouse model. *Radiation and Environmental Biophysics* **50**(4): 501-511.
- Synhaeve, N., Wade-Gueye, N. M., Musilli, S., Stefani, J., Grandcolas, L., Gruel, G., Souidi, M., Dublineau, I. and Bertho, J. M. (2014). Chronic exposure to low concentrations of strontium 90 affects bone physiology but not the hematopoietic system in mice. *Journal of Applied Toxicology* **34**(1): 76-86.
- Synhaeve, N., Musilli, S., Stefani, J., Nicolas, N., Delissen, O., Dublineau, I. and Bertho, J. M. (2016). Immune System Modifications Induced in a Mouse Model of Chronic Exposure to ⁹⁰Sr. *Radiation Research* **185**(3):267-284.
- Szekanecz, Z., Kim, J. and Koch, A. E. (2003). Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunology* **15**(1): 15-21.
- Szilvassy, S. J. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* **34**(6): 446-460.
- Taichman, R. S. and Emerson, S. G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine* **179**(5): 1677-1682.
- Takada, I., Kouzmenko, A. P. and Kato, S. (2009). Wnt and PPAR[gamma] signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature Reviews Rheumatology* **5**(8): 442-447.
- Takahashi, A. and Ohnishi, T. (2005). Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett* **229**(2): 171-179.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology* **445**: 77-88.
- Tasdemir, N. and Lowe, S. W. (2013). Senescent cells spread the word: non-cell autonomous propagation of cellular senescence. *The EMBO Journal* **32**(14): 1975-1976.
- Testa, N. G., Hendry, J. H. and Molineux, G. (1985). Long-term bone marrow damage in experimental systems and in patients after radiation or chemotherapy. *Anticancer Research* **5**(1): 101-110.

- Thomas, R. G. and Thomas, R. L. (1970). Lethality of ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr administered in combination to rats. *Radiation Research* **42**(2): 282-291.
- 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/Reviews in Mutation Research* **751**(2): 158-246.
- Thurman, G. B., Mays, C. W., Taylor, G. N., Christensen, W. R., Rehfeld, C. E. and Dougherty, T. F. (1971). Growth dynamics of beagle osteosarcomas. *Growth* **35**(2): 119-125.
- Thurman, G. B., Mays, C. W., Taylor, G. N., Keane, A. T. and Sissons, H. A. (1973). Skeletal Location of Radiation-induced and Naturally Occurring Osteosarcomas in Man and Dog. *Cancer Research* **33**(7): 1604-1607.
- Tian, H., Bharadwaj, S., Liu, Y., Ma, P. X., Atala, A. and Zhang, Y. (2010). Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Bladder Cells: Potential for Urological Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Part A* **16**(5): 1769-1779.
- Till, J. E. and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* **14**: 213-222.
- Timár, C. I., Lórinicz, Á. M. and Ligeti, E. (2013). Changing world of neutrophils. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **465**(11): 1521-1533.
- Titov, L. P., Kharitonic, G. D., Gourmanchuk, I. E. and Ignatenko, S. I. (1995). Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Proceedings* **16**(4): 185-193.
- Tolstykh, E., Shagina, N., Degteva, M., Anspaugh, L. and Napier, B. (2011). Does the cortical bone resorption rate change due to ⁹⁰Sr-radiation exposure? Analysis of data from Techa Riverside residents. *Radiation and Environmental Biophysics* **50**(3): 417-430.
- Uccelli, A., Moretta, L. and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **8**(9): 726-736.
- Ullah, I., Subbarao, Raghavendra B. and Rho, Gyu J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports* **35**(2): e00191.
- UNSCEAR (2011). Annex D: health effects due to radiation from Chernobyl accident. Sources and effects of ionizing radiation. United Nations, New-York.
- Vaidya, A. and Kale, V. P. (2015). TGF- β signaling and its role in the regulation of hematopoietic stem cells. *Systems and Synthetic Biology* **9**(1-2): 1-10.
- Valenti, M. T., Garbin, U., Pasini, A., Zanatta, M., Stranieri, C., Manfro, S., Zucal, C. and Dalle Carbonare, L. (2011). Role of Ox-PAPCs in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Runx2 and PPAR γ 2 Expression in MSCs-Like of Osteoporotic Patients. *PLoS One* **6**(6): e20363.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**(1): 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**(1): 44-84.

- van Os, R., Robinson, S., Sheridan, T., Mislow, J. M., Dawes, D. and Mauch, P. M. (1998). Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone marrow stem cell damage caused by repeated administration of cytotoxic agents. *Blood* **92**(6): 1950-1956.
- van Os, R., Robinson, S., Sheridan, T. and Mauch, P. M. (2000). Granulocyte-colony stimulating factor impedes recovery from damage caused by cytotoxic agents through increased differentiation at the expense of self-renewal. *Stem Cells* **18**(2): 120-127.
- Vaseva, Angelina V., Marchenko, Natalie D., Ji, K., Tsirka, Stella E., Holzmann, S. and Moll, Ute M. (2012). p53 Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore to Trigger Necrosis. *Cell* **149**(7): 1536-1548.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D. and Caruso, C. (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development* **128**(1): 83-91.
- Venezia, T. A., Merchant, A. A., Ramos, C. A., Whitehouse, N. L., Young, A. S., Shaw, C. A. and Goodell, M. A. (2004). Molecular Signatures of Proliferation and Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Biology* **2**(10): e301.
- Ventura, C., Cantoni, S., Bianchi, F., Lionetti, V., Cavallini, C., Scarlata, I., Foroni, L., Maioli, M., Bonsi, L., Alviano, F., Fossati, V., Bagnara, G. P., Pasquinelli, G., Recchia, F. A. and Perbellini, A. (2007). Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *The Journal of Biological Chemistry* **282**(19): 14243-14252.
- Vermeij, W. P., Hoeijmakers, J. H. and Pothof, J. (2014). Aging: not all DNA damage is equal. *Current Opinion in Genetics and Development* **26**: 124-130.
- Visweswaran, M., Pohl, S., Arfuso, F., Newsholme, P., Dilley, R., Pervaiz, S. and Dharmarajan, A. (2015). Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells – To Wnt, or not Wnt. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **68**: 139-147.
- 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): 111-117.
- Vozilova, A. V., Shagina, N. B., Degteva, M. O. and Akleyev, A. V. (2013). Chronic radioisotope effects on residents of the Techa River (Russia) region: Cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. *Mutation Research/Fundamental and Environmental Mutagenesis* **756**(1-2): 115-118.
- Vulpis, N. and Scarpa, G. (1986). Induction of chromosome aberrations by ⁹⁰Sr β-particles in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **163**(3): 277-283.
- Wang, C., Oshima, M., Sashida, G., Tomioka, T., Hasegawa, N., Mochizuki-Kashio, M., Nakajima-Takagi, Y., Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Imai, K., Nakachi, K. and Iwama, A. (2015a). Non-Lethal Ionizing Radiation Promotes Aging-Like Phenotypic Changes

- of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Humanized Mice. *PLoS One* **10**(7): e0132041.
- Wang, H., Chen, Q., Lee, S.-H., Choi, Y., Johnson, F. B. and Pignolo, R. J. (2012). Impairment of Osteoblast Differentiation Due to Proliferation-independent Telomere Dysfunction in Mouse Models of Accelerated Aging. *Aging Cell* **11**(4): 704-713.
- Wang, H., Zhang, P., Liu, L. and Zou, L. (2013). Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche. *Critical Review in Oncology/Hematology* **85**(1): 1-8.
- Wang, W., Yu, S., Zimmerman, G., Wang, Y., Myers, J., Yu, V. W., Huang, D., Huang, X., Shim, J., Huang, Y., Xin, W., Qiao, P., Yan, M., Scadden, D. T., Stanley, P., Lowe, J. B., Huang, A. Y., Siebel, C. W. and Zhou, L. (2015b). Notch Receptor-Ligand Engagement Maintains Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Niche Retention. *Stem Cells* **33**(7): 2280-2293.
- Wang, Y., Schulte, B. A., LaRue, A. C., Ogawa, M. and Zhou, D. (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* **107**(1): 358-366.
- Wang, Y., Zhu, G., Wang, J. and Chen, J. (2016). Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports* **13**(1): 213-223.
- Ward, I. M. and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(51): 47759-47762.
- Weber, J. M. and Calvi, L. M. (2010). Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone* **46**(2): 281-285.
- Wedemeyer, J., Tsai, M. and Galli, S. J. (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Current Opinion in Immunology* **12**(6): 624-631.
- White, R. G., Raabe, O. G., Culbertson, M. R., Parks, N. J., Samuels, S. J. and Rosenblatt, L. S. (1993). Bone sarcoma characteristics and distribution in beagles fed strontium-90. *Radiation Research* **136**(2): 178-189.
- Wilson, A. and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology* **6**(2): 93-106.
- Wu, X., Yang, N., Zhou, W. H., Xu, J., Chen, J. J., Zheng, F. M., Long, Z. J., Yue, C. F., Ai, K. X., Liu, L. L., Wan, X. Y. and Liu, Q. (2014). Up-regulation of P21 inhibits TRAIL-mediated extrinsic apoptosis, contributing resistance to SAHA in acute myeloid leukemia cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* **34**(2): 506-518.
- Wu, Y., Wang, J., Scott, P. G. and Tredget, E. E. (2007). Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration* **15**: S18-S26.
- Xu, M., Yu, Q., Subrahmanyam, R., Difilippantonio, M. J., Ried, T. and Sen, J. M. (2008). Beta-catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **28**(5): 1713-1723.

- Yamaguchi, M. and Kashiwakura, I. (2013). Role of reactive oxygen species in the radiation response of human hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One* **8**(7).
- Yan, L. J. (2014). Protein redox modification as a cellular defense mechanism against tissue ischemic injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **343154**(10): 5.
- Yang, Y., Zheng, X., Li, B., Jiang, S. and Jiang, L. (2014). Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **451**(1): 86-92.
- Yarilin, A. A., Belyakov, I. M., Kusmenok, O. I., Arshinov, V. Y., Simonova, A. V., Nadezhina, N. M. and Gnezditskaya, E. V. (1993). Late T cell deficiency in victims of the Chernobyl radiation accident: possible mechanisms of induction. *International Journal of Radiation Biology* **63**(4): 519-528.
- Yonekawa, T. and Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in Biochemistry* **55**: 105-117.
- Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M. and Narita, M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes and Development* **23**(7): 798-803.
- Yu, B., Kim, H. W., Gong, M., Wang, J., Millard, R. W., Wang, Y., Ashraf, M. and Xu, M. (2015). Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *International Journal of Cardiology* **182**: 349-360.
- Zablotska, L. B., Ron, E., Rozhko, A. V., Hatch, M., Polyanskaya, O. N., Brenner, A. V., Lubin, J., Romanov, G. N., McConnell, R. J., O'Kane, P., Evseenko, V. V., Drozdovitch, V. V., Luckyanov, N., Minenko, V. F., Bouville, A. and Masyakin, V. B. (2011). Thyroid cancer risk in Belarus among children and adolescents exposed to radioiodine after the Chornobyl accident. *British Journal of Cancer* **104**(1): 181-187.
- Zablotska, L. B., Bazyka, D., Lubin, J. H., Gudzenko, N., Little, M. P., Hatch, M., Finch, S., Dyagil, I., Reiss, R. F., Chumak, V. V., Bouville, A., Drozdovitch, V., Kryuchkov, V. P., Golovanov, I., Bakhanova, E., Babkina, N., Lubarets, T., Bebeshko, V., Romanenko, A. and Mabuchi, K. (2013). Radiation and the Risk of Chronic Lymphocytic and Other Leukemias among Chornobyl Cleanup Workers. *Environmental Health Perspectives* **121**(1): 59-65.
- Zhang, D.-y., Wang, H.-j. and Tan, Y.-z. (2011). Wnt/ β -Catenin Signaling Induces the Aging of Mesenchymal Stem Cells through the DNA Damage Response and the p53/p21 Pathway. *PLoS One* **6**(6): e21397.
- Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Katakowski, M., Xin, H., Mahmood, A. and Xiong, Y. (2015). Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery* **122**(4): 856-867.
- Zheng, L., Fan, H. S., Sun, J., Chen, X. N., Wang, G., Zhang, L., Fan, Y. J. and Zhang, X. D. (2010). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by

collagen-based hydrogel: An in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **93A**(2): 783-792.

Zou, Q., Hong, W., Zhou, Y., Ding, Q., Wang, J., Jin, W., Gao, J., Hua, G. and Xu, X. (2016). Bone marrow stem cell dysfunction in radiation-induced abscopal bone loss. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **11**(1): 015-0339.

Titre : Etude des mécanismes d'action du Strontium 90 sur le système immunitaire à la suite d'une contamination chronique

Mots clés : Strontium 90, faible dose, système immunitaire, physiologie osseuse, cassures double brin, senescence

Résumé : A la suite des catastrophes nucléaires d'importantes quantités de radionucléides ont été rejetés dans l'environnement. Le Strontium 90 (^{90}Sr) fait partie de ces rejets. Du fait de sa demi-vie de 29 ans, c'est un polluant persistant qui conduit à la contamination des populations vivant autour des territoires contaminés via l'ingestion chronique de faibles quantités de ce radionucléide. Les études épidémiologiques ont mis en évidence des effets au niveau du système immunitaire, du système hématopoïétique et de la physiologie osseuse chez l'homme. Le ^{90}Sr qui s'incorpore principalement dans l'os pourrait contribuer à l'apparition de ces effets. Le but de ce travail a été de comprendre quels sont les mécanismes d'action du ^{90}Sr qui permettent d'expliquer de tels effets. Un premier modèle *in vitro* utilisant une lignée de cellules stromales murines (MS5) contaminées par le milieu de culture à 1 ou 10 kBq.mL^{-1} a été utilisé. Il a permis de montrer que le ^{90}Sr était capable d'induire des cassures double-brin de l'ADN dès 30 minutes

d'exposition avec une induction de la senescence et une altération de la fonction de support aux progéniteurs hématopoïétiques. Dans le deuxième modèle *in vivo* d'effet dose, des souris Balb/c ont été contaminées durant 24 semaines à des concentrations de ^{90}Sr de 4, 20 et 100 kBq.L^{-1} dans l'eau de boisson. Cette expérience a permis d'observer une augmentation des marqueurs de la résorption osseuse en fonction de la contamination au ^{90}Sr ainsi et une augmentation de l'expression génique des enzymes impliquées dans la défense antioxydante. Une augmentation de p21, marqueur de la senescence et une diminution d'IL-6 ont également été observées. Les implications de ces résultats sur la physiologie osseuse, le système immunitaire et hématopoïétiques sont discutées. Globalement, l'ensemble de ce travail complète les données déjà existantes sur le ^{90}Sr et permet de mieux comprendre les mécanismes d'action du ^{90}Sr sur les cellules stromales médullaires qui sont au centre de la régulation immuno-hématopoïétique.

Title : Study of action mechanisms of Strontium 90 on the immune system after a chronic contamination

Keywords : Strontium 90, low dose, immune system, bone physiology, double-strand breaks, senescence

Abstract : After nuclear disasters, large amounts of radionuclides were released into the environment. Strontium 90 (^{90}Sr) is part of these wastes. Because of its half-life of 29 years, it is a persistent pollutant which leads to the contamination of surrounding populations through the chronic ingestion of low quantities of this radioelement. Epidemiologic studies have demonstrated some effects on immune system, hematopoietic system and bone physiology in humans. ^{90}Sr accumulates mostly in bones and could contribute to the appearance of such effects. The aim of this work is to understand the action mechanisms which could explain the previous observations. In the first *in vitro* model, a murine stromal cell line (MS5) contaminated through the culture medium with 1 or 10 kBq.mL^{-1} of ^{90}Sr was used. Thank to this model, an increased number of DNA double-strand breaks

in cells after 30 minutes of exposure, a senescence induction and a modification in the support of hematopoietic progenitors were observed. In the second model, Balb/c mice were contaminated during 24 weeks through drinking water containing ^{90}Sr at 4, 20 and 100 kBq.L^{-1} . Both an increase in genic expression of bone resorption markers and in antioxydative enzymes were observed. An increase in p21 expression, marker of senescence, and a decrease in IL-6 were also seen. The implications of these results on bone physiology, immune and hematopoietic systems are discussed. As a whole, all this work completed the preexistent data about ^{90}Sr and contributes to a better understanding of the action mechanisms of ^{90}Sr on marrow stromal cells which have a pivotal function in the regulation of the immune and hematopoietic system.