

The logo for IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) features the letters 'IRSN' in a bold, sans-serif font. The 'I', 'R', and 'S' are red, while the 'N' is blue.

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Approche intégrée des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines.

Cécile Dubois

ISRN/IRSN-2018/206

Le 28 novembre 2017

Laboratoire de recherche sur les effets des radionucléides sur les écosystèmes.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie Santé

**École doctorale n°168 Sciences chimiques et biologiques pour la santé
Unité de recherche Institut des Biomolécules Max Mousseron**

**Approche intégrée des dommages des
rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis
elegans* : de l'ADN aux protéines**

Présentée par Cécile Dubois Le 28 Novembre 2017

Sous la direction de Simon Galas

Devant le jury composé de

M. Jean Armengaud, Directeur de recherche, CEA, Marcoule

Mme Laurence Blanchard, Chargée de recherche, CNRS, Aix-Marseille

Mme Anne-Laure Bulteau, Chargée de recherche, CNRS, Lyon

Mme Elena Gomez, Professeur, Hydrosciences, Montpellier

M. Simon Galas, Professeur, IBMM, Montpellier

Mme Sandrine Frelon, Ingénieur, IRSN, Cadarache

Président du jury

Membre du jury

Rapporteur

Membre du jury

Directeur de thèse

Membre du jury



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier l'IRSN, et plus particulièrement le SERIS sous la direction de Jacqueline Garnier Laplace et plus récemment de François Paquet pour le financement de ces 3 années de thèse.

En particulier, je remercie Rodolphe Gilbin, ancien responsable du Laboratoire de biogéochimie, Biodisponibilité et Transfert des radionucléides (L2BT) ainsi que Christelle Adam Guillermin, responsable du Laboratoire d'Ecotoxicologie des radionucléides (LECO) pour m'avoir accueillie au sein de vos laboratoires.

J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements à chacun des membres du jury qui a accepté d'évaluer ce travail de thèse : Madame Florence Solari ainsi que Madame Anne-Laure Bulteau en tant que rapporteurs et Monsieur Jean Armengaud, Madame Laurence Blanchard et Madame Elena Gomez en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier Simon Galas d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour la disponibilité et les conseils dont j'ai pu bénéficier dans les moments importants de ce projet de recherche.

Je remercie chaleureusement mes deux encadrantes de thèse : Sandrine et Cathy. Cathy merci pour ta gentillesse, tes encouragements, ta bonne humeur et tes conseils qui m'ont guidée tout au long de cette thèse et qui m'ont permis de prendre du recul lorsqu'il le fallait. Sandrine, je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as appris durant ces trois années. Je suis vraiment heureuse d'avoir eu une encadrante comme toi. Merci pour ta patience, ton exigence, les nombreux conseils que tu m'as prodigué et merci de m'avoir toujours poussée pour donner le maximum de moi-même et d'avoir toujours été disponible pour moi.

J'adresse mes sincères remerciements à Olivier Coux pour ses conseils précieux sur le protéasome, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire le temps de quelques expériences, et pour avoir eu la gentillesse de relire mon article.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du CRCM de Marseille, et en particulier Patrick Fourquet, Luc Camoin et Matthieu Pophillat pour leur aide précieuse durant les expériences protéomiques et pour les analyses en spectrométrie de masse.

Merci à Aymeric Bailly, Albertina de Sario, Céline Dinocourt, Stephen Baghdigian, Olivier Coux et Elena Gomez d'avoir accepté de participer aux comités de pilotage et de m'avoir conseillée durant ce projet de thèse.

Je remercie également Nicolas Dubourg, pour le travail réalisé sur la partie dosimétrie. Merci de t'être rendu disponible pour le design (parfois compliqué !) des expériences d'irradiation.

Merci à toute l'équipe ISATIS. Merci à Sébastien pour m'avoir initié au monde de la protéomique sur gel et pour tes nombreux conseils et les moments de rigolade ☺ Merci également à Mira, pour l'aide que tu m'as apportée durant les expériences d'irradiation à Orsay, pour ta gentillesse et ton humour !

Merci à tous les membres des laboratoires de l'IRSN, et en particulier du LECO, L2BT et GARM. Magalie, je tiens à te remercier pour les essais sur le MET et aussi pour les moments de détente ☺ Un très grand merci à Claire pour avoir pris le temps de se pencher sur l'analyse de mes données. Jean-François, merci d'avoir gardé ton humour quand j'ai cassé l'autoclave ! ☺ Merci à Sylvie pour sa gentillesse. Nadine, merci pour ton sourire et ta bonne humeur légendaire ! Julien je te tiens à te remercier d'avoir toujours répondu présent pour les soucis techniques du labo mais aussi pour avoir rafistolé à grand coup de tarlatane ma petite voiture accidentée ! ^^ Isabelle, Virginie, Fred C, Daniel, Arnaud, Laurent, Karine, Pascale, Sandrine merci pour les moments agréables passés à vos côtés. Laureline merci pour ton gâteau au chocolat et pour ta gentillesse ! Pierre merci à toi pour toutes ces discussions, ça m'a vraiment fait plaisir de te connaître ☺ Olivier S merci pour tout, pour tes conseils pertinents avant pendant et après la thèse, c'était cool de découvrir Lyon avec toi ☺. Fred A, merci pour tes petites blagounettes ^^ ce fut un plaisir de te connaître et de garder Maël ! Olivier A on a appris à se connaître sur le tard mais ce fut un plaisir ! Merci pour tes conseils sur les « big datas » ! Béatrice j'ai fait ta connaissance au Canada durant mon stage et tu es devenue ma « voisine » ☺ merci à toi pour ta gentillesse et félicitations pour la naissance de ta puce ! Jean Marc merci pour ta gentillesse et pour toutes les discussions intéressantes que j'ai pu avoir avec toi ! Clara merci pour ton sourire, ta disponibilité et bien sûr pour toute la paperasse administrative !!!

Et maintenant je passe à la crème de la crème des doctorants de Cadarache ☺ Alors tout d'abord les anciens : Adrien merci de m'avoir initiée au monde merveilleux des nématodes ☺ Adeline, ou Adeliineuh merci à toi pour ton sourire et ta bonne humeur et pour nos parties de dance !!! Kewin que dire ?! merci pour nos parties de pêche, de films d'horreur et de franche rigolade qu'on a pu avoir ensemble (je me rappelle d'un fou rire mémorable à la cantine d'ailleurs) ! Je crois que ton imitation de la chèvre après notre victoire à plate couture au kayak restera gravée à jamais dans ma mémoire ! Je rigole toujours autant en y repensant... ☺ Flo pareil ^^ merci à toi pour tous ces fous rires, j'ai directement accroché avec toi. Antoine merci pour toutes ces pauses café (sisi ^^), pour ton oreille toujours attentive et pour nos discussions légères ou sérieuses. Ingrid ! Ou devrais-je dire Agrid ou Astrid ? je ne sais par où commencer ! Merci à toi pour tout ! Tu m'as soutenue dans les moments difficiles, tu m'as initiée à la salsa, bon on ne peut pas dire que j'étais très douée mais c'est pas grave ! ^^ Merci à toi pour nos discussions au labo le soir, pour le kayak (tu nous a tellement fait rêver), pour tes phrases cultes (« c'est plus gwo », « elle a pas tous les fagots à l'abri celle-là ! », « hé ! on est tous des mammifères hein !!! »... et j'en passe !). Laure merci pour avoir covoituré quelques fois avec moi ! Amine ce fut un plaisir de te connaître ! Et maintenant les nouveaux... Alors Vanessa, c'était super cool de te connaître et de faire quelques soirées endiablées avec toi ! plein de bonheur pour la suite ! Marie, on fait partie de la même « promo », tu m'as tellement fait rire avec le kangoo... malgré toi mais c'était drôle ! « ya pu de suzeuh » Ne change pas et bon courage pour la suite !!! ☺ Marine, j'ai appris à te connaître sur le tard mais tu m'as l'air pleine de dynamisme et de joie de vivre ! Audrey, pareil on s'est connues sur le tard malheureusement mais ce fut un plaisir de partager le temps de quelques jours le bureau avec toi. Sophia ah ma petite Sophia ! Un vrai dragon derrière ce petit bout de femme ^^ « hé vous avez vu ma veste ?! Ahhhhh la P... ! » XD bon courage avec Rémi ^^ Rémi mon petit binôme de dernière année, tu m'énerves autant que je t'adore ! merci de connaître Dikkenek par cœur je me sens moins seule ☺ Bon courage pour la suite tu vas faire une très belle thèse ! Caroline, « Comment elle va ? » merci à toi pour les petites pauses thé, craquage où le moindre mot prononcé va toujours plus loin ! ^^ et pour toutes les discussions sérieuses et pas sérieuses ☺ Alex, je crois que je n'ai jamais connu quelqu'un qui avait autant l'esprit

de contradiction que toi ! mais c'est marrant 😊 et non on ne peut pas tuer tous les chats^^ bon courage pour la suite.

J'espère n'avoir oublié personne. Et pour finir, je tiens à remercier mon frère et ma belle sœur, Jérémy et Stéphanie, Coco, Audruche, Vivien, Mathilde, Amélie, Séverine et Will. Et Merci à mes parents... qui m'ont permis d'arriver où j'en suis aujourd'hui, pour leur soutien sans faille et pour leur amour. Je vous aime. Et enfin un grand merci à mon Nono pour m'avoir supportée lorsque je n'étais plus supportable 😊 tu as eu beaucoup de courage et tu as su me soutenir. Je t'aime.

« La véritable science enseigne, par-dessus tout, à douter et à être ignorant. »

Miguel de Unamuno

SOMMAIRE

Introduction générale.....	19
Partie A : Etude bibliographique	22
I. Généralités sur les rayonnements ionisants	22
1. Nature et types de rayonnements ionisants.....	22
2. Grandeurs et unités en radioprotection de l'environnement.....	23
3. Sources d'exposition aux rayonnements ionisants dans l'environnement.....	24
i. Sources Naturelles.....	24
ii. Sources Artificielles	24
4. Voies d'exposition	25
II. Mécanismes d'action des rayonnements ionisants	26
1. Radiolyse de l'eau et stress oxydatif	26
2. Conséquences du stress oxydatif radio-induit sur les biomolécules	28
a. Dommages à l'ADN.....	28
b. Dommages aux lipides.....	30
c. Dommages aux protéines.....	31
i. Modifications de l'expression des protéines.....	32
ii. Dommages oxydatifs aux protéines	33
iii. Elimination des protéines endommagées par le protéasome	37
3. Conséquences cellulaires des dommages moléculaires radio-induits et lien avec la radiobiologie.....	40
III. Problématique environnementale	42
1. La radioprotection de l'environnement	42
2. Etat de l'art des effets d'une irradiation gamma sur les espèces non-humaines - Notion de radiosensibilité des espèces	45
a. Après irradiation aiguë	45
b. Après irradiation chronique	46
i. Sur une génération	46
ii. Après irradiation chronique multigénérationnelle	48
c. Influence du mode d'exposition sur les effets observés après irradiation gamma – Comparaison aigu/chronique.....	49
IV. <i>Caenorhabditis elegans et les rayonnements ionisants</i>	51
1. Biologie de <i>C. elegans</i>	51
a. Phylogénie	51

b.	Ecologie	51
c.	<i>Caenorhabditis elegans</i> : un organisme modèle	52
d.	Cycle de vie.....	52
e.	Phase embryonnaire	54
f.	Phase post embryonnaire	55
2.	Etat de l'art sur les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur <i>C. elegans</i>	58
a.	Irradiation aiguë	59
i.	Traits d'histoire de vie	59
ii.	Dommmages subcellulaires.....	59
b.	Irradiation chronique.....	61
i.	Traits d'histoire de vie	61
ii.	Dommmages subcellulaires.....	61
c.	Bilan.....	62
Partie B : Hypothèses, objectifs et choix stratégiques		64
1.	Objectif	64
2.	Les marqueurs biologiques retenus	64
3.	Choix dans l'approche expérimentale.....	66
Partie C : Matériel et méthodes		68
I.	Maintenance et conditions de culture de <i>Caenorhabditis elegans</i>	68
1.	Conditions de culture	68
2.	Synchronisation des individus	69
II.	Irradiations	71
1.	Définition des designs expérimentaux et dosimétrie	71
2.	Irradiation aiguë	73
a.	Design expérimental.....	73
b.	Dosimétrie	75
3.	Irradiation chronique	76
a.	Design expérimental.....	76
b.	Dosimétrie	79
III.	Etude des paramètres individuels chez <i>C. elegans</i>	80
1.	Reproduction.....	80
2.	Longévité	80
IV.	Tests moléculaires	81
1.	Etude de l'expression des protéines	81

a.	Matériel et méthodes génériques.....	81
i.	Extraction des protéines.....	81
ii.	Purification des échantillons	82
iii.	Excision des spots pour analyse en spectrométrie de masse	83
iv.	Digestion trypsique.....	83
v.	Analyse par spectrométrie de masse	84
vi.	Recherche des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les protéines variantes	84
b.	Par la méthodologie 2D DIGE	84
i.	Marquage des échantillons « dye swap »	85
ii.	Première dimension de séparation des protéines : focalisation iso-électrique	86
iii.	Deuxième dimension de séparation des protéines : électrophorèse sur gel.....	87
iv.	Analyse des spots de protéines différentiels	88
v.	Analyse en spectrométrie de masse et interrogations des bases de données	89
c.	Par la méthodologie « label free »	89
i.	Préparation des échantillons.....	91
ii.	Analyse en spectrométrie de masse et interrogations des bases de données	91
2.	Domages aux protéines-Etude de la carbonylation	93
a.	Etude du niveau global de protéines carbonylées	93
i.	Par électrophorèse 1D.....	93
ii.	Par marquage <i>in situ</i> des carbonyles.....	95
b.	Localisation <i>in situ</i> des carbonyles	95
i.	Préparation des échantillons suivant Kuzmic et al 2016.....	95
ii.	Analyse	96
c.	Mesure de la nature des protéines carbonylées.....	98
3.	Analyse de l'activité du protéasome	99
a.	Extraction protéique.....	99
b.	Mesure globale d'activité	100
c.	Electrophorèse en conditions natives	100
d.	Westernblot.....	101
e.	Analyse du signal	102
V.	Traitements statistiques et modélisation des données de reproduction	103
1.	Modélisation des données de reproduction	103
2.	Traitements statistiques des données	103

Partie D : Résultats et discussion	105
I. Résultats et discussion sur l'irradiation aiguë.....	106
1. Effets à l'échelle individuelle.....	106
a. Ponte totale par individus	106
b. Taux d'éclosion.....	107
c. Discussion.....	107
2. Effets sur le protéome.....	108
a. Mises au point des conditions expérimentales.....	108
i. Stade de vie d'étude.....	109
ii. Temps de prélèvement post-irradiation	110
b. Dommages aux protéines-Etude de la carbonylation	111
i. Courbe dose réponse du niveau global de protéines carbonylées	111
ii. Nature des protéines carbonylées après irradiation aiguë multidose.....	113
c. Activité du protéasome	116
d. Expression différentielle et nature des protéines variantes	122
i. Cas des organismes contrôles	122
ii. Résultats des analyses protéomiques post-irradiation aiguë	123
3. Synthèse et discussion : lien entre effets à l'échelle moléculaire et la baisse de reproduction après irradiation aiguë.	143
II. Résultats et discussion sur l'irradiation chronique	145
1. Effets à l'échelle individuelle.....	145
a. Ponte totale par individus	145
b. Taux d'éclosion.....	146
c. Discussion.....	147
2. Effets sur le protéome.....	147
a. Dommages aux protéines-Etude de la carbonylation	147
i. Etude du niveau global de protéines carbonylées	147
ii. Localisation des carbonyles in situ	150
iii. Nature des protéines carbonylées après irradiation chronique sur une génération de nématodes.....	153
iv. Bilan.....	153
b. Activité du protéasome	154
c. Expression différentielle et nature des protéines variantes	160
i. DiGE.....	160
ii. Label free.....	162

3. Synthèse et discussion : lien entre effets à l'échelle moléculaire et la baisse de reproduction après irradiation chronique.....	172
III. Synthèse et discussion sur la comparaison aiguë vs chronique.....	174
Partie E : Conclusions générales et perspectives	178
I. Conclusions générales	178
1. Pertinence et sensibilité des marqueurs étudiés	178
2. Explorer le lien entre les réponses moléculaires et physiologiques	179
3. Conséquences pour l'évaluation des risques radiologiques	180
II. Perspectives générales de recherches	180
Références bibliographiques.....	183
ANNEXES.....	201
Valorisations scientifiques de la thèse	209

Liste des figures

FIGURE 1 : POUVOIR DE PENETRATION DES DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS [36]	23
FIGURE 2 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE LA RADIOLYSE DE L'EAU [44]	27
FIGURE 3 : SCHEMA ILLUSTRATIF DE LA BALANCE ENTRE LES ANTIOXYDANTS (AOX) ET LES OXYDANTS (ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ERO) [49]	28
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES LESIONS A L'ADN RADIO-INDUITES [56]	30
FIGURE 5 : SCHEMA RECAPITULATIF DES GRANDES ETAPES DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE INDUITE PAR LE RADICAL HYDROXYLE	31
FIGURE 6 : SCHEMA RECAPITULATIF DES 4 MECANISMES IMPLIQUES DANS LA CARBONYLATION DES PROTEINES [78]	36
FIGURE 7 : LE SYSTEME UBIQUITINE PROTEASOME (UPS) [92]	39
FIGURE 8 : SCHEMA RECAPITULATIF DES CONSEQUENCES CELLULAIRES DES DOMMAGES MOLECULAIRES RADIO-INDUITS	41
FIGURE 9 : LES DIFFERENTS MODELES D'EVALUATION DES RISQUES RADIOLOGIQUES [52].	42
FIGURE 10: REPRESENTATION DES DIFFERENTS NIVEAUX D'ORGANISATION BIOLOGIQUE, LEUR PERTINENCE ET LEUR SENSIBILITE [114].	44
FIGURE 11 : GAMME DE DOSES LETALES D'IRRADIATION GAMMA EN FONCTION DES DIFFERENTS GROUPES TAXONOMIQUES [116].	45
FIGURE 12 : RADIOSENSIBILITE DES ESPECES ENVIRONNEMENTALES (VERTEBRES, PLANTES ET INVERTEBRES) SOUMISES A UNE EXPOSITION CHRONIQUE AUX RAYONNEMENTS IONISANTS : COMPARAISON ENTRE LES DONNEES DE TERRAIN (ZONE D'EXCLUSION DE TCHERNOBYL ET LES DONNEES DE LABORATOIRE) [4].	48
FIGURE 13 : CYCLE DE VIE LA SOUCHE SAUVAGE N2 DE <i>C. ELEGANS</i> A 18°C , ADAPTE DE [154]	54
FIGURE 14 : SCHEMA DU HAUT : VUE GENERALE DU SYSTEME REPRODUCTEUR DE L'ADULTE HERMAPHRODITE. SCHEMA DU BAS : ZOOM SUR UN DES BRAS DE LA GONADE	55
FIGURE 15 : SYNTHESE DU DEVELOPPEMENT DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR DE L'HERMAPHRODITE [168]	58
FIGURE 16 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES PROTEINES IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE DES CELLULES DE LA LIGNEE GERMINALE CHEZ <i>C. ELEGANS</i> [185]	60
FIGURE 17 : SCHEMA DES TROIS PHASES DEFINIES DANS UNE UNITE EXPERIMENTALE	72
FIGURE 18 : A/ DESIGN DE VALIDATION DES DEBITS DE DOSES THEORIQUES. B/ DESIGN D'EXPERIENCE D'IRRADIATION	73
FIGURE 19 : DISPOSITIF D'IRRADIATION SITUE A L'INSTITUT CURIE A ORSAY (GSR-D1). L	74
FIGURE 20 : DISPOSITIF D'IRRADIATION DE L'IRSN.	77
FIGURE 21 : PRESENTATION DU DISPOSITIF D'IRRADIATION MIRE.	77
FIGURE 22 : DISPOSITIF D'IRRADIATION DE L'IRSN.	79
FIGURE 23 : PRESENTATION DU DISPOSITIF DE FOCALISATION ISO-ELECTRIQUE PAR GRADIENT DE PH.	86
FIGURE 24 : PARAMETRES DE FOCALISATION ISO-ELECTRIQUE.	87
FIGURE 25 : ILLUSTRATION DU DISPOSITIF D'ELECTROPHORESE EN DEUXIEME DIMENSION POUR 12 GELS.	88
FIGURE 26: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX PRINCIPES DE QUANTIFICATION LABEL-FREE.	90
FIGURE 27 : PHOTO ILLUSTRANT LES PROTEINES MARQUEES AU BLEU DE COOMASSIE APRES L'ETAPE DE STACKING SUR GEL.	91
FIGURE 28 : ILLUSTRATION DE LA METHODE D'INTEGRATION AVEC LE LOGICIEL IQTL	95
FIGURE 29 : EXEMPLE D'INTEGRATION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE EN CYE5 ISSUS DES NEMATODES MARQUES PAR LE LOGICIEL IQTL PAR LE MODE D'INTEGRATION « COLONY COUNTING ».	97
FIGURE 30 : IMAGES CONFOCALES DE NEMATODES ACQUISES AVEC L'OBJECTIF X10.	98
FIGURE 31 : ILLUSTRATION DE LA METHODE D'INTEGRATION AVEC LE LOGICIEL IQTL.	102
FIGURE 32: COURBE DOSE REPONSE DE LA PONTE TOTALE PAR INDIVIDUS EN FONCTION DE LA DOSE REÇUE D'EXPOSITION AIGUË (DE 0 A 200GY) CHEZ <i>C. ELEGANS</i> EXPOSE AU STADE L4	106

FIGURE 33 : COURBE DOSE REPONSE DU SUCCES D'ECLOSION DES ŒUFS PONDUS EN FONCTION DE LA DOSE REÇUE D'EXPOSITION AIGUË (DE 0 A 200GY) CHEZ <i>C. ELEGANS</i> EXPOSE AU STADE L4	107
FIGURE 34 : NIVEAU BASAL DU TAUX DE PROTEINES CARBONYLEES CHEZ <i>C. ELEGANS</i> EN FONCTION DES DIFFERENTS STADES DE VIE (L3, L4 ET L4-JA).	109
FIGURE 35 : A/COURBE DOSE-REPONSE DU NIVEAU DE PROTEINES CARBONYLEES APRES IRRADIATION GAMMA AIGUË DE 0,5GY A 200GY. B/SIGNAL OBTENU SUR GEL. OVERLAY CORRESPOND A LA SUPERPOSITION DES DEUX CANAUX	112
FIGURE 36 : GEL D'ELECTROPHORESE 2D-OXYDIGE.....	114
FIGURE 37 : A/COURBE DOSE-REPONSE DE L'ACTIVITE DU PROTEASOME 30S (HISTOGRAMME NOIR), 26S (HISTOGRAMME GRIS FONCE) ET 20S (HISTOGRAMME GRIS CLAIR) APRES IRRADIATION GAMMA AIGUË DE 0,5GY A 200GY. B/ ELECTROPHORESE SUR GEL NATIF, SUIVI PAR LA MESURE SUR GEL DE L'ACTIVITE DES PROTEASOMES 30S, 26S ET 20S	117
FIGURE 38 : A/ COURBE DOSE-REPONSE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DU PROTEASOME 20S APRES IRRADIATION GAMMA AIGUË DE 0,5GY A 200GY. B/ COURBE DOSE-REPONSE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES PROTEASOMES 30S ET 26S APRES IRRADIATION GAMMA AIGUË DE 0,5GY A 200GY. C/ NIVEAUX D'EXPRESSION DES PROTEASOMES 30S 26S ET 20S PAR WESTERNBLOT.	119
FIGURE 39 : GEL D'ELECTROPHORESE 2D-DIGE.	123
FIGURE 40 : ANALYSE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES VIA L'OUTIL DAVID GENE DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES IDENTIFIEES APRES IRRADIATION AIGUË.	127
FIGURE 41 : ANALYSE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES VIA L'OUTIL DAVID GENE DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES REPRIMEES ET IDENTIFIEES APRES IRRADIATION AIGUË.	128
FIGURE 42 : ANALYSE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES VIA L'OUTIL DAVID GENE DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES ANALYSEES COMME SUR-EXPRIMEES ET IDENTIFIEES APRES IRRADIATION AIGUË.	129
FIGURE 43 : HEAT MAP REPRESENTANT LES LFQ (LABEL FREE INTENSITY NORMALISEE PAR INTENSITE TOTALE CHROMATOGRAMME) POUR CHACUNE DES PROTEINES VARIANTE ET IDENTIFIEE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.	131
FIGURE 44 : ANALYSE VIA L'OUTIL DAVID GENE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES ANALYSEES COMME SUREXPRIMEES ET IDENTIFIEES APRES IRRADIATION AIGUË.	136
FIGURE 45: ANALYSE VIA L'OUTIL DAVID GENE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES ANALYSEES COMME REPRIMEES ET IDENTIFIEES APRES IRRADIATION AIGUË.	138
FIGURE 46: DIAGRAMME DE VENN APRES EXPOSITION AIGUË.....	139
FIGURE 47 : PONTE TOTALE PAR INDIVIDU EN FONCTION DE LA DOSE REÇUE D'EXPOSITION CHRONIQUE (DES DOSES CUMULEES DE 3 A 6,5GY ; DEBITS DE DOSES DE 45 A 100MGY.H ⁻¹) CHEZ <i>C. ELEGANS</i> EXPOSE DU STADE ŒUF AU STADE L4-JA	146
FIGURE 48 : A/COURBE DOSE-REPONSE DU NIVEAU DE PROTEINES CARBONYLEES APRES IRRADIATION GAMMA CHRONIQUE DE 0,5GY A 6,5GY (DOSES CUMULEES). B/SIGNAL OBTENU SUR GEL APRES ANALYSE SUR UN SCANNER LASER (TYPHOON FLA9500).	148
FIGURE 49 : A/NIVEAU DE PROTEINES CARBONYLEES CHEZ LES <i>C. ELEGANS</i> IRRADIES RELATIF AUX CONTROLES RESPECTIFS, APRES EXPOSITION MULTIGENERATIONNELLE. B/ EXEMPLE DE SIGNAL OBTENU SUR LAME APRES SCAN SUR LE CANAL EN CY5, UTILISE POUR L'ANALYSE.	149
FIGURE 50 : IMAGES ACQUISES AU MICROSCOPE CONFOCAL POUR CHACUNE DES MOLECULES FLUORESCENTES ASSOCIEES A LA DETECTION DES CARBONYLES (CY5), PROTEINES (CY3), ADN (DAPI) ET LIPIDES (BODIPY)..	151
FIGURE 51: ACTIVITE GLOBALE DU PROTEASOME MESUREE EN MICROPLAQUE. ORRESPONDENT AUX BORNES FIXEES POUR LA PARTIE LINEAIRE DES COURBES (ENTRE 14MIN ET 28MIN).....	154
FIGURE 52 : ACTIVITE GLOBALE DU PROTEASOME MESUREE EN MICROPLAQUE. HYDROLYSE DU PEPTIDE LLVY-AMC PENDANT 30MINUTES A 37°C.	155

FIGURE 53 : A/COURBE DOSE-REPONSE DE L'ACTIVITE DE LA SOUS-UNITE 30S (HISTOGRAMME NOIR), 26S (HISTOGRAMME GRIS FONCE) ET 20S (HISTOGRAMME GRIS CLAIR) APRES IRRADIATION GAMMA CHRONIQUE DE 0,5GY A 6,5GY. B/ELECTROPHORESE SUR GEL NATIF, SUIVI PAR LA MESURE SUR GEL DE L'ACTIVITE DES PROTEASOMES 30S, 26S ET 20S (PANEL DE DROITE) ET NIVEAUX D'EXPRESSION DES PROTEASOMES 30S 26S ET 20S PAR WESTERNBLOT (PANEL DE DROITE).	156
FIGURE 54 : A/ COURBE DOSE-REPONSE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES TROIS FORMES DU PROTEASOME APRES IRRADIATION GAMMA CHRONIQUE DE 0,5GY A 6,5GY(20S) ET DE 0,5 A 1GY (30S ET 26S). B/ NIVEAUX D'EXPRESSION DES PROTEASOMES 30S 26S ET 20S PAR WESTERNBLOT POUR CHAQUE IMAGE	157
FIGURE 55 : GEL D'ELECTROPHORESE 2D-DIGE.	161
FIGURE 56 : HEAT MAP REPRESENTANT LES LFQ (LABEL FREE INTENSITY NORMALISEE PAR INTENSITE TOTALE CHROMATOGRAPHIQUE) POUR CHACUNE DES PROTEINES VARIANTES ET IDENTIFIEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.	163
FIGURE 57 : ANALYSE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES VIA L'OUTIL DAVID GENE DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES SUREXPRIMEES IDENTIFIEES APRES IRRADIATION CHRONIQUE.	167
FIGURE 58: ANALYSE DES PROCESSUS BIOLOGIQUES VIA L'OUTIL DAVID GENE DANS LESQUELS SONT IMPLIQUEES LES PROTEINES ANALYSEES COMME REPRIMEES ET IDENTIFIEES APRES IRRADIATION CHRONIQUE.....	169
FIGURE 59: DIAGRAMME DE VENN APRES EXPOSITION CHRONIQUE.	170
FIGURE 60 : SCHEMA DE SYNTHESE DES EFFETS D'UNE EXPOSITION AIGUË VS CHRONIQUE AUX RAYONNEMENTS IONISANTS AU NIVEAU CELLULAIRE, MOLECULAIRE ET INDIVIDUEL.....	176

Liste des tableaux

TABLEAU 1: CLASSIFICATION SCIENTIFIQUE DE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> [151]	51
TABLEAU 2: DEVELOPPEMENT DE LA SOUCHE SAUVAGE N2 DE <i>C. ELEGANS</i> A DIFFERENTES TEMPERATURES [162].	53
TABLEAU 3 : COMPOSITION DES MILIEUX NGM ET M9, UTILISES POUR LA CULTURE, LA PREPARATION ET L'EXPOSITION DE <i>C. ELEGANS</i>	68
TABLEAU 4 : COMPOSITION DE LA SOLUTION D'HYPOCHLORITE DE SODIUM POUR LA SYNCHRONISATION DE NEMATODES.	69
TABLEAU 5 : REPARTITION DES NEMATODES EN FONCTION DES DIFFERENTS PARAMETRES A TESTER.	75
TABLEAU 6: DOSES MESUREES PAR LES DOSIMETRES RADIOPHOTOLUMINESCENTS (RPL)	75
TABLEAU 7 : REPARTITION DES NEMATODES EN FONCTION DES DIFFERENTS PARAMETRES A TESTER.	78
TABLEAU 8: DOSES MESUREES PAR LES DOSIMETRES RADIOPHOTOLUMINESCENTS (RPL)	80
TABLEAU 9 : COMPOSITION DU TAMPON DE LYSE UTILISE AFIN D'EXTRAIRE LES PROTEINES DE <i>C. ELEGANS</i>	82
TABLEAU 10 : REPARTITION DES ECHANTILLONS POUR CHAQUE GEL.	85
TABLEAU 11 : COMPOSITION DU TAMPON DE LYSE UTILISE AFIN D'EXTRAIRE LES PROTEINES DE <i>C. ELEGANS</i> EN CONDITIONS NATIVES.	99
TABLEAU 12 : COMPOSITION D'UN GEL D'ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NATIVES.	100
TABLEAU 13: CINETIQUE DE PRODUCTION DES PROTEINES CARBONYLEES APRES IRRADIATION AIGUË A 2,5GY (1GY.MIN ⁻¹) ET A 75GY(15GY.MIN ⁻¹).....	111
TABLEAU 14 : TABLEAU RECAPITULATIF DES SPOTS DE PROTEINES VARIANTS (CARBONYLES ET TOTAL) ENTRE LES DIFFERENTES CONDITIONS.	115
TABLEAU 15 : COMPARAISON DE L'INTENSITE DE CHACUN DES SPOTS ENTRE LES DIFFERENTES DOSES ET LE TEMOIN.	124
TABLEAU 16 : LISTE DES PROTEINES DIFFEREMMENT EXPRIMEES APRES IRRADIATION AIGUË CHEZ <i>C. ELEGANS</i> DE 0,5 A 3,3GY PAR RAPPORT AUX TEMOINS ET IDENTIFIEES APRES SPECTROMETRIE DE MASSE (MALDI-TOF/TOF ET ORBITRAP).	126
TABLEAU 17: RESULTATS DE LA RECHERCHE AVEC <i>A PRIORI</i> : 9 DES PROTEINES ANALYSEES COMME VARIANTES ET IDENTIFIEES APRES ANALYSE LABEL FREE QUI SONT IMPLIQUEES DANS LES PROCESSUS D'APOPTOSE ET DANS L'ACTIVITE DU PROTEASOME.	133
TABLEAU 18: LISTE DES 22 PROTEINES PARMIS LES 57 COMMUNES ENTRE 1 ET 3,3GY QUI SONT ANNOTEES DANS LES BASES DE DONNEES DE PROTEOMIQUE, AINSI QUE LA MODULATION DE LEUR EXPRESSION ASSOCIEE POUR CHACUNE DES CONDITIONS.	140
TABLEAU 19 : COMPARAISON DE L'INTENSITE DE CHACUN DES SPOTS ENTRE LES DIFFERENTES DOSES CUMULEES ET LE TEMOIN.	161
TABLEAU 20 : PROTEINE DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMEE APRES IRRADIATION CHRONIQUE CHEZ <i>C. ELEGANS</i> DE 0,5 A 3,3GY PAR RAPPORT AUX TEMOINS ET IDENTIFIEES APRES SPECTROMETRIE DE MASSE (MALDI-TOF/TOF ET ORBITRAP).	162
TABLEAU 21 : RESULTATS DE RECHERCHE AVEC <i>A PRIORI</i> : 9 DES PROTEINES ANALYSEES COMME VARIANTES ET IDENTIFIEES APRES ANALYSE LABEL FREE	165
TABLEAU 22: LISTE DES 15 PROTEINES PARMIS LES 27 COMMUNES ENTRE 0,5 ; 1 ET 3,3GY QUI SONT ANNOTEES DANS LES BASES DE DONNEES DE PROTEOMIQUE, AINSI QUE LA MODULATION DE LEUR EXPRESSION ASSOCIEE POUR CHACUNE DES CONDITIONS.	171
TABLEAU 23 : LISTE EXHAUSTIVE DES PROTEINES VARIANTES ENTRE LES DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION ET LES CONTROLES, IDENTIFIEES ET CARACTERISEES DANS LES BANQUES DE DONNEES APRES IRRADIATION AIGUË.	201
TABLEAU 24 : LISTE EXHAUSTIVE DES PROTEINES VARIANTES ENTRE LES DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION ET LES CONTROLES, IDENTIFIEES ET CARACTERISEES DANS LES BANQUES DE DONNEES APRES IRRADIATION CHRONIQUE.	207

Glossaire

A

Activité nucléaire : nombre de désintégrations qui se produisent par unité de temps. L'activité nucléaire s'exprime en Becquerel (Bq), qui est égal à une désintégration par seconde.

Apoptose : processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un évènement.

C

Cellule germinale : cellule reproductrice susceptible de former les gamètes (oocytes et spermatozoïdes).

Cellule somatique : cellule non reproductrice constituant la majorité des cellules d'un organisme.

D

Débit de dose : détermine l'intensité de la dose absorbée en Gray (Gy)(voir dose absorbée) par unité de temps.

Dose d'effet (DEx) : Dose induisant X% d'effet par rapport aux individus non exposés

Dose absorbée : quantité d'énergie cédée par unité de masse. Elle s'exprime en Gray (Gy) et équivaut à l'absorption d'un Joule dans 1 kg de matière homogène.

E

Ecosystème : unité écologique de base, constituée par l'association de deux composantes en constante interaction, le biotope et la biocénose (voir biocénose et biotope).

Ecotoxicologie : science qui étudie l'impact et le devenir des polluants sur les écosystèmes.

Effet transgénérationnel : transmission des effets observés chez la génération parentale aux descendants non exposés.

Effet multigénérationnel : transmission des effets observés chez la génération parentale aux descendants exposés.

Epigénétique : étude de facteurs héritables (comme par exemple, le changement de fonction d'un gène) qui interviennent par le biais de mécanismes qui diffèrent d'un changement dans la séquence d'ADN.

Exposition aiguë : se dit d'une exposition reçue pendant une période de temps courte, en opposition à une exposition chronique (voir exposition chronique).

Exposition chronique : se dit d'une exposition reçue pendant une durée de temps longue, en opposition à une exposition aiguë (voir exposition aiguë).

Introduction générale

Les rayonnements ionisants ont une origine naturelle due aux éléments radioactifs présents dans le sol et l'atmosphère depuis la création de la terre (uranium 235 et uranium 238, potassium 40, thorium 232). A ces radioéléments et radio-isotopes naturels, s'ajoutent des éléments radioactifs issus des activités anthropiques liées notamment à la production d'énergie nucléaire, aux applications militaires et à la médecine nucléaire. Ces activités contribuent à accroître la présence de radionucléides dans les écosystèmes, bien qu'en situation normale, leurs rejets soient hautement surveillés et contrôlés [1]. En situation accidentelle de grandes quantités d'éléments radioactifs peuvent également se retrouver dans l'environnement comme après les accidents nucléaires de Tchernobyl en 1986 et celui de Fukushima-Daiichi en 2011. L'impact environnemental des rayonnements ionisants est donc devenu une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure au cours des dernières décennies [2,3]. De plus, l'évaluation précise du risque radiologique pour les écosystèmes est compliquée par le fait que la radiosensibilité est différente entre les organismes vivants dans l'environnement [4].

L'évaluation de l'impact environnemental d'un polluant, incluant les contaminants radioactifs, peut se faire à différents niveaux d'organisation biologique : de la molécule aux écosystèmes [5, 6]. L'objectif de l'écotoxicologie et de la radioécologie est donc de prendre en compte à la fois la pertinence écologique et la sensibilité des marqueurs étudiés. Dans ce contexte, les tests écotoxicologiques ont pour vocation de prédire les risques sur les populations et les écosystèmes notamment en extrapolant les effets observés à l'échelle de l'individu comme la reproduction, la croissance et la survie [7]. Cependant, une des limitations de ces tests menés sur ces grandes fonctions physiologiques est leur sensibilité. L'utilisation de marqueurs moléculaires, en général plus sensibles et modulés avant même qu'un effet à l'échelle individuelle soit observé pourrait être une solution. En revanche, la difficulté est de pouvoir associer ces changements moléculaires à des conséquences sur les grandes fonctions physiologiques. C'est pour cette raison que la compréhension de la cascade de processus qui associent les réponses moléculaires radio-induites aux effets physiologiques est nécessaire afin de mieux appréhender leur conséquences sur les écosystèmes et trouver des marqueurs précoces et sensibles. Cependant, il existe bien plus de données concernant les effets des rayonnements ionisants à l'échelle de l'individu (81% de données) qu'aux échelles cellulaires et moléculaires (7 et 12% respectivement) sur les espèces environnementales [5].

De plus, l'évaluation du risque associé à une exposition chronique repose en partie sur des données d'effet acquises après exposition aiguë (car mieux documentée) ; on ne compte que 36% de données sur les expositions chroniques dans les bases de données servant à l'évaluation du risque radiologique sur les espèces non-humaines (FEDERICA Database). Or, ces extrapolations sont source d'incertitude car les effets et les mécanismes de radiotoxicité

sont peu connus et peuvent être différents entre ces deux modes d'expositions [8]–[10]. C'est dans ce contexte qu'a été initié le projet ISATIS (IoniSing rAdiation and biological mechaniSms). Ce dernier a pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires radio-induits après exposition aiguë et chronique en adoptant une démarche intégrée (à plusieurs niveaux d'organisation biologique) et comparée (multi-phylum) incluant des espèces représentatives de l'environnement qui sont plus ou moins radiosensibles.

Au niveau moléculaire, l'ADN est considéré depuis des décennies comme étant la cible critique des dégâts de l'irradiation cellulaire, et ses dommages après irradiation ont fait l'objet de nombreuses études [11]–[15]. Les protéines, molécules fonctionnelles de l'organisme, ont quant à elles été beaucoup moins étudiées. Pourtant, les protéines, peuvent être elles aussi les cibles des rayonnements ionisants, et leur oxydation peut s'avérer particulièrement critique pour la cellule si elle occasionne une perte de leur fonction. Il a d'ailleurs été récemment montré que la survie de nombreux organismes est régie par le niveau de dommages oxydatifs aux protéines [16]–[18]. Notamment, la différence de radiosensibilité entre *Deinococcus radiodurans* et *Escherichia coli* pouvait être expliquée par une différence des systèmes de protection du protéome contre les dommages oxydatifs [16], [19], [20]. En effet, la bactérie *Deinococcus radiodurans* est connue pour survivre à de très fortes doses de rayonnements ionisants (>5000Gy) [21]. Il a donc été montré qu'un protéome fonctionnel garantit la récupération des fonctions cellulaires notamment en participant à la réparation de l'ADN endommagé, suite aux dégâts de l'irradiation [17], [22], [23].

Les protéines, et plus particulièrement leurs modifications post-traductionnelles et leurs niveaux d'expression, pourraient donc être des marqueurs de choix pour détecter une exposition aux rayonnements ionisants et prédire la sévérité des lésions associées. C'est le cas par exemple en radiothérapie (fortes doses d'irradiation aiguë) [24]–[27] où une étude a mis en évidence des biomarqueurs protéiques en quantifiant les protéines contenues dans l'urine humaine après irradiation aiguë [28]. En revanche peu de données existent après irradiation chronique sur les biotes non humains.

Parmi les dommages aux protéines, la carbonylation est le dommage oxydatif le plus étudié [29]. La carbonylation des protéines est une modification post-traductionnelle irréversible, pouvant entraîner une perte de fonction de la protéine endommagée [30], [31]. Ce dommage existe à l'état physiologique mais peut augmenter avec l'âge, la dessiccation et l'irradiation [17]. Au niveau basal de production, les protéines carbonylées sont éliminées par le protéasome [32]–[34]. En revanche, si elles sont produites en grandes quantités, les systèmes de protéolyse, *e.g.* protéasome, se verront dépassés et les protéines endommagées vont avoir tendance à s'agréger et à obstruer le protéasome [35]. Celui-ci deviendra alors inefficace, et l'homéostasie cellulaire sera affectée [35]. Il a précédemment été montré que la carbonylation des protéines pouvait être critique pour la cellule et l'organisme, cependant, cette étude a été menée à de très fortes doses d'irradiation aiguë

(>200Gy) [18]. Il n'existe aucune donnée sur la carbonylation des protéines après irradiation ponctuelle (aiguë) à des doses modérées voire environnementales, ni après exposition continue (chronique).

Dans ce contexte, l'objectif de ce doctorat était d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de radiotoxicité après irradiation aiguë et chronique et d'identifier des marqueurs sensibles d'exposition. Une attention particulière a été apportée à l'étude de la contribution du protéome (dommages oxydatifs, élimination et expression) dans les effets individuels radio-induits, notamment la reproduction. Pour ce faire, une approche intégrée (à différents niveaux d'organisation biologique) a été mise en place. Cette étude s'appuie sur l'utilisation de l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) qui présente de nombreux avantages, comme un cycle de vie court, une manipulation aisée en laboratoire et un génome séquencé. De plus, l'étude des effets individuels et moléculaires après irradiation sur *C. elegans* a déjà fait l'objet d'une thèse au laboratoire.

Ce manuscrit est organisé en cinq grandes parties. La première décrit l'état de l'art. La deuxième partie présente les problématiques soulevées par ce projet de recherche ainsi que les objectifs et la démarche expérimentale. La troisième partie décrit le matériel et les méthodes mises en œuvre pour répondre aux problèmes scientifiques. La quatrième partie est dédiée aux résultats et aux discussions qui en découlent. Enfin le manuscrit se termine par une conclusion générale accompagnée des perspectives à explorer pour répondre aux questionnements laissés en suspens à la suite de ces travaux.

Partie A : Etude bibliographique

I. Généralités sur les rayonnements ionisants

En 1895, le physicien allemand Wilhelm Röntgen découvre par hasard les « rayons X », aujourd'hui utilisés dans de nombreuses applications. En 1896, Henri Becquerel découvre que l'uranium émet naturellement un rayonnement qui lui est propre et que l'intensité de ce rayonnement persiste dans le temps. Cette découverte marqua le début de la connaissance sur la radioactivité. Quelques années plus tard, en 1898, Marie et Pierre Curie découvrent que d'autres éléments émettent également des rayons : le thorium, le radium et le polonium. Marie Curie constate que ces rayonnements sont liés aux propriétés atomiques, elle nomme alors ce phénomène : « radioactivité ».

1. Nature et types de rayonnements ionisants

Un atome est constitué d'un noyau de protons et de neutrons, et des électrons qui gravitent autour de celui-ci. Dans la nature, les noyaux atomiques peuvent être stables ou instables. Les atomes dont le noyau est instable sont qualifiés d'isotopes radioactifs. Cette instabilité peut être due à un excès de protons ou de neutrons. Ces noyaux vont tendre vers la stabilité en se désintégrant. Ces désintégrations forment d'autres noyaux, pouvant également être instables et qui vont se désintégrer à leur tour, jusqu'à arriver à un élément stable. Lorsqu'un noyau se désintègre il peut libérer l'énergie en excès sous forme de rayonnement.

Certains rayonnements sont dits « ionisants » lorsque ceux-ci sont capables de déposer assez d'énergie dans la matière qu'ils traversent pour provoquer une ionisation, c'est-à-dire lui arracher un ou plusieurs électrons. Il existe deux grands types de rayonnements ionisants : les rayonnements particuliers alpha (α) et bêta (β) et les rayonnements électromagnétiques tels que les rayons X et les rayons gamma (γ). Ces types de rayonnements diffèrent par leur mode d'interaction avec la matière, dont leur pouvoir pénétrant est caractérisé par le TEL (Transfert d'Énergie Linéique). Le TEL représente la quantité d'énergie cédée d'un rayonnement par unité de longueur et s'exprime en électronvolt par micromètre ($\text{eV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Plus la perte d'énergie du rayonnement est grande plus la distance parcourue par ce dernier est courte. Ainsi, un rayonnement avec un TEL important ($>10\text{Mev} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) perd de grandes quantités d'énergie sur de courtes distances tandis qu'un rayonnement possédant un TEL faible ($<1\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) perd de petites quantités d'énergie sur de grandes distances. Par exemple, le rayonnement γ possède le plus faible TEL par rapport aux rayonnements α et β car il perd très peu d'énergie, ce qui rend son pouvoir pénétrant plus élevé. La formule permettant de calculer le TEL est donnée ci-après (dE est la perte d'énergie par collision électroniques et dx est la distance parcourue par le rayonnement ; L est le transfert d'énergie linéique).

$$L = \frac{dE}{dx}$$

Le rayonnement alpha particulaire interagit fortement avec la matière, il possède donc un fort pouvoir ionisant mais un faible pouvoir pénétrant. Une simple feuille de papier suffit à l'arrêter (Figure 1). Le rayonnement alpha est émis par des noyaux possédant un trop grand nombre de protons ou de neutrons. Afin de retrouver leur stabilité, ces noyaux émettent un noyau d'hélium composé de deux neutrons et de deux protons : la particule α .

Le rayonnement bêta particulaire, a un pouvoir pénétrant plus important que le rayonnement alpha, car son pouvoir ionisant est plus faible. Une feuille d'aluminium est nécessaire afin de l'arrêter (Figure 1). Le rayonnement beta est émis par des noyaux dont le nombre de protons et de neutrons est fortement inégal. Afin de retrouver leur stabilité, ceux-ci émettent un électron ou un positon : la particule β^- ou β^+ .

Enfin, le rayonnement électromagnétique gamma, est moins ionisant que les rayonnements particulaires, mais beaucoup plus pénétrant. En effet, une importante épaisseur de plomb ou de béton est nécessaire pour l'arrêter (Figure 1).

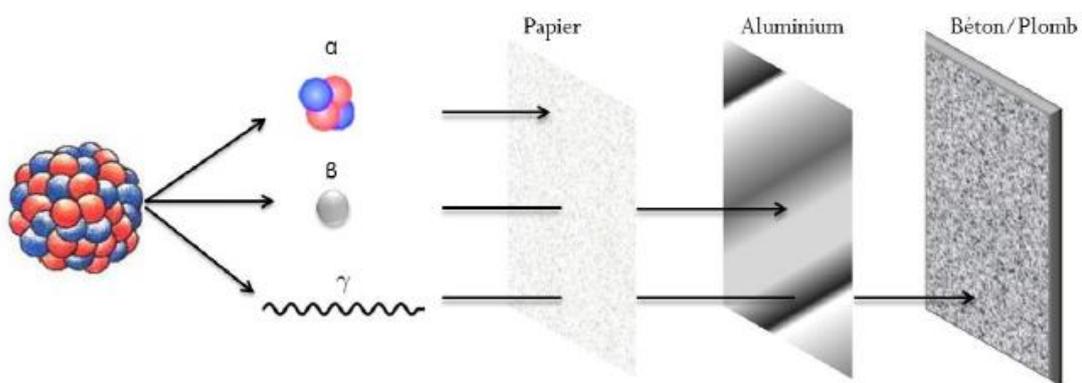


Figure 1 : Pouvoir de pénétration des différents types de rayonnements [36]

2. Grandeurs et unités en radioprotection de l'environnement

En radioprotection de l'environnement, afin de quantifier la radioactivité et évaluer les effets biologiques des rayonnements ionisants, différentes unités de grandeurs sont utilisées : l'activité radioactive, la dose absorbée et le débit de dose absorbée.

L'activité radioactive est exprimée en Becquerel (Bq). Un Becquerel correspond à une désintégration radioactive par unité de temps (seconde). L'activité radioactive peut être rapportée à une unité de masse (Bq.kg^{-1}), de volume (Bq.L^{-1}) ou bien de surface (Bq.m^{-2}).

La dose absorbée est exprimée en Gray (Gy). Elle correspond à l'énergie cédée par unité de masse. Un Gy équivaut à l'absorption d'un Joule dans 1kg de matière (1 J.kg^{-1}).

Le débit de dose absorbée est exprimé en Gray par unité de temps (Gy.h^{-1} ou Gy.j^{-1} ou Gy.an^{-1}) [37].

A titre informatif, en ce qui concerne la radioprotection de l'homme, un autre indicateur a été développé : la dose efficace. La dose efficace dont l'unité de mesure est le Sievert (Sv) est calculée en tenant compte des modalités d'exposition (interne ou externe), à partir de la dose (exprimée en Gy) absorbée par les différents tissus ou organes en appliquant des facteurs de pondération qui tiennent compte du type de rayonnement (alpha, bêta, gamma, X, neutrons), et de la radiosensibilité spécifique des organes ou tissus.

3. Sources d'exposition aux rayonnements ionisants dans l'environnement

De nos jours la radioactivité présente dans l'environnement est la résultante de radionucléides naturels, présents sur la Terre depuis son origine, et de radionucléides artificiels introduits par l'homme à partir du milieu du XX^{ème} siècle.

i. Sources Naturelles

Partout dans le monde, chaque être vivant est exposé aux rayonnements ionisants d'origine naturelle. Les sources d'exposition naturelle sont énoncées ci-après :

Les rayonnements cosmiques ont deux composantes. La première est due aux rayonnements photoniques très énergétiques provenant de l'espace. La seconde composante provient du soleil. L'intensité du rayonnement cosmique augmente avec l'altitude.

Les rayonnements telluriques sont émis par de nombreux éléments radioactifs présents dans l'écorce terrestre (uranium et thorium principalement).

Les rayonnements des eaux sont dus au lessivage des sols, et à la nature géologique des terrains traversés. Certaines eaux souterraines sont par exemple riches en radon dissous.

La radioactivité atmosphérique est essentiellement due aux émanations de radon-222 provenant du sol.

Enfin, **la radioactivité intrinsèque des êtres vivants** est due à l'ingestion d'eau et d'aliments contenant des éléments radioactifs (principalement du potassium-40 et du carbone-14).

Le débit de dose moyen reçu par les organismes terrestres supérieurs est de $3.11 \text{ mGy} \cdot \text{an}^{-1}$ (sources internes et externes confondues) [38]. Pour les organismes aquatiques, ce débit de dose est compris entre $0.02 \text{ mGy} \cdot \text{an}^{-1}$ et $2.6 \text{ mGy} \cdot \text{an}^{-1}$, dépendant de nombreux facteurs géographiques et géochimiques [39].

ii. Sources Artificielles

A cette radioactivité naturelle, vient s'ajouter une composante artificielle. En raison de l'accroissement de la population humaine mondiale et de l'augmentation des activités anthropiques associées, de nombreuses sources de radioactivité artificielles viennent alimenter le fond radiologique naturel de l'environnement. La radioactivité artificielle a

cependant deux origines bien distinctes : les sources artificielles liées aux activités humaines régulières, et les sources artificielles à caractère exceptionnel.

Les rejets autorisés et règlementés font partie des sources artificielles liées aux activités humaines régulières. Ces rejets sont provoqués par les installations nucléaires en fonctionnement normal, les activités médicales, les applications militaires et les usines de retraitements. A titre d'exemple, l'exposition des organismes aquatiques due aux rejets contrôlés d'une centrale nucléaire en France n'excède pas $0.01\text{mGy}\cdot\text{an}^{-1}$ (IRSN, 2011).

Les sources artificielles à caractère exceptionnel concernent les retombées atmosphériques d'anciens essais militaires nucléaires, mais aussi les rejets issus d'accidents nucléaires tels que la catastrophe de Tchernobyl en Ukraine en 1986, et plus récemment celle de Fukushima-Daiichi au Japon en 2011. Lors de ces accidents nucléaires, une grande diversité et quantité de radionucléides ont été déversés dans l'environnement. Par exemple, 20 jours après l'accident de Tchernobyl, les retombées radioactives sur les surfaces terrestres et végétales ont délivré un débit de dose pouvant aller jusqu'à $20\text{Gy}\cdot\text{j}^{-1}$ (UNSCEAR 2008a). Malgré la décroissance radioactive, la zone d'exclusion de Tchernobyl présente encore un fond radioactif résiduel variant de $2.4\mu\text{Gy}\cdot\text{j}^{-1}$ à $24\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ en addition au bruit de fond naturel [4]. Ces débits de dose externes sont dus notamment au césium-137 persistant, ainsi qu'au strontium-90 et au plutonium-90.

Trente jours après l'accident de Fukushima-Daiichi, le débit de dose absorbé avoisinait $1\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ pour les plantes; $2,5\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ pour les oiseaux, $2,3\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ pour les invertébrés du sol et $3,9\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ pour les rongeurs. Les zones impactées directement après cet accident impliquent principalement les écosystèmes aquatiques proches de la centrale nucléaire. Ainsi, le débit de dose absorbée par la faune benthique avoisinait les $2,6\text{Gy}\cdot\text{j}^{-1}$ [40].

4. Voies d'exposition

Deux types d'exposition peuvent être définis selon le type de rayonnement : interne ou externe.

Lors d'une exposition interne, également appelée contamination interne, les radionucléides pénètrent l'intérieur de l'organisme par ingestion, inhalation ou contact. C'est notamment par cette voie que les rayonnements alpha et bêta peuvent potentiellement causer des dommages de manière localisée, sur un organe par exemple.

Dans le cas d'une exposition externe, la source de rayonnements est située à l'extérieur de l'organisme. L'exposition externe peut être de deux types : par contact lorsqu'il y a un dépôt de radionucléide à la surface du corps par exemple, ou sans contact. Cette dernière est alors qualifiée d'irradiation externe. L'exposition externe peut se faire de manière ciblée ou concerner tout l'organisme, et cesse dès que celui-ci quitte la trajectoire des rayonnements. L'exposition externe peut se révéler particulièrement dangereuse dans le cas de rayonnements à fort pouvoir pénétrant, comme les rayonnements X ou gamma. Ceux-ci ont

la capacité de diffuser leur énergie aux organes situés en profondeur, comme par exemple la moelle épinière [36].

II. Mécanismes d'action des rayonnements ionisants

Les mécanismes d'action des rayonnements ionisants résultent de processus en cascade, passant de phénomènes physiques à des phénomènes biochimiques et enfin biologiques [41]. Tout d'abord, les rayonnements ionisants interagissent physiquement avec la matière, *via* des processus d'excitation et d'ionisation des molécules. Les effets biologiques des rayonnements ionisants peuvent être générés par action directe (20% des effets des rayonnements gamma), ou bien par action indirecte (80% des effets des rayonnements gamma). L'action dite directe des rayonnements ionisants fait référence à l'ionisation et excitation directe des biomolécules. L'action indirecte quant à elle signifie que le rayonnement réagit en première étape avec les molécules d'eau présentes dans l'organisme, les scinde (radiolyse de l'eau), générant ainsi des radicaux libres, qui vont eux même modifier les biomolécules [41].

1. Radiolyse de l'eau et stress oxydatif

Les cellules des organismes étant majoritairement constituées de molécules d'eau, la radiolyse de l'eau va jouer un rôle prépondérant dans les dommages biologiques radio-induits [42]. En effet, sous l'effet des rayonnements ionisants, les molécules d'eau présentes sur leur trajet vont soit subir une ionisation soit une excitation. Ces deux phénomènes vont engendrer différents types d'espèces réactives de l'oxygène, tout le long du passage du rayonnement (distance importante dans le cas des rayonnements gamma).

Après ionisation, la molécule d'eau va se dissocier pour former une molécule d'eau cationique (H_2O^+) et un électron (e^-). La molécule H_2O^+ va perdre rapidement un proton, formant ainsi ce que l'on nomme le radical hydroxyle $\text{OH}\bullet$. L'excitation quant à elle, va engendrer deux radicaux libres : le radical hydroxyle ainsi que le radical hydrogène ($\text{H}\bullet$). Les radicaux hydroxyles sont les espèces réactives de l'oxygène les plus dommageables du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité. En effet, la durée de vie des radicaux $\text{OH}\bullet$ est extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres). Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production, à l'opposé des radicaux superoxydes qui eux, en raison de leur demi-vie plus longue, diffusent bien au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible [43]. Les radicaux $\text{OH}\bullet$ et $\text{H}\bullet$ vont quant à eux générer des espèces radicalaires secondaires. Parmi elles, le radical superoxyde ($\text{O}_2^-\bullet$), le radical perhydroxyle ($\text{HO}_2\bullet$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces produits finaux issus de la radiolyse de l'eau sont nommés les « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) (Figure 2).

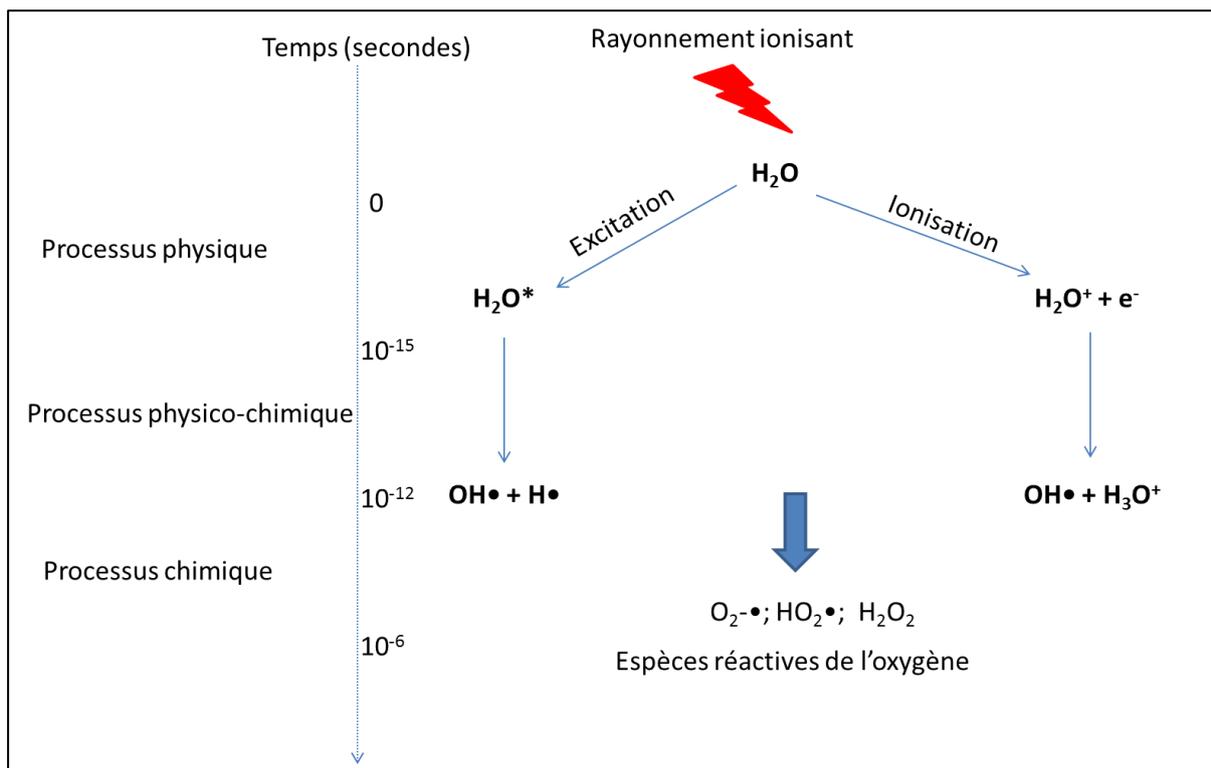


Figure 2 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la radiolyse de l'eau [44]

Présents en excès, ces ERO peuvent induire un déséquilibre de la balance oxydative quasi instantané dans les cellules (10^{-6} secondes). Afin de pallier au déséquilibre de la balance oxydative, les cellules disposent de défenses appelées « anti-oxydantes » (AOX). Ces molécules anti-oxydantes peuvent être de nature chimique (vitamines, glutathion, acide urique, albumine, Coenzyme Q10, mélatonine etc...) et enzymatique (SuperOxyde Dismutase (SOD), catalases, glutathion peroxydase) [45]. Le stress oxydatif est défini comme le déséquilibre entre la production d'ERO et les défenses anti-oxydantes. Un déséquilibre de la balance oxydative peut être la conséquence i) d'une augmentation de la production d'ERO (Figure 3B) ou bien ii) d'une diminution du niveau d'antioxydants (Figure 3C). Ce déséquilibre peut avoir pour conséquences une perturbation de l'homéostasie et du fonctionnement cellulaire. En effet, la production de radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau aboutit généralement à la modification des biomolécules de l'organisme, comme l'ADN, les lipides, les glucides et les protéines [46] ce qui peut conduire par exemple au vieillissement et à la mort cellulaire [41], [47], [48].

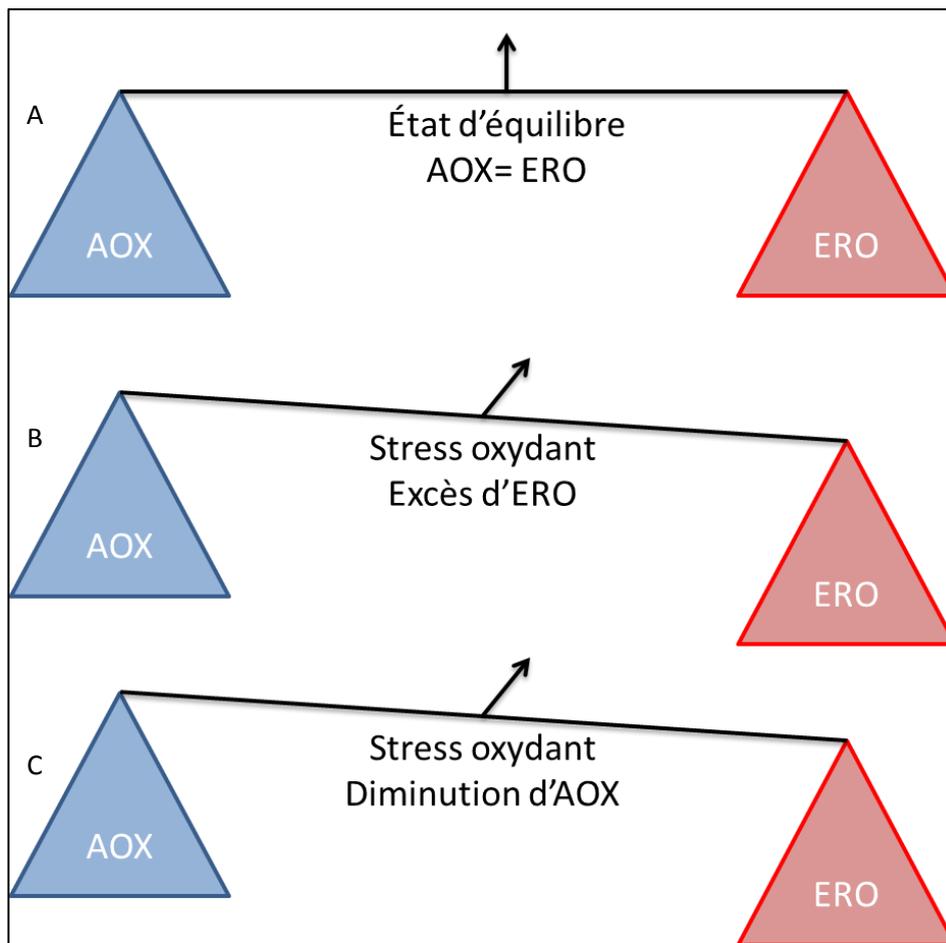


Figure 3 : Schéma illustratif de la balance entre les antioxydants (AOX) et les oxydants (espèces réactives de l'oxygène ERO) [49].

2. Conséquences du stress oxydatif radio-induit sur les biomolécules

a. Dommages à l'ADN

L'ADN est une macromolécule présente dans toutes les cellules d'un organisme, en interaction avec des protéines nommées histones, avec lesquelles elle forme la chromatine. La molécule d'ADN contient toute l'information génétique de l'organisme, qui est transmise à sa descendance. Les dommages induits sur cette biomolécule peuvent avoir des effets à court terme (mort cellulaire par exemple) ou bien peuvent déclencher des mutations génétiques qui pourront être accumulées et transmises de génération en génération. Ces mutations pourront à terme, engendrer une instabilité génétique ainsi qu'une perte de diversité biologique au sein des populations [37].

Comme décrit par Douki et collaborateurs en 2006, après exposition aux rayonnements gamma, les effets indirects dus aux ERO sont largement prépondérants sur la molécule

d'ADN [50]. Les altérations radio-induites de la molécule d'ADN peuvent être classées en trois grands types :

Les modifications de bases correspondent à des modifications chimiques des bases composant l'ADN (cytosine, thymine, adénine, guanine). Ces modifications sont majoritairement induites par le radical hydroxyle (OH•), issu de la radiolyse de l'eau. Les modifications de bases sont dans la plupart des cas non létales pour la cellule car elles sont généralement réparées par des mécanismes de réparation par excision de base (REB pour « Réparation par Excision de Base ») faisant intervenir des enzymes de réparation de l'ADN telles que des endonucléases, glycosylases, polymérases et ligases. En revanche, si la réparation est absente ou fautive, ces modifications pourront alors créer des mutations.

Les pontages résultent de l'apparition de liaisons covalentes entre les bases de l'ADN, l'ADN et les histones ou d'autres protéines environnantes. Ces dommages sont principalement dus à l'action du radical hydroxyle (OH•) [51]. Bien que ces pontages restent rares, lorsqu'ils ont lieu, ils sont pris en charge une nouvelle fois par des mécanismes de réparation par excision de base (REB).

Les cassures peuvent être classées en deux catégories. Les cassures simples brins, résultent de la rupture d'une chaîne sucre-phosphate de l'ADN, souvent à la suite de l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par le radical hydroxyle [52]. Ce type de cassure est particulièrement fréquent lors d'une irradiation gamma [53]. Cependant, les cassures simples brins sont peu dommageables pour la cellule car elles sont rapidement réparées par des mécanismes d'excision de base (REB). Les cassures double brin quant à elles, résultent de la rupture des deux chaînes de l'ADN. Ce type de dommage bien que plus rare que les cassures simples brins, est considéré comme l'altération la plus délétère pour l'ADN. En effet, ces cassures plus difficilement réparables, peuvent conduire à la mort cellulaire si elles sont trop nombreuses, mal (occasionne des mutations) ou pas réparées. Concernant les mécanismes de réparation de ces dommages, il existe la recombinaison homologue (RH pour « Recombinaison Homologue ») et le processus de jonction d'extrémités non-homologues (JENH pour « Jonction d'Extrémités Non-Homologues ») [54]. Le mécanisme de HR fait intervenir un brin homologue afin de reconstruire à l'identique le double brin d'ADN lésé. Cette réparation est qualifiée de « fidèle » car il n'y a pas de perte de l'information génétique [55]. Le processus JENH quant à lui, a pour but de reformer les liaisons chimiques qui ont été rompues entre les bases de l'ADN. Ce mécanisme de réparation ne permet pas de reformer à l'identique la séquence initiale de l'ADN, il peut également introduire des erreurs dans celle-ci (ajout ou suppression de nucléotides), et est donc qualifié d' « infidèle ».

La Figure 4 représente un récapitulatif des lésions à l'ADN induite par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants.

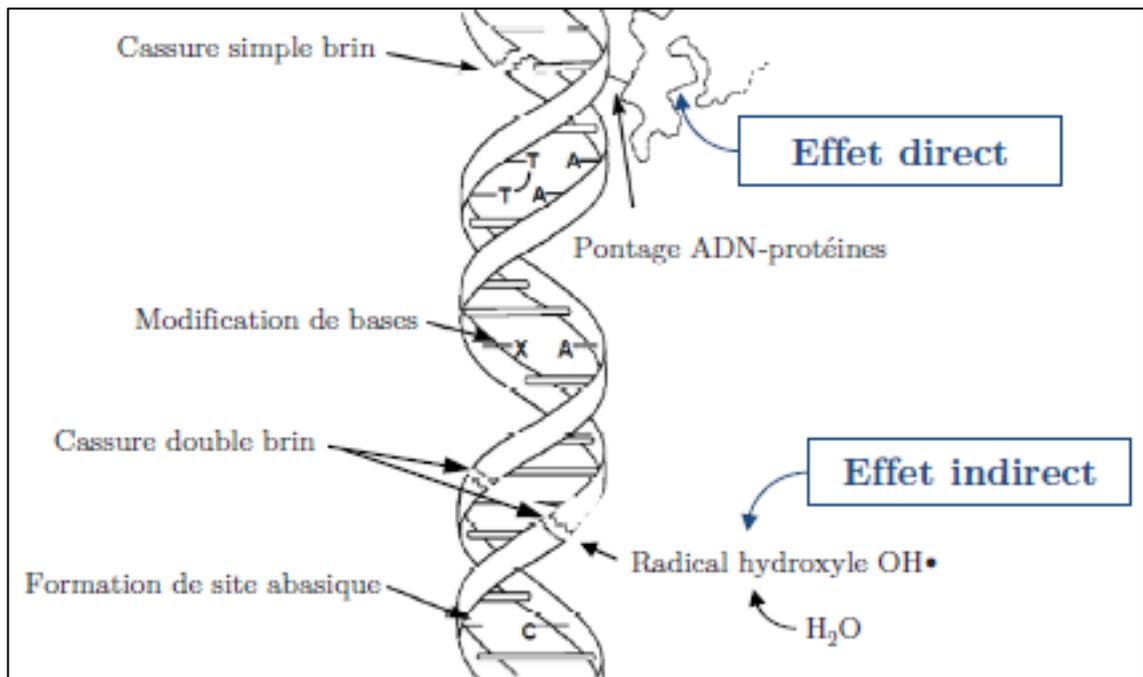


Figure 4 : Représentation schématique des lésions à l'ADN radio-induites [56]

b. Dommages aux lipides

Les lipides sont également sujets aux dommages oxydatifs radio-induits du fait que l'oxygène et les ERO soient lipophiles. Les ERO attaquent plus les acides gras polyinsaturés que les acides gras monosaturés ou insaturés [57]. L'oxydation des lipides par les ERO, radical hydroxyle principalement, est nommée : peroxydation lipidique. Les ERO vont supprimer un atome d'hydrogène porté par un atome de carbone situé entre deux doubles liaisons (liaison hydrogène-carbone plus faible) [58]. Le carbone se retrouve avec un électron libre et formera un radical lipidique. La dégradation des acides gras polyinsaturés peut mener à la formation d'autres composés, tels que des cétones, des alcanes, des époxydes et aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-Hydroxynonanal (4-HNE) [59], [60]. Le radical lipidique formé peut ensuite se lier à une molécule d'oxygène dissous pour créer un radical peroxyde, hautement réactif [58]. Ce dernier peut endommager les protéines membranaires ainsi que l'ADN [58]. En présence d'un autre acide gras polyinsaturé, cette réaction peut se reproduire, et donc se propager si aucune défense antioxydante n'intervient [57]. Des hydroperoxydes lipidiques peuvent également être formés par rupture de la double liaison adjacente au groupe hydroperoxy- et leur fragmentation peut alors donner lieu à d'autres intermédiaires réactifs tels que les aldéhydes, et particulièrement le MDA très réactif [58]. La peroxydation lipidique est considérée comme un dommage oxydatif mais également comme une source de production d'ERO. Les mécanismes de la peroxydation lipidique sont résumés sur la Figure 5.

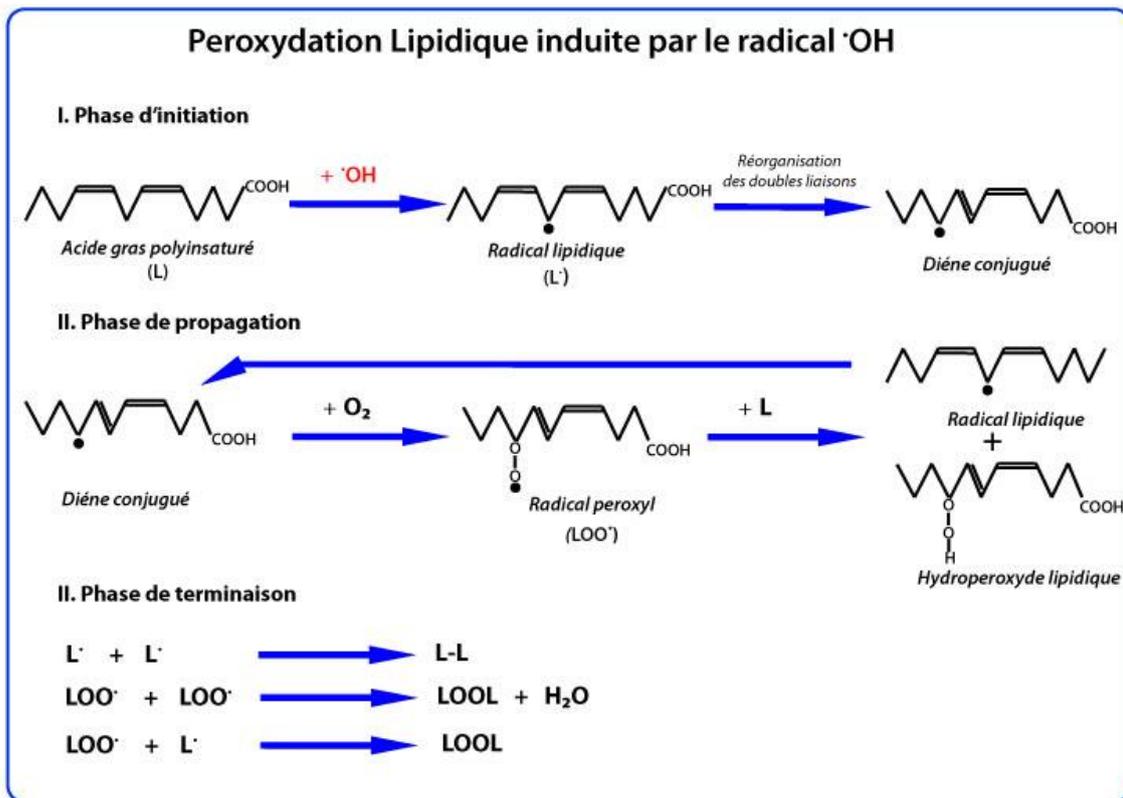


Figure 5 : schéma récapitulatif des grandes étapes de la peroxydation lipidique induite par le radical hydroxyle (Michel Demarchez ; <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot152>)

Il a été montré que les rayonnements ionisants en induisant la peroxydation des lipides, entraînaient une augmentation de la perméabilité membranaire ainsi qu'une altération de l'activité des protéines associées à la membrane [61], [62]. De plus, une étude a montré que l'irradiation aiguë entre 5 et 10Gy sur des cellules endothéliales aortiques ovines étaient à l'origine d'une augmentation de l'apoptose *via* une augmentation du niveau de céramides (lipides membranaires impliqués dans certains processus biologiques clefs) [63]. Cette étude prouve donc que la signalisation apoptotique peut être générée par l'interaction des rayonnements ionisants avec les membranes cellulaires.

c. Dommages aux protéines

Les dommages aux protéines après irradiation sont étudiés depuis peu [17]. Les protéines, présentes dans toutes les cellules vivantes, sont les molécules fonctionnelles des organismes, car elles participent à tous les processus cellulaires tels que la signalisation et le transport cellulaire, l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN, la réponse au stress. Par conséquent, une atteinte des protéines suite à une exposition aux rayonnements ionisants peut se répercuter sur le fonctionnement cellulaire.

i. Modifications de l'expression des protéines

Les radiations ionisantes, peuvent entre-autre, avoir pour conséquence une modification de l'expression des protéines. Cette dernière peut avoir plusieurs origines dont 3 sont détaillées ci-après.

La première est la modification ou la régulation de l'expression du gène qui code pour cette protéine. En effet, les rayonnements ionisants peuvent induire des modifications génétiques mais également épigénétiques [64]–[66]. Concernant les modifications génétiques, des mutations par exemple, induisent une transcription différente qui peut, *in fine*, entraîner le remplacement d'un acide aminé par un autre et donc un changement de la séquence de la protéine. Ensuite, il existe trois principales modifications épigénétiques qui sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles (MPTs) des histones et les ARNs non codants (ARNnc). La méthylation de l'ADN et les MPTs des histones modifient la transcription des gènes en interagissant avec la structure de la chromatine. Cette dernière peut passer d'un état décondensé, (euchromatine) permettant l'accès aux protéines initiatrices de la transcription, à un état condensé (hétérochromatine), inactif vis-à-vis de la transcription. Les ARNnc sont composés de plusieurs familles d'ARNs (miRNAs, siRNAs, piwiRNAs, lncRNAs,...) ayant différentes fonctions notamment dans la régulation de la transcription [67]. La modulation de ces trois processus épigénétiques après irradiation a donc un rôle primordial dans le contrôle de la transcription des gènes, puis de leur traduction en protéines. De tels changements peuvent affecter sa stabilité, son adressage intracellulaire, sa maturation et son activité ou bien encore son assemblage dans une structure multimérique. Il est également possible que certaines mutations génétiques entraînent l'absence de formation d'une protéine, ou la formation d'une protéine tronquée dont l'activité est nulle ou réduite.

La seconde peut induire une modification de l'expression des protéines en induisant un défaut de la traduction de l'ARN messenger en protéine et/ou un défaut de la machinerie cellulaire qui assure cette traduction. En effet, si l'ARN messenger est endommagé ou subit une coupure chimique ou enzymatique, alors la protéine ne sera pas traduite, ce qui entrainera par conséquent une diminution de l'expression de la protéine.

Enfin, la troisième origine peut conduire à la modification de l'expression des protéines par modification post-traductionnelle, c'est-à-dire une modification chimique et/ou une modification conformationnelle de la protéine réalisée après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Il existe différents types de modifications post traductionnelles, certaines sont régulées (comme la phosphorylation ou l'ubiquitylation) et d'autres peuvent être délétères pour la cellule (carbonylation par exemple). En effet, les protéines modifiées peuvent perdre leurs propriétés biologiques (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome, conduisant à leur dégradation [41].

Les études d'analyse globale de l'expression des protéines après irradiation sont, à ce jour, peu nombreuses. Cependant, quelques équipes ont étudié l'impact des rayonnements gamma sur le protéome de cellules de mammifères. L'équipe de S. Tapio en 2011, a mis en évidence qu'après irradiation gamma aiguë de cellules endothéliales humaines à 200mGy, quinze protéines étaient différentiellement exprimées par rapport aux cellules non irradiées. Parmi ces protéines variantes, certaines sont impliquées dans le métabolisme des acides gras et la réponse au stress [68]. Une autre étude menée en 2012 a montré que l'irradiation aiguë à 2.5Gy de cellules endothéliales cardiaques humaines, engendrait une sous-expression de nombreuses protéines, impliquées dans quatre mécanismes cellulaires clefs : i) glycolyse/glucogénèse et synthèse/dégradation des corps cétoniques ii) phosphorylation oxydative, iii) mobilité cellulaire et iv) JENH (processus de jonction d'extrémités non – homologues). Les auteurs suggèrent que ces altérations protéiques seraient des marqueurs précoces d'une atteinte cardiovasculaire radio-induite [69]. De plus, en 2015, il a été mis en évidence que l'irradiation gamma aiguë à des doses de 300mGy et 1Gy de cellules mononucléaires humaines présentes dans le sang périphérique induisait une réponse au niveau de l'expression de protéines impliquées dans les mécanismes de protection aux rayonnements ionisants [70]. Une équipe en 2011, a étudié les modifications du protéome du tissu cardiaque chez des souris exposées à une dose de 3Gy (irradiation aiguë). Les résultats de cette étude ont révélé que plusieurs groupes de protéines, étaient impliqués dans la réponse à l'irradiation aiguë. L'analyse des voies moléculaires impliquées dans ces réponses indiquaient que l'irradiation corps entier de souris induisait des réponses inflammatoires, des mécanismes de défenses anti-oxydantes et une réorganisation des protéines structurales au niveau du tissu cardiaque murin [71].

Ces études, montrent que les protéines différemment exprimées après irradiation gamma aiguë correspondent à plusieurs catégories fonctionnelles impliquant une cardiotoxicité. Ceci est particulièrement intéressant car plusieurs études ont démontré que les maladies cardiovasculaires seraient l'une des premières causes d'augmentation de la mortalité et de la morbidité chez les personnes ayant été exposées aux bombardements atomiques [72], [73]. Il semblerait donc que la modulation des protéines après exposition gamma aiguë constitue des biomarqueurs d'exposition, utiles au dépistage, au suivi des effets de l'exposition et *in fine* à leur prise en charge clinique. Cependant, ces études d'analyse globale de l'expression des protéines (protéomique) concernent surtout l'irradiation aiguë des mammifères. En revanche très peu de données existent sur la sensibilité du protéome des biotes non humains après irradiation chronique.

ii. Dommages oxydatifs aux protéines

L'exposition des protéines aux espèces réactives de l'oxygène peut altérer leur structure physique et chimique, causant l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés, la fragmentation du squelette protéique, des réticulations intra et inter moléculaires, un mauvais repliement et la formation de nouveaux groupements réactifs [74], [75]. Ces

dernières incluent par exemple la formation de groupements carbonyles, l'oxydation des groupements SH, ou la formation de di-tyrosine [76].

Les radicaux libres sont peu spécifiques chimiquement, cependant, il semblerait qu'ils aient des cibles préférentielles. En effet, les acides aminés dits sensibles aux modifications oxydatives correspondraient aux porteurs de groupements thiols (décrits comme très sensibles à l'oxydation et hautement réactifs), comme la méthionine et la cystéine [75]. De plus, les protéines de haut poids moléculaire et les protéines mal-repliées seraient aussi plus sensibles à l'attaque de radicaux libres.

La structure tridimensionnelle d'une protéine est directement dépendante des interactions électrostatiques et des liaisons covalentes entre les résidus d'acides aminés. La modification des chaînes latérales d'acides aminés déstabilise cette structure tridimensionnelle et fragilise donc la protéine (dénaturation de la protéine, perte de solubilité...). Si ces protéines ne sont pas dégradées par les systèmes de protéolyse cellulaire, elles vont s'agréger dans la cellule occasionnant une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Ces dommages protéiques peuvent occasionner une perte de fonctionnalité de la protéine endommagée, ce qui va avoir des conséquences biologiques plus ou moins importantes en fonction du rôle de la protéine touchée et de sa période biologique [75].

Les oxydations connues comme étant irréversibles sont celles qui engendrent des dérivés d'acides aminés carbonylés et hydroxylés. Cependant la carbonylation protéique est considérée comme le dommage oxydatif le plus sévère [77].

La carbonylation des protéines résulte de l'addition d'un groupement carbonyle sur la protéine ciblée, comme par exemple un aldéhyde, une cétone ou lactame [75]. La carbonylation des protéines est définie comme étant un marqueur de stress oxydant (et pouvant être induite *via* les ERO). C'est également le motif oxydatif le plus étudié après sénescence [78], [79].

la carbonylation des protéines est associée à certaines maladies dégénératives (diabète, sclérose latérale amyotrophique, Alzheimer, Parkinson) [30]. De plus, la carbonylation des protéines existe à l'état physiologique (chez *E.coli* 1.5 nmol/mg protéines [17]) mais peut être augmentée par le phénomène de vieillissement [80] et après stress (irradiation, dessiccation, anoxie). Au niveau basal de production, grâce au renouvellement permanent, les protéines carbonylées sont dégradées par le protéasome [75]. En revanche, si elles sont produites en grandes quantités, les systèmes de protéolyse se verront dépassés et les protéines endommagées vont avoir tendance à s'agréger et vont obstruer le protéasome [35] qui deviendra inefficace, perturbant ainsi l'homéostasie cellulaire.

D'un point de vue biochimique, la carbonylation des protéines peut être induite *via* quatre mécanismes d'action :

- i) L'oxydation catalysée par les métaux (OCM) résulte de la génération de radicaux hydroxyles hautement réactifs produits par la réaction de Fenton. En effet, dans un premier temps, l'OCM met en jeu une liaison entre un cation des métaux de transition (Fe^{2+} principalement) et un résidu d'acide aminé de la chaîne polypeptidique. En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , issu de la radiolyse de l'eau, ou présent de manière endogène dans les mitochondries) le radical hydroxyle sera généré [81]. Ces radicaux hydroxyles oxydent les chaînes latérales d'acides aminés ou coupent l'ossature de la protéine, conduisant à de nombreuses modifications, y compris l'addition de carbonyles réactifs [82].
- ii) L'oxydation du tryptophane (acide aminé aromatique) par les ERO est connue pour générer au moins sept produits d'oxydation, tous étant caractérisés par des groupements aldéhyde ou cétone, donc carbonyles.
- iii) L'addition de groupements carbonyles sur les protéines peut être due également aux produits réactifs issus de la peroxydation lipidique, par exemple le MDA et le 4-HNE [83], [84]. Ces aldéhydes réactifs sont fortement électrophiles (déficients en électron), et peuvent donc interagir avec les groupements nucléophiles des protéines, tels que les groupements SH des cystéines, les groupements NH_2 des lysines et arginines, les groupements S des méthionines et les groupements NH des arginines, afin de former des produits de lipoxydation avancée, et conduisant à l'apparition de groupements carbonyles sur les protéines touchées [85].
- iv) La carbonylation des protéines peut également se produire par glycoxydation. La glycoxydation (c'est-à-dire la réaction des sucres réducteurs tels que le glucose ou le fructose avec les chaînes latérales des résidus de lysine et d'arginine) forme des résidus glycosylés. Ceux-ci peuvent être encore décomposés par les ERO dans des produits finaux de glycoxydation avancée (AGE pour « Advanced Glycation End products ») portant des fragments carbonylés [78].

La Figure 6 illustre les quatre mécanismes connus à ce jour impliqués dans la carbonylation des protéines.

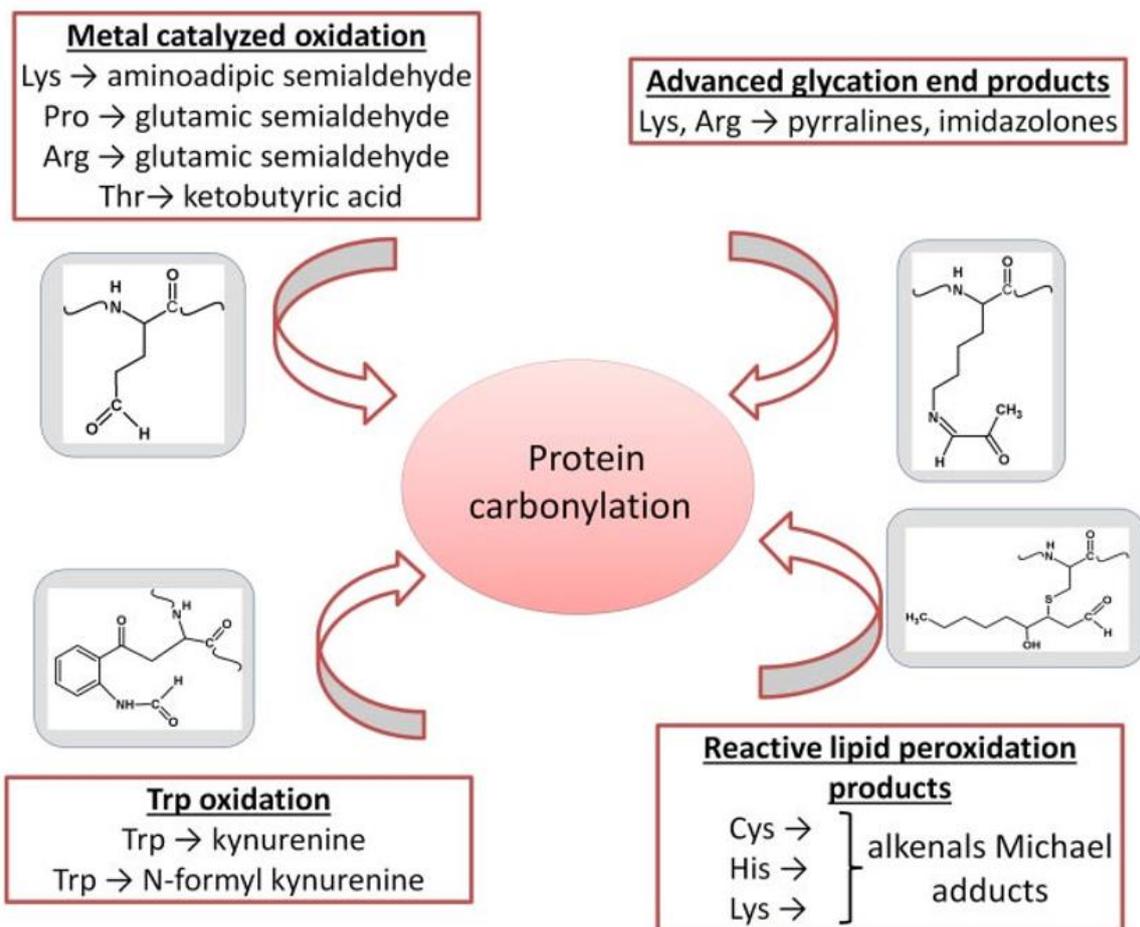


Figure 6 : Schéma récapitulatif des 4 mécanismes impliqués dans la carbonylation des protéines [78]

D'après la littérature il est décrit que, *in vivo* chez la bactérie, les dérivés carbonylés seraient principalement formés par l'oxydation catalysée par les métaux [86], [87]. De plus, la formation des groupements carbonyles dépendrait de la capacité de l'acide aminé à être oxydé, et de la composition de la protéine en acides aminés.

La carbonylation des protéines semble être un processus sélectif, ce qui signifie que certaines protéines sont plus susceptibles à l'oxydation. Les facteurs sous-jacents d'une telle sélectivité ne sont pas complètement connus. En revanche, les protéines contenant plus d'acides aminés de type cystéine, lysine, arginine et méthionine seraient plus sensibles à la carbonylation. De plus, les protéines qui présentent des sites de liaison des métaux de transition (fer et cuivre) et donc qui permettent l'oxydation catalysée par les métaux seraient les plus enclines à la carbonylation. Le niveau du renouvellement protéique, la conformation de la protéine, l'abondance des acides-aminés susceptibles d'oxydation catalysée par les métaux, ainsi que la localisation de la protéine vis-à-vis des ERO (mitochondries, cytosol, etc..) sont des facteurs qui pourraient influencer la susceptibilité d'une protéine vis-à-vis de la carbonylation [75].

Plusieurs équipes ont étudié la carbonylation des protéines après irradiation. Celles-ci ont permis de mettre en évidence une association entre le taux de protéines carbonylées et la mortalité de la bactérie *E. coli* (à partir de 2-3 carbonyles/protéine) après irradiation aiguë à 609Gy (LD50 pour un débit de dose de 26Gy/min) [17], ainsi qu'une diminution dose-dépendante de la fécondité de l'organisme modèle *C. elegans* jusqu'à 800 Gy (à un débit de dose de 26-38Gy/min) [18]. Parallèlement, ces études ont mis en évidence un lien entre la réparation des dommages à l'ADN et le taux de carbonylation des protéines. En effet, bien que les rayonnements γ endommagent l'ADN, cette dernière étude émet l'hypothèse que les modifications peuvent rendre les protéines non fonctionnelles et potentialiser les conséquences des dommages à l'ADN (absence de réparation). En revanche, les études concernant la carbonylation radio-induite des protéines ne concernent que de l'irradiation aiguë au-dessus de 200Gy.

iii. Elimination des protéines endommagées par le protéasome

Les protéines *in vivo* sont soumises à un renouvellement permanent. En effet, le niveau d'expression d'une protéine dans une cellule est déterminé par la balance entre son taux de production et son taux de dégradation [88], [89]. Les protéines qui arrivent à la fin de leur période biologique, ou bien les protéines endommagées qui subissent une modification de leur fonction doivent être dégradées par les systèmes de protéolyse afin d'assurer le maintien des processus cellulaires. Les deux principaux mécanismes de protéolyse cellulaire sont le protéasome et l'autophagie. L'autophagie est généralement définie comme un mécanisme de dégradation intracellulaire, dépendante des lysosomes, utilisée afin de renouveler le contenu cytoplasmique. Plusieurs formes d'autophagie ont été décrites, y compris la macroautophagie (la forme principale de l'autophagie), la microautophagie et l'autophagie induite par les protéines chaperonnes. La macroautophagie est un mécanisme permettant à la cellule de digérer une partie de son contenu (cytoplasme, protéines, organites cellulaires). L'autophagie est la seule voie cellulaire capable de dégrader massivement des macromolécules et des organites, et c'est une voie de dégradation alternative à celle du protéasome [90]. Cependant, plusieurs études menées aux cours des dernières années suggèrent que le protéasome est principalement responsable de l'élimination des protéines carbonylées [33], [34].

Le protéasome est un complexe protéique très régulé, impliqué dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, du cycle cellulaire, de l'apoptose, et qui prévient l'agrégation de protéines [91]. Sa structure et ses fonctions sont communes aux eucaryotes. Le protéasome est constitué d'un cœur catalytique 20S qui est une large structure cylindrique contenant 4 anneaux homologues empilés : 2 anneaux constitués de 7 sous-unités β chacun et de part et d'autre de ces deux anneaux, 2 anneaux constitués de 7 sous-unités α chacun [88]. Cette structure de 700KDa possède une chambre protéolytique de 53Å de diamètre maximal. La forme 20S du protéasome possède une activité ATP-indépendante. De part et d'autre du cœur protéolytique se trouve le complexe régulateur 19S. Le complexe régulateur 19S est

constitué d'une « base » et d'un « couvercle ». Le protéasome 20S associé à un ou deux régulateur(s) 19S constituent les protéasomes 26S et 30S, respectivement. La forme 30S du protéasome à une masse moléculaire de 2MDa et son activité est ATP-dépendante. Un bref aperçu des fonctions des différents assemblages est décrit ci-après.

Fonction du protéasome 20S : Le protéasome 20S permet une reconnaissance des acides aminés hydrophobes exposés à la surface de la protéine oxydée, alors que les formes 30S et 26S quant à elles reconnaissent les molécules d'ubiquitine conjuguées à la protéine substrat [91] , [92]. Le protéasome 20S est le centre catalytique du système protéasomal qui est à lui seul à l'origine de la dégradation de 90% des protéines endommagées. Le 20S élimine les protéines oxydées [33]. La dégradation des protéines oxydées se fait par rupture des liaisons peptidiques, cette dégradation va engendrer la formation de peptides de 7 à 8 acides aminés qui seront ensuite dégradés en acides aminés par des peptidases, eux-mêmes recyclés pour la synthèse *de novo* des protéines [91]. Les sous unités α sont spécifiques du substrat par reconnaissance des structures hydrophobes exposées. Les sous unités β_1 , β_2 et β_5 sont responsables de l'activité protéolytique du 20S [88]. Le protéasome 20S a trois activités catalytiques différentes, trypsique, caspase et chymotrypsique, hydrolysant les liaisons peptidiques associées à des acides aminés basiques, acides et hydrophobes, respectivement [93]. Le protéasome 20S est considéré comme physiologiquement latent, c'est-à-dire incapable de dégrader les protéines normales, fortement repliées, car ses pores d'entrée sont normalement fermés. Cependant il a été démontré que le protéasome 20S pouvait dégrader les protéines oxydées *in vitro*, et particulièrement les protéines carbonylées [33]. Notamment il a été montré qu'une activité accrue du 20S peut être, chez les eucaryotes, à l'origine d'une remise à zéro du niveau de protéines carbonylées lors de la différenciation cellulaire [32], [94], [95].

Fonction des protéasomes 26S/30S : On parle de système ubiquitine-protéasome (UPS) lorsque le 26S est associé à des protéines régulatrices et aux enzymes d'ubiquitinylation. Les protéasomes 26 et 30S sont ATP-dépendants et sont responsables de la dégradation des protéines polyubiquitinylées (protéines en fin de période biologiques par exemple). La poly-ubiquitinylation, *via* des récepteurs à l'ubiquitine qui contiennent des UBD (pour Ubiquitin Bind Domain) constitue un signal de dégradation des protéines pour les formes 26S/30S. Pour être dégradées, les protéines devront comporter au moins 3 ubiquitines supplémentaires qui devront être attachées linéairement à la première ubiquitine *via* la 48^{ème} lysine de la 1^{ère} ubiquitine. L'ubiquitination du substrat est effectuée par trois enzymes : E1, E2 et E3 (ces enzymes font partie du système ubiquitine protéasome UPS) [75].

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est hautement régulé via notamment des régulateurs du protéasome 20S [92]. A ce jour, quatre régulateurs du 20S ont été identifiés chez les mammifères : PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ and PA200 et 19S [75], [96], [97]. Le rôle du complexe 19S est primordial, en effet, le couvercle va reconnaître et lier le substrat tandis que la base va ouvrir et ainsi faciliter l'accès des protéines à la chambre protéolytique [89]. Concernant PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ and PA200, ceux-ci vont moduler la structure du 20S en ouvrant le canal composé des hélices α , facilitant ainsi l'entrée des protéines dans la chambre protéolytique.

La structure de l'UPS est présentée en Figure 7.

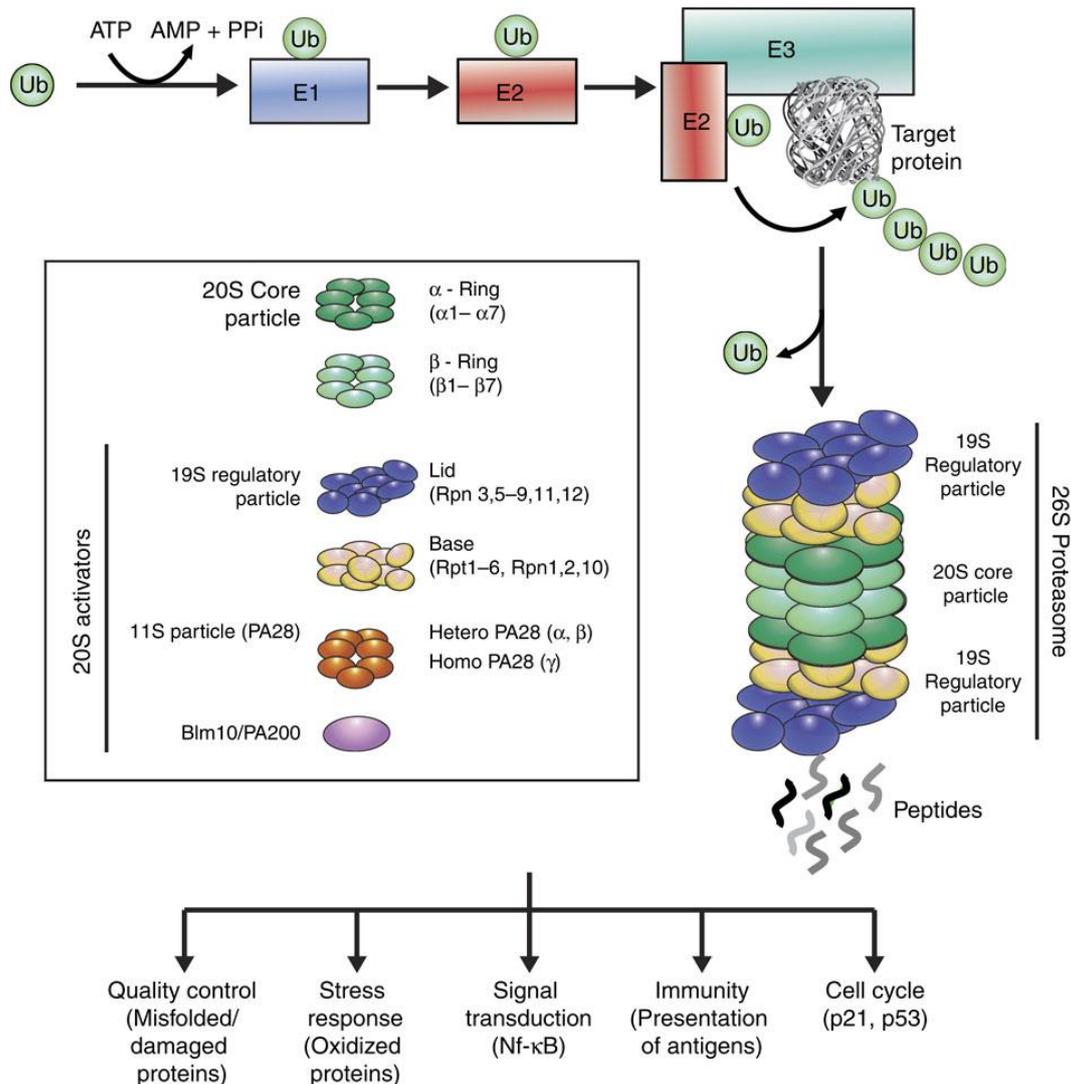


Figure 7 : Le système ubiquitine protéasome (UPS) [92]

De par sa nature protéique, le protéasome peut lui aussi subir les effets des rayonnements ionisants [89]. En effet, il a été démontré que l'activité globale du protéasome était impactée dès 2Gy d'irradiation gamma aiguë, et ce de manière non dose-dépendante (débit de dose de 5Gy.min⁻¹). En particulier, la sous-unité S6 ATPase, une sous-unité 19S responsable de la

translocation du substrat dans le noyau catalytique 20S, a été identifiée comme étant la cible des rayonnements ionisants, et la modification de sa structure entraîne une diminution de 60% de l'activité de type chymotrypsine [89]. De plus l'inhibition radio-induite de l'activité globale du protéasome est immédiate (15 minutes post irradiation gamma aiguë à 10Gy) et dure au moins 24h, après il semblerait qu'il y ait un remaniement moléculaire entraînant un recouvrement de l'activité du protéasome. Cette étude a également démontré qu'il n'y avait pas de modification de l'expression du protéasome 3h post irradiation entre 1 et 20Gy. Il est également bien établi que, durant un stress oxydatif, les 30S/26S peuvent se dissocier de manière réversible (*via* notamment HSP-70), pour libérer la forme 20S du protéasome et des régulateurs 19S afin de dégrader immédiatement les protéines oxydées [98].

Cependant les mécanismes régissant la radiosensibilité du protéasome ne sont pas complètement élucidés et il semble nécessaire de poursuivre les investigations à ce propos.

3. Conséquences cellulaires des dommages moléculaires radio-induits et lien avec la radiobiologie

Face aux nombreuses atteintes moléculaires générées par les rayonnements ionisants, la cellule est capable de mettre en place des systèmes de réparation de l'ADN faisant notamment intervenir des protéines spécifiques. Ces systèmes, plus ou moins efficaces vont tenter de réparer les lésions radio-induites de l'ADN conditionnant le devenir de la cellule.

En effet, si la réparation des lésions radio-induites est totale, la cellule conservera son intégrité, et il n'y aura aucune conséquence sur sa survie. En revanche, si les lésions sont trop nombreuses, difficilement réparables, ou bien si les protéines chargées de la réparation cellulaire sont elles-mêmes impactées par l'irradiation, il est alors question de réparation incomplète ou nulle. Ce niveau de réparation a pour conséquence à terme la mort de la cellule par nécrose. Ceci détermine en radiobiologie les effets obligatoires ou déterministes. Enfin, il peut exister également une réparation fautive des lésions radio-induites. Dans ce cas précis, la cellule a tenté de réparer les lésions mais a introduit des erreurs de réparation. Ce genre de réparation peut entraîner soit : i) la mort cellulaire programmée (apoptose) soit ii) l'apparition de mutations sub-létales. Les conséquences de ce type de mutations sont dépendantes du type de la cellule endommagée. En effet, si ces mutations ont lieu dans les cellules somatiques, les conséquences pourront être le développement de tumeurs cancéreuses. En revanche si les mutations sub-létales ont lieu dans les cellules germinales, elles seront alors transmises à la descendance. Les effets biologiques associés aux processus de mutations sub-létales sont aléatoires, tardifs et dépendants de la nature des mutations. Ceci détermine en radiobiologie les effets aléatoires ou stochastiques. La Figure 8 récapitule les conséquences cellulaires des dommages génotoxiques radio-induits.

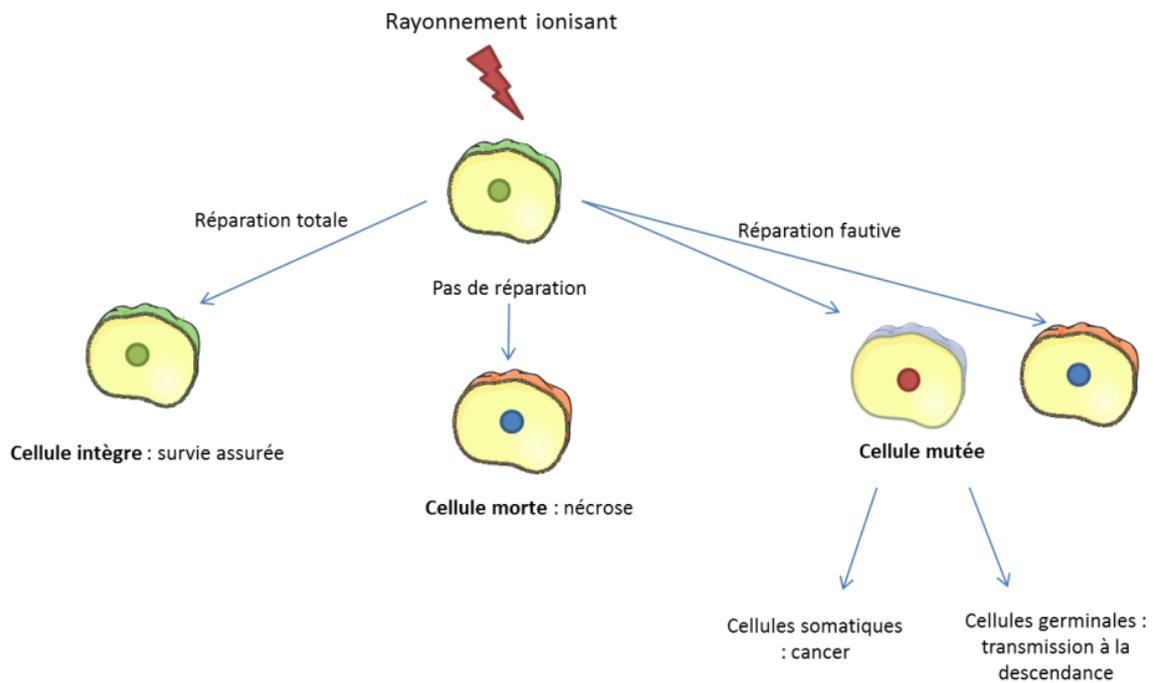


Figure 8 : schéma récapitulatif des conséquences cellulaires des dommages moléculaires radio-induits.

Les effets déterministes et stochastiques associés à une exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants sont connus et caractérisés depuis des décennies [99]. Les risques liés à une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants concernent principalement les effets stochastiques (en particulier l'apparition de cancer). Concernant ces effets stochastiques, en raison de la pénurie de données sur les faibles doses de rayonnements ionisants, l'évaluation des risques liés à une telle exposition souffre d'un manque de connaissance. En effet, à ce jour, les données acquises après exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants ont été extrapolées afin de prédire les effets des faibles doses, créant des incertitudes, car les mécanismes moléculaires sont différents entre ces deux modes d'exposition.

Plusieurs modèles d'évaluation des risques radiologiques à faibles doses existent ; ils sont présentés en Figure 9.

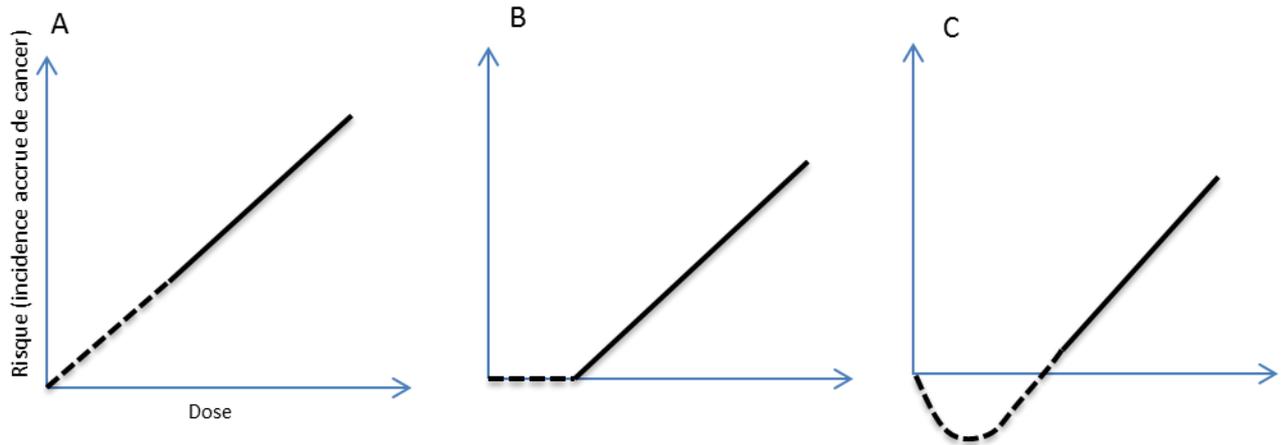


Figure 9 : Les différents modèles d'évaluation des risques radiologiques [52].

Le modèle A (linéaire sans seuil) est le modèle communément admis et soutenu depuis les années 1970 par la majorité des comités d'experts en radiologie et épidémiologie. Le modèle suppose que chaque dose augmente le risque d'effets indésirables, tel que l'incidence des tumeurs, même à des faibles doses de rayonnements (< 100mGy) où les effets ne sont aujourd'hui pas définis (trait en pointillés).

Le modèle B (linéaire à seuil) suppose qu'il n'y a pas d'effets biologiques importants en dessous d'une dose seuil.

Le modèle C (hormèse) se base sur le fait que de faibles rayonnements ionisants induisent un phénomène adaptatif positif des organismes, comme certains stress thermiques ou nutritifs.

Ces deux derniers modèles, B et C, sont aujourd'hui mis en avant dans le cadre de l'évaluation des risques liés à une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants. Cependant, il est nécessaire d'acquérir des données expérimentales spécifiques à de telles expositions, afin d'améliorer l'évaluation du risque radiologique pour l'Homme et pour l'Environnement.

III. Problématique environnementale

En raison de l'utilisation grandissante des composés radioactifs à l'échelle mondiale, notamment pour la production d'énergie, leur impact sur l'homme et les écosystèmes est devenu une préoccupation publique, réglementaire et scientifique majeure [100], [101].

1. La radioprotection de l'environnement

Jusqu'en 1991, les écosystèmes ne sont vus en termes de radioprotection que comme des vecteurs d'exposition de l'homme, qui est l'objet à protéger. Postulant que l'espèce humaine est la plus radiosensible, la protéger revient à ne pas mettre en danger les autres espèces (ICRP 1977). Au cours de la dernière décennie, l'insuffisance de démonstrations scientifiques

a conduit à remettre en cause ce postulat [40], [102]. Ainsi, la nécessité d'un accord international sur la protection des espèces non humaines, en supplément des normes déjà établies pour l'homme a été reconnue [103].

C'est dans ce contexte, qu'un certain nombre de projets nationaux et internationaux ont été développés, comme les programmes européens FASSET¹ et ERICA² [104], [105]. Ces programmes ont pour buts d'élaborer un cadre méthodologique pour l'évaluation de l'impact environnemental des rayonnements ionisants mais également de veiller à la pertinence des décisions sur les questions environnementales au regard de l'exposition, des effets, et des risques liés aux rayonnements ionisants. Pour ce faire, la base de données FREDERICA, regroupant les informations de la littérature sur les effets des rayonnements ionisants sur de nombreux groupes d'espèces non-humaines, a été mise en place [106]. Cette base de données a permis de dériver un débit de dose sans effet (PNEDR « Predicted No Effect Dose Rate ») de $10\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ en plus du bruit de fond naturel, considéré comme le débit de dose de référence pour la protection des écosystèmes [107].

Cependant, certains programmes de recherche, notamment le projet FASSET, ont mis en évidence que la plupart des données disponibles étaient insuffisantes pour établir une estimation précise du risque radiologique [105]. De plus, la base de donnée FREDERICA a permis de mettre en lumière qu'il existe deux fois plus de données concernant les effets résultants d'expositions aiguës, que de données concernant les effets résultants d'expositions chroniques à de faibles débits de doses. Pourtant, les situations d'expositions chroniques à de faibles doses de rayonnements ionisants sont reconnues comme étant écologiquement pertinentes [108]. La caractérisation de ces conditions d'exposition dangereuses constitue un des objectifs de la radioprotection de l'environnement pour veiller à la conservation de la structure et des fonctions des écosystèmes. L'évaluation des risques radiologiques doit désormais être appréhendée sur des espèces biologiques représentatives de l'environnement, des paramètres sensibles, des doses et débits de doses réalistes des conditions environnementales, et sur des temps d'exposition pertinents [109].

Pour cette raison, les études menées en radioécologie se sont de plus en plus focalisées sur l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires radio-induits, permettant ainsi des avancées scientifiques majeures dans le domaine de la radio-toxicogénomique [110]. Cette discipline vise à intégrer des marqueurs subcellulaires, généralement plus sensibles et précoces que les marqueurs dits « macroscopiques », afin de prédire les effets sur les grandes fonctions physiologiques que sont la morbidité, la reproduction et la mortalité [111]. Ces critères d'effet sont pertinents à étudier afin d'évaluer l'impact des rayonnements ionisants sur le maintien et la dynamique des populations [112]. La morbidité est définie

¹ FASSET : Framework for assessment of environmental impact of ionizing radiation in European ecosystems

² ERICA : Environmental Risk from Ionising Contaminants: Assessment and Management

comme l'ensemble des perturbations venant affecter les processus biologiques d'un organisme, causant ainsi une diminution de la valeur sélective des populations (capacité de reproduction et de survie) [5]. La reproduction définit le succès reproducteur d'une population, c'est-à-dire sa fécondité (capacité à se reproduire) et sa fertilité (capacité à produire une descendance viable et abondante).

La compréhension mécaniste des processus reliant les niveaux d'exposition aux effets observés à l'échelle de l'individu, et par extrapolation aux populations et aux écosystèmes, reste essentielle afin de protéger correctement les biotes non-humains [113]. La Figure 10 illustre les différents niveaux d'organisation biologique, leur pertinence écologique et leur sensibilité.

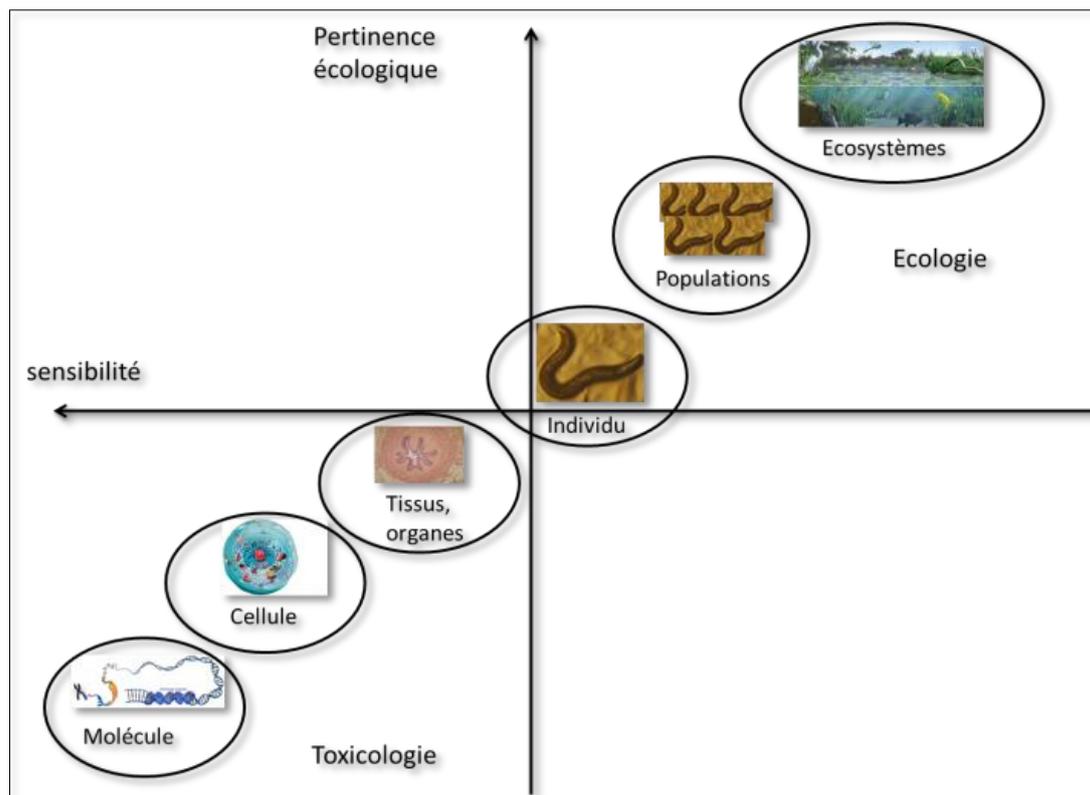


Figure 10: Représentation des différents niveaux d'organisation biologique, leur pertinence et leur sensibilité [114].

Pour répondre aux objectifs de la radioprotection environnementale, il paraît maintenant nécessaire d'utiliser des approches intégrées afin d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu à différents niveaux d'organisation biologique, pour trouver des marqueurs sensibles d'exposition et à terme, protéger adéquatement l'Environnement.

Dans ce sens, des avancées scientifiques ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires radio-induits [110]. Aujourd'hui, comprendre comment les radiations ionisantes peuvent altérer les populations environnementales est un enjeu majeur en radioécologie. Cependant, afin de permettre une évaluation du risque radiologique fiable et représentative des populations, il est important d'intégrer une

démarche multiphyllum, afin de prendre en compte toutes les espèces environnementales plus ou moins radiosensibles.

2. Etat de l'art des effets d'une irradiation gamma sur les espèces non-humaines - Notion de radiosensibilité des espèces

a. Après irradiation aiguë

La grande majorité des travaux sur les effets des rayonnements ionisants concerne des données acquises après expositions aiguës à de fortes doses, c'est-à-dire lors d'exposition sur des temps courts (de quelques minutes à quelques heures, en fonction du cycle de vie de l'organisme irradié) et dépassant souvent 1Gy. Ces études, axées principalement sur les effets d'une irradiation gamma externe (césium 137 et cobalt 60), visaient à déterminer des doses d'exposition entraînant 50% de mortalité chez les organismes irradiés (DL50), ou bien des doses d'exposition entraînant une diminution de 50% de la reproduction chez les organismes irradiés (ED50). Les données de DL50 sont utiles pour classer les différents groupes taxonomiques en fonction de leur radiosensibilité : une faible valeur de DL50 indique une forte radiosensibilité [115].

La Figure 11 représente les différents groupes taxonomiques en fonction de leur radiosensibilité aux rayonnements gamma.

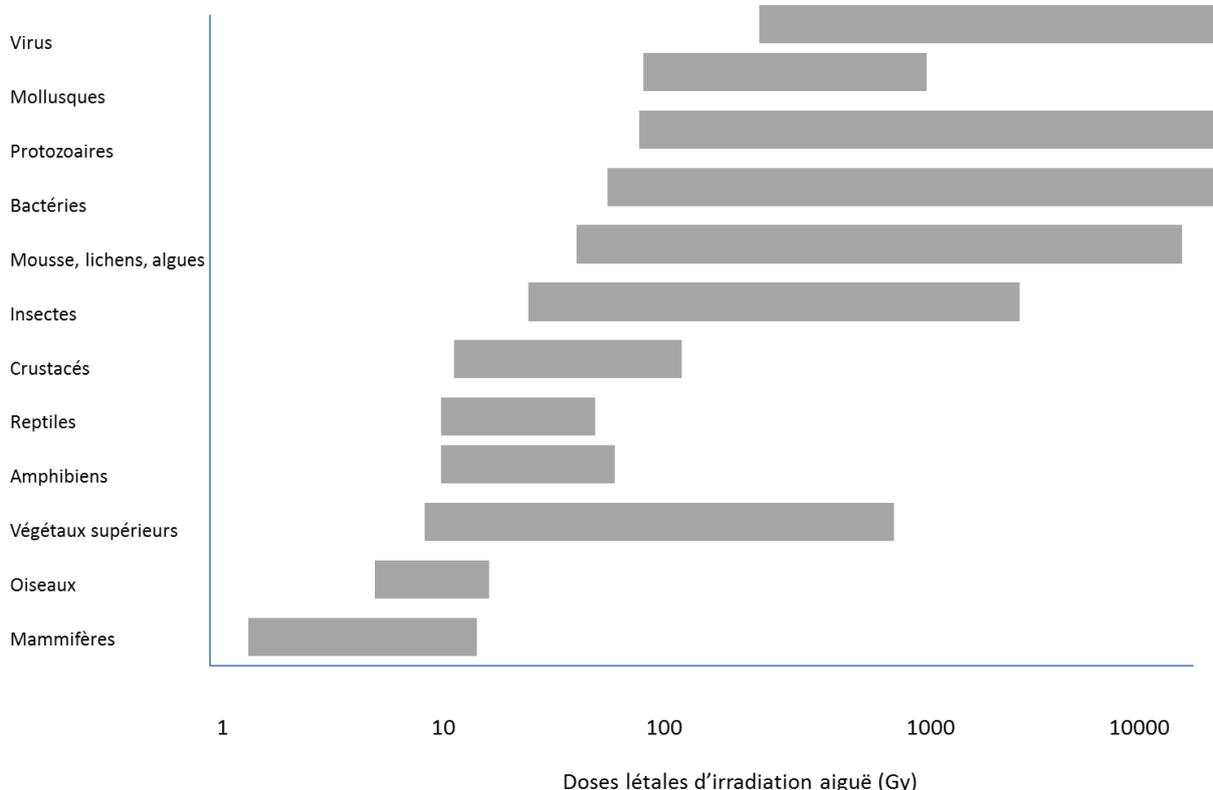


Figure 11 : Gamme de doses létales d'irradiation gamma en fonction des différents groupes taxonomiques [116].

L'étude présentée ci-dessus souligne qu'il existe une radiosensibilité différentielle des espèces soumises à une exposition aiguë. En effet, les mammifères semblent être le groupe taxonomique le plus radiosensible, suivi par les oiseaux, les amphibiens, les reptiles, les crustacés et les insectes, jusqu'aux virus. De plus, à l'intérieur d'un même groupe taxonomique, certaines espèces peuvent être plus ou moins radiosensibles. Par exemple, concernant les effets de l'irradiation aiguë sur la mortalité, chez les invertébrés des sols, la DL50 de *Folsomia candida* varie de 1343 à 1368 Gy, alors que celle de *Eisenia foetida* est de 825Gy à 30 jours post irradiation [117], [118]. Sur ces mêmes espèces, la DE50 reproduction de *Folsomia candida* est de 21.9Gy alors que celle d'*Eisenia foetida* est de 11.1Gy [119]. Ces études suggèrent donc qu'*Eisenia foetida* est plus radiosensible que *Folsomia candida*. De plus, au sein d'une même espèce, le stade de vie peut aussi impacter la radiosensibilité. Par exemple, chez la souris adulte, sa DL50 mesurée à 30 jours post irradiation est de 6.4Gy alors que celle des embryons est inférieure à 1Gy [120]. Chez les grenouilles, les œufs fertilisés sont plus radiosensibles que les adultes, avec une DL50 de 0.6Gy et 25Gy, respectivement (temps d'observation entre 40 et 160 jours en fonction du stade de vie testé) [121]. Une DL50 variant de 5 à 63Gy a été reportée pour les graines de conifères en dormance, alors que les conifères en phase de développement présentent une DL50 comprise entre 4.6 et 16Gy [122]. Une différence de radiosensibilité a également été observée en fonction du stade de vie chez les invertébrés. Par exemple, chez les insectes adultes (drosophiles et guêpes), leur DL50 varie de 20 à 3000Gy, alors que celle des embryons varie de 1 à 2Gy [123]. Cette différence de radiosensibilité en fonction des stades de vie est également retrouvée en mesurant des paramètres de reproduction. Il a été montré chez les mammifères, qu'une exposition à 0.05Gy durant la phase d'embryogenèse précoce, induisait une augmentation significative de la mortalité des embryons de rat. Alors qu'une exposition à cette même dose pendant la phase organogénèse induisait des malformations des ratons sans pour autant induire de mortalité chez ceux-ci [124], [125].

Il paraît donc nécessaire de prendre en compte le stade de développement de l'organisme étudié, afin de permettre une meilleure évaluation du risque environnemental des rayonnements ionisants.

b. Après irradiation chronique

i. Sur une génération

A ce jour, un nombre restreint d'études s'est intéressé aux effets des expositions chroniques des rayonnements ionisants chez les biotes non humains, bien que celles-ci soient représentatives des conditions environnementales. Une grande partie des études des effets des rayonnements ionisants sur la morbidité et la reproduction, concernent les mammifères, les poissons, les végétaux supérieurs ainsi que des invertébrés terrestres et aquatiques [106].

La plupart des études menées sur la chronicité en radioprotection ont mis en évidence que la reproduction, par rapport à la morbidité et à la longévité, était le paramètre biologique macroscopique le plus radiosensible, quelle que soit l'espèce considérée.

Par exemple chez les mammifères, il a été montré qu'une irradiation gamma externe à un débit de dose compris entre 0.1 et 1mGy.h⁻¹ induisait une diminution du nombre de cellules germinales, de la masse des ovaires et des testicules ainsi qu'une perturbation des capacités de reproduction chez le rat et le cochon [126], [127] (durée d'exposition de 108 jours). Pour des débits de doses variant de 1 à 5mGy.h⁻¹, il a été mis en évidence une sévère déficience de la capacité reproductrice chez la chèvre, la souris et le rat. Les animaux irradiés ont vu leur fertilité ainsi que leur fécondité diminuée (durée de période de fertilité, nombre de descendants par individus et nombre de cellules germinales mâles et femelles) (durée d'exposition de 20jours) [128]–[131]. Chez le poisson, pour des débits de doses compris entre 0.1 et 1mGy.h⁻¹, il a été observé une réduction de la masse testiculaire et de la production de sperme, une diminution de la fécondité ainsi qu'une baisse de la ponte chez *Rutilus rutilus*, *Pleuronectes platessa* et *Oryzias latipes* (durées d'expositions comprises entre 120 et 138jours) [132], [133]. Certaines études ont démontré une reprotoxicité de l'irradiation gamma chronique chez les invertébrés aquatiques tels que *Ophryotrocha diadema*, *Neanthes arenaceodenta* et *Daphnia magna* exposés pendant 21, 12 jours et 23 jours respectivement. Ces études ont montré une baisse du nombre de descendants par individus ainsi qu'une diminution du succès reproducteur à des débits de doses de 0.19, 13.7 et 31mGy.h⁻¹ respectivement [134]–[136]. Chez les végétaux supérieurs, des études ont montré que le pin et certaines espèces herbacées, présentaient une diminution de leur production de graines et de la germination après avoir été chroniquement exposées à des débits de doses compris entre 10 et 20 mGy.h⁻¹ [137], [138].

Les effets chroniques radio-induits sur la morbidité, sont quant à eux, représentés principalement par des perturbations du développement et des réductions de taille et de masse des individus. En effet, chez les mammifères, il a été montré qu'une irradiation gamma chronique à un débit de dose compris entre 5 et 10 mGy.h⁻¹ pendant 6jours induisait une diminution de la masse du cerveau chez le rat [139]. De même, plusieurs études ont montré que l'irradiation chronique durant 20jours à un débit de dose compris entre 1 et 5mGy.h⁻¹ était à l'origine d'un retard de croissance chez la truite arc en ciel (*Onchorhynchus mykiss*) [140]. De plus, des réductions de taille et de masse (racines et feuilles) ont été observées chez la plante *Arabidopsis thaliana* soumise à une exposition chronique durant 24jours à partir de 60μGy.h⁻¹ [141]. Cependant, des études menées après exposition chronique sur les invertébrés du sol et aquatiques n'ont pas montré d'effet sur la croissance des individus exposés (*Eisenia fetida* et *Daphnia magna*), alors qu'un effet sur la reproduction de ces deux espèces est démontré [125], [142], [143].

En revanche, peu de données existent sur la sensibilité à l'exposition chronique des bactéries, crustacés, champignons, mousses et lichens ainsi que du zooplancton. Ce manque

de données ne permet donc pas de tirer de conclusions sur les effets possibles de l'exposition chronique aux rayonnements ionisants au sein de ces groupes taxonomiques [106]. Cependant, une étude de synthèse de la littérature publiée en 2013, a permis de mettre en évidence, *via* l'utilisation des EDR10 (Débit de dose entraînant une diminution de 10% d'un paramètre physiologique chez les organismes irradiés, ici principalement la reproduction), que la radiosensibilité d'espèces environnementales clés s'étendait sur plus de cinq ordres de grandeurs, sans qu'il y ait d'explication mécaniste connue (Figure 12). En outre, on peut constater que les études menées après expositions chroniques permettent de déceler des effets sur certains groupes taxonomiques à des débits de doses inférieurs à $100\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ [126], [144], [145] (Figure 12).

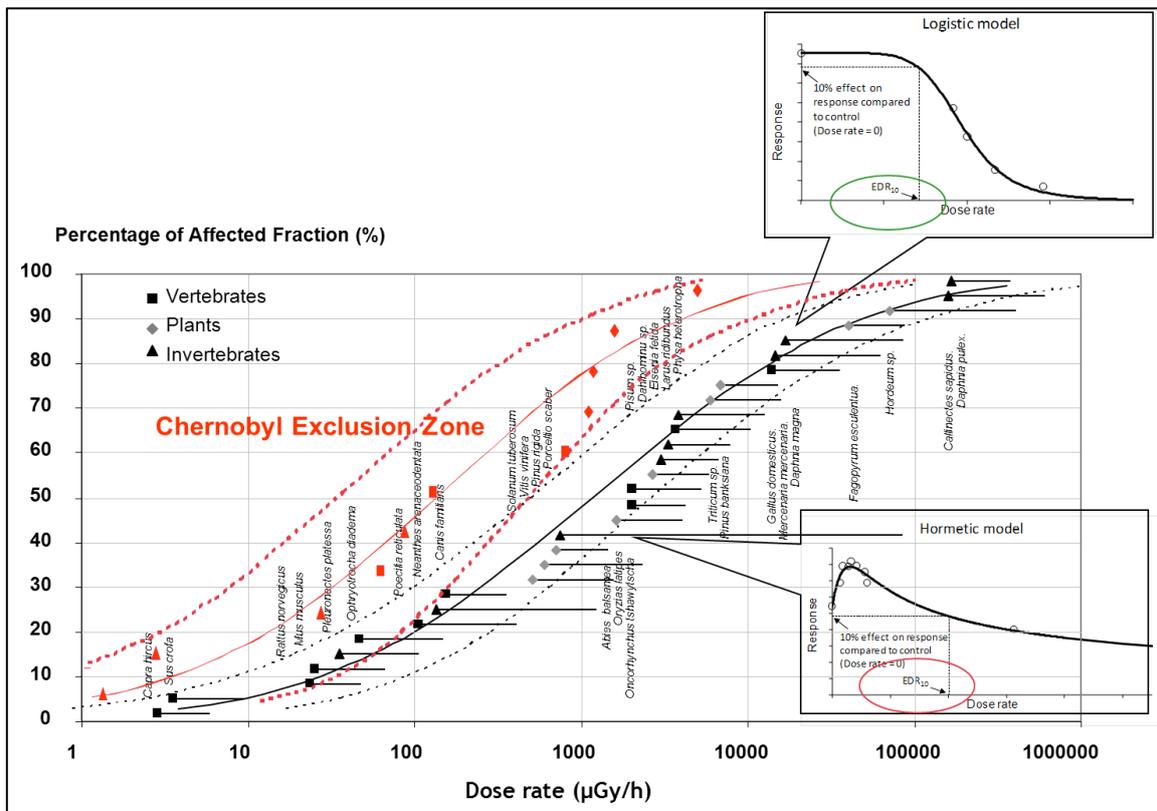


Figure 12 : Radiosensibilité des espèces environnementales (vertébrés, plantes et invertébrés) soumises à une exposition chronique aux rayonnements ionisants : comparaison entre les données de terrain (zone d'exclusion de Tchernobyl et les données de laboratoire) [4].

ii. Après irradiation chronique multigénérationnelle

Les études évaluant les effets des rayonnements ionisants sur les organismes vivants pendant plusieurs générations permettent de détecter les effets à long terme. En effet, certaines perturbations, comme les mutations par exemple, peuvent être accumulées au cours du temps et à terme peuvent induire un effet observable à l'échelle de l'individu [146]. Dans la nature, les populations sont la plupart du temps exposées aux contaminants pendant plusieurs semaines, plusieurs mois voire plusieurs années, dépassant ainsi leur

durée de vie et impliquant plusieurs générations. Malgré les avantages et la pertinence environnementale des études multigénérationnelles, celles-ci restent toutefois rares dans le domaine de la radioprotection environnementale.

La plupart des études disponibles concernant les effets des rayonnements ionisants sur plusieurs générations continuellement exposées tendent à montrer qu'il existe une augmentation de radiosensibilité des organismes au fil des générations. En effet, en 1994 Knowles et Greenwood ont mis en évidence que des débits de doses variant de 1.7 à 13.7mGy.h⁻¹ délivrés par une source de césium 137 induisaient une diminution progressive de la reproduction chez le polychète marin *Ophryotrocha diadema* lorsque celui-ci était exposé pendant trois générations. Sur la première génération, seul le nombre d'œuf pondus par individu diminuait au plus fort débit de dose. En revanche, sur les deuxième et troisième générations exposées, le nombre d'œuf par individu mais également la survie des œufs et des larves étaient affectées dès 1.7mGy.h⁻¹ [135]. D'autres études menées sur *Caenorhabditis elegans* et sur *Neanthes Arenaceodentata* ont également mis en évidence que l'irradiation gamma externe (césium 137 et cobalt 60) était responsable d'une diminution du succès reproducteur au fil des générations exposées, et ce quel que soit le débit de dose testé (47mGy.h⁻¹ pour *C. elegans* et de 0.19 à 17mGy.h⁻¹ pour *Neanthes Arenaceodentata*) [134], [143]. D'autre part, une étude sur le nématode *Caenorhabditis elegans* a montré que l'irradiation chronique (pendant 2,5jours à un débit de dose de 51mGy.h⁻¹) sur la génération parentale pouvait avoir un impact sur son succès reproducteur et être transmis aux générations suivantes (jusqu'à 4 générations) (I. Nosel communications personnelles).

Bien qu'aujourd'hui, certaines études ont émis l'hypothèse que les atteintes radio-induites sur la lignée germinale en particulier chez l'organisme *C. elegans* étaient responsables des effets phénotypiques observés sur les générations futures, les mécanismes moléculaires précis expliquant ces effets multigénérationnels ne sont à ce jour pas élucidés [143].

c. Influence du mode d'exposition sur les effets observés après irradiation gamma – Comparaison aiguë/chronique.

L'exposition chronique nécessite d'irradier le modèle biologique à des doses faibles sur un laps de temps de plusieurs jours ou mois, en fonction de la durée de vie de l'organisme, tandis que l'irradiation aiguë est réalisée en quelques secondes ou minutes. La comparaison des doses se fait à partir de la dose cumulée (en Gy), qui est le produit du débit de dose délivré par la source par le temps d'exposition.

A l'heure actuelle, peu d'études ont comparé les différentes réponses des organismes soumis à une exposition chronique et à une exposition aiguë aux rayonnements ionisants.

Une équipe de recherche, a exposé des embryons de *Danio rerio*, à une source de césium 137, chroniquement pendant 24h à des doses cumulées allant de 1 à 750Gy (débit de dose compris entre 0,1 et 0,75 Gy.jour⁻¹) et, de manière aiguë pour des doses cumulées comprises entre 0,3 et 2Gy (débit de dose de 1Gy.min⁻¹). Les résultats de cette étude ont montré que

l'irradiation chronique induit des dommages irréversibles de l'ADN et des effets sur le développement (accélération de l'éclosion), tandis que l'irradiation aiguë provoque un développement anormal de l'embryon (malformations) [8].

D'autres études ont comparé les réponses des organismes après irradiation aiguë vs chronique. En 2004, une étude s'est intéressée à la méthylation de l'ADN génomique dans les tissus du muscle et du foie chez les souris soumises à une exposition chronique et aiguë aux rayons X. Les souris adultes exposées de façon chronique ont été irradiées pendant 10 jours à un débit de dose de $50\text{mGy}\cdot\text{j}^{-1}$ alors que celles soumises à une exposition aiguë ont reçu la dose de 500mGy le 10^{ème} jour (débit de dose $120\text{mGy}\cdot\text{min}^{-1}$). Les résultats de cette étude ont révélé que l'irradiation aiguë n'a aucun impact sur la méthylation du génome que ce soit sur le foie ou le tissu musculaire. En revanche, à dose équivalente, l'irradiation chronique induisait une hypométhylation du génome dans le muscle mais pas dans le foie [147]. En 2007, l'équipe d'Olga Kovalchuk a montré que les plantes *Arabidopsis thaliana* exposées durant 21 jours à un sol contaminé au césium 137 à une dose cumulée de 1Gy présentait un plus fort taux de recombinaison homologue que celles exposées à la même dose cumulée délivré de manière aiguë le 21^{ème} jour par une source de cobalt 60. De plus, les auteurs ont montré que contrairement à l'irradiation aiguë, l'irradiation chronique induisait une floraison précoce. L'analyse du transcriptome a révélé l'induction de gènes de floraison chez les individus exposés de manière chronique, expliquant alors potentiellement le phénotype observé [148].

Ces études montrent que la qualité et l'intensité des effets induits par une exposition chronique aux rayonnements ionisants diffèrent de ceux induits par une exposition aiguë. De plus, il semblerait que le débit de dose ait également son importance dans les dissemblances observées. En effet, récemment, une étude a exposé *Petunia x hybrida* à une dose cumulée de 50Gy à deux différents débits de doses ($5.15\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ et $0.33\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant des temps d'irradiation courts (10 minutes et 2,5 heures respectivement). Les auteurs ont montré que l'exposition au fort débit de dose engendrait plus de dommages à l'ADN que l'exposition au faible débit de dose. En revanche, l'exposition au fort débit de dose améliorait fortement les mécanismes de défense cellulaires [149]. En outre, certaines des études citées utilisent des sources de rayonnements différentes entre l'exposition aiguë et chronique (137 césium et 60 cobalt) [147], [148]. Or, les résultats d'une étude parue en 1996, mesurant la survie à 5 jours de l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans* exposé soit à une source de cobalt 60 (débit de dose de $4.7\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) soit à une source de césium 137 (débit de dose de $4.32\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$), ont montré que le nématode, en fonction du stade de vie irradié, était entre 1.3 et 22 fois plus sensible au césium 137 qu'au cobalt 60 [150].

Ces études montrent que les effets et les mécanismes semblent distincts entre ces modes d'irradiation toutefois elles soulignent également que la comparaison aiguë vs chronique n'est pas chose aisée, que l'énergie du rayonnement et le débit de dose sont des paramètres importants.

Afin de permettre une évaluation et une gestion du risque radiologique fiables et représentatives de l'environnement, il est nécessaire d'utiliser une démarche intégrée et multi-espèces, de manière à prendre en compte la radiosensibilité différentielle des espèces vivant dans l'environnement. Dans le domaine de la radioécologie et de l'écotoxicologie, des espèces modèles ont été sélectionnées pour représenter chaque écosystème et de déterminer de manière approfondie les mécanismes moléculaires de radiotoxicité. L'organisme *Caenorhabditis elegans*, en plus d'être un organisme modèle de laboratoire, fait partie d'une de ces espèces environnementales clés susceptibles de jouer un rôle majeur dans le maintien et la pérennité des écosystèmes. Le chapitre suivant détaille cette espèce modèle, représentative des sols, et son comportement vis-à-vis du rayonnement ionisant.

IV. *Caenorhabditis elegans* et les rayonnements ionisants

Cette section a pour but de présenter le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'organisme d'étude utilisé pour ce projet. Elle expose ses caractéristiques biologiques et met en évidence l'intérêt de son utilisation en radio-toxicologie.

1. Biologie de *C. elegans*

a. Phylogénie

Caenorhabditis elegans est un nématode (ver rond) de la famille des *Rhabditidae* et du genre *Caenorhabditis*. Cet invertébré a été caractérisé, étudié et classifié pour la première fois par Emile Maupas en 1900 [151]. La classification phylogénique de *C. elegans* est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1: Classification scientifique de *Caenorhabditis elegans* [151]

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Nematoda</i>
Classe	<i>Secernentea</i>
Ordre	<i>Rhabditida</i>
Famille	<i>Rhabditidae</i>
Genre	<i>Caenorhabditis</i>
Espèce	<i>Caenorhabditis elegans</i>

b. Ecologie

Caenorhabditis elegans est un eucaryote pluricellulaire, ubiquiste qui joue un rôle prépondérant dans le cycle, la dégradation et la décomposition des nutriments dans l'environnement. Ce nématode, vit dans les sols, et particulièrement dans les zones à activités anthropiques comme le compost ou le sol des jardins, mais également dans les sédiments aquatiques des systèmes d'eau douce [152]. *C. elegans* est un organisme bactériophage non parasitaire qui vit libre dans l'environnement, mais il est également possible de le retrouver en association avec d'autres espèces d'invertébrés (gastéropodes, mille-pattes, limaces). Cette association nommée « phorésie » constitue un moyen de

déplacement des juvéniles et stades larvaires de résistance (stade « dauer ») vers une nouvelle source de nourriture [152], [153]. De plus, il existe deux sexes chez le nématode de la souche N2 : les mâles (XO) et les hermaphrodites (XX). L'hermaphrodite est capable de s'autoféconder afin de se reproduire [154]. La présence de mâles est due à la non-disjonction d'un chromosome X lors de la méiose. Les hermaphrodites sont dominants en conditions « normales », la présence de mâles est facultative et augmente en situation de stress afin de diversifier le patrimoine génétique des descendants.

c. *Caenorhabditis elegans* : un organisme modèle

Les années 1960 ont été marquées par l'intérêt grandissant pour le nématode *C. elegans* en raison de ses caractéristiques prometteuses pour la recherche en biologie. Sa culture aisée sur boîtes de Petri, son cycle de vie court ainsi que la possibilité de cryoconservation des populations (-80°C) en font un organisme approprié pour une utilisation en laboratoire, et permettent de produire de larges populations en un minimum de temps et de coûts [155]. La souche la plus communément utilisée en laboratoire est la souche sauvage N2, qui a été isolée à partir d'humus [156]. L'étude de mutants, débutée avec les travaux de S. Brenner et son équipe en 1974, a permis de cartographier de nombreux gènes et d'étudier de nombreuses voies moléculaires [157]. Aujourd'hui, le génome de *C. elegans* est entièrement séquencé ce qui rend possible l'utilisation des techniques de génomique et de protéomique [158]. Ainsi le génome de *C. elegans* est composé de 97 millions de paires de bases, réparties en 6 chromosomes, et codant pour 19099 gènes [159]. Enfin, il est possible de compléter ces approches par la génération d'individus transgéniques qui possèdent, par exemple, la séquence d'un gène d'intérêt (ou de son promoteur uniquement) couplé à la séquence d'une protéine fluorescente permettant de suivre son expression au cours du temps [160].

Enfin, *C. elegans* est capable de se développer sur une large gamme de température [161] mais son utilisation en laboratoire se fait entre 15°C et 25°C [162]. En laboratoire, la source de nourriture de *C. elegans* est la bactérie intestinale *Escherichia coli* [153].

d. Cycle de vie

Le cycle de vie de *C. elegans* est de trois jours à 20°C. Cependant une variation de température peut avoir des effets sur son cycle de vie et sa reproduction [162] (Tableau 2).

Tableau 2: Développement de la souche sauvage N2 de *C. elegans* à différentes températures [162].

	16°C ± 0,3	20°C ± 0,5	25°C ± 0,2
Ponte	0 h	0 h	0 h
Éclosion	16-18 h	10-12 h	8-9 h
Première mue	36,5 h	26 h	18 h
Seconde mue	48 h	34,5 h	25,5 h
Troisième mue	60 h	43,5 h	31 h
Quatrième mue	75 h	56 h	39 h
Début de ponte	~90 h	~65 h	~47 h
ponte maximale	~140 h	~96 h	~62 h
Fin de ponte	~180 h	~128 h	~88 h
Taille à la première mue	360 µm	370 µm	380 µm
Taille à la seconde mue	490 µm	480 µm	510 µm
Taille à la troisième mue	650 µm	640 µm	620 µm
Taille à la quatrième mue	900 µm	850 µm	940 µm
Taille au début de la ponte	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Taux maximal de ponte	5,4 h ⁻¹	9,1 h ⁻¹	8,1 h ⁻¹
Nombre total d'œufs pondus	275	280	170

Il existe deux grandes phases dans le cycle de vie de *C. elegans* : la phase embryonnaire et la phase post embryonnaire. Cette dernière est constituée par les différents stades larvaires présentés sur la Figure 13. En raison de la transparence de l'enveloppe de *C. elegans* (tégument), ses différents stades de vie peuvent facilement être observés au microscope. Cette particularité a également permis de déterminer le lignage cellulaire de *C. elegans*. En effet, celui-ci est quasi-invariant entre les individus, au stade adulte l'hermaphrodite possède 1090 cellules, dont 131 sont destinées à la mort cellulaire programmée (apoptose) [160]–[162]. *C. elegans* est un organisme eutélique partiel, ce qui signifie qu'il possède la quasi-totalité de ses cellules dès l'éclosion. C'est un organisme post-mitotique au stade adulte car seules les cellules germinales subissent des divisions cellulaires [12].

du corps principal de l'animal est déjà établi à la fin de la phase d'organogénèse/morphogénèse et restera tel quel durant le développement post-embryonnaire.

f. Phase post embryonnaire

Le développement post-embryonnaire démarre lorsque le nématode se nourrit directement après l'éclosion. L'animal passe alors par quatre stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) avant d'atteindre l'âge adulte (Figure 13). Ces changements de stades de vies sont caractérisés par des mues, au cours desquelles une cuticule spécifique du nouveau stade larvaire est synthétisée remplaçant alors l'ancienne. Les cellules blastiques (cellules indifférenciées) vont se diviser en motifs temporels et spatiaux presque invariables à travers les quatre stades larvaires et vont donner lieu à un nombre de cellules différenciées fixe (959 à l'âge adulte) [163], [166]. Durant les différents stades larvaires, le corps de *C. elegans* va grandir sans qu'il y ait de changements dans la forme du nématode (de 250µm au stade L1 jusqu'à atteindre environ 1200µm au stade adulte). Une fois le stade adulte atteint, le nématode est gravide, ce qui signifie qu'il porte des œufs [167].

Le système reproducteur de l'hermaphrodite produit des gamètes matures et fournit une structure et un environnement propice à la fertilisation et la ponte. Il est composé de trois parties principales : la gonade somatique (l'organe reproducteur), la lignée germinale et l'appareil de ponte (l'utérus, la vulve et les muscles associés) [168]. Les gonades et la lignée germinale forment ensemble deux tubes distincts (en forme de « U »), nommés « bras », qui sont reliés à l'utérus et à l'appareil de ponte dans le corps central du nématode (Figure 14).

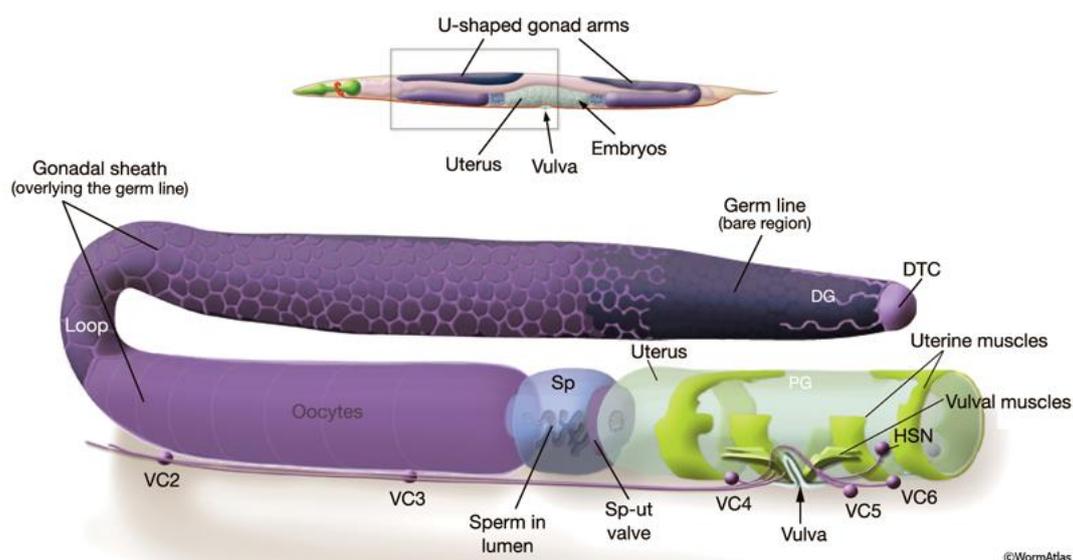


Figure 14 : Schéma du haut : vue générale du système reproducteur de l'adulte hermaphrodite. Avec en violet les bras de la gonade en forme de U, en rose l'intestin, en bleu foncé la spermathèque et en bleu ciel les embryons. Schéma du bas : zoom sur un des bras de la gonade. Avec la cellule d'extrémité distale (DTC), la partie distale de la gonade (DG) et la spermathèque (Sp). VC 1 -6 et HSNL/R sont des motoneurones qui contrôlent la ponte [168].

Comme présenté sur la Figure 14, la gonade somatique (partie de la gonade sans la lignée germinale) est composée d'une cellule d'extrémité distale (DTC pour « Distal Tip Cell »), d'une gaine qui entoure la gonade, de la spermathèque (Sp), d'une valve située entre la spermathèque et l'utérus (Sp-ut valve) et enfin de l'utérus. La lignée germinale adulte est organisée de la partie distale à la partie proximale de la gonade. La partie distale correspond à la région proche de la DTC et la partie proximale correspond à la zone la plus proche de laquelle les embryons sont pondus. Les cellules germinales situées dans la partie distale de la gonade sont mitotiques et indifférenciées. A mesure que celles-ci se déplacent le long du bras de gonade vers la zone proximale, elles entrent dans la prophase I de méiose pour fournir des ovocytes matures. L'ovocyte est fécondé dans la spermathèque puis est expulsé dans l'utérus où débute l'embryogénèse. Les embryons sont expulsés au niveau de la vulve au moment de la ponte. L'hermaphrodite est considérée comme une femelle auto-fertile car le soma est féminin mais la lignée germinale produit d'abord un nombre fixe de gamètes males (spermatozoïdes stockés dans les spermathèques) avant de démarrer la production exclusive de gamètes femelles (ovocytes) [169], [170].

Les différentes étapes du développement de l'appareil reproducteur en fonction des différents stades de vie du nématode sont développées ci-après et sont illustrées par la Figure 15.

Stade L1

A l'éclosion, le système reproducteur du nématode contient les précurseurs Z2 et Z3 des cellules germinales qui sont entourées par les précurseurs Z1 et Z4 des gonades somatiques. A la fin du stade L1, Z1 et Z4 vont se diviser pour donner lieu à deux cellules d'extrémité distale (DTC) et dix cellules proximales [171]. Les cellules précurseurs de la lignée germinale Z2 et Z3 commencent également à se diviser. Ces divisions cellulaires se poursuivent continuellement jusqu'au stade adulte [172].

Stade L2

Durant ce stade larvaire, les divisions des cellules Z2 et Z3 se poursuivent. A la mue L2/L3, les cellules germinales et somatiques se réorganisent afin d'établir la future gonade. Le bras de gonade commence à s'allonger sous l'action des signaux des DTC [172].

Stade L3

Pendant le stade L3 ainsi que la première partie du stade L4, les cellules précurseurs des gonades somatiques donnent lieu à un total de 143 cellules qui formeront les gaines des gonades antérieures et postérieures, la spermathèque et l'utérus [172]. En début de stade L3, l'extension des bras de gonades se poursuit dans des directions opposées, jusqu'à ce que les DTC stoppent leurs divisions et se réorientent lentement vers les extrémités distales de la gonade. Les cellules précurseur de la vulve se différencient afin de générer les cellules terminales vulvaires au tout début du stade L4. La prophase I de la méiose débute

également au stade L3 [171], [173]. C'est la première phase de la méiose qui débouche *in fine* sur la production de gamètes matures. Cette phase se divise en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

Stade L4/L4-Jeune Adulte

Au stade L4, la gonadogénèse se termine. Les bras de la gonade distale continuent leur migration le long des muscles de la paroi dorsale et ils complètent leur trajectoire près de la ligne médiane jusqu'à la mue L4/Adulte [174]. A ce stade, chaque bras de gonade contient 37 cellules en méiose à sa partie proximale qui vont s'engager dans la spermatogénèse afin de produire environ 150 spermatozoïdes matures par gonade [169]. A la mue L4/ L4-Jeune Adulte (L4-JA), la production de sperme s'arrête et les cellules de la lignée germinale restantes continuent de subir méiose et différenciation afin de générer exclusivement des ovocytes [168]. Au stade L4-JA l'appareil de ponte est totalement formé.

Stade adulte gravide

Au stade adulte, les cellules de la gaine des gonades forment une strate qui va entourer les différents éléments de la lignée germinale. Ces cellules qui se trouvent du côté distal de la gonade sont indispensables pour éliminer les cellules de la lignée germinale qui entrent en apoptose. Les cellules se trouvant du côté proximal de la gonade sont quant à elles nécessaires à la maturation des ovocytes et à l'ovulation [175]. Au stade adulte, les ovocytes vont continuer à se développer tout le long de la gonade en passant par les différents stades de la prophase I de méiose. La maturation des ovocytes se fait sur les ovocytes les plus proches de la spermathèque, juste avant la fertilisation, et elle est stimulée par la protéine MSP (pour « Major Sperm Protein ») [176]. Cette même protéine est également responsable de la stimulation de la fréquence et de l'intensité des contractions de la gaine des gonades, facilitant ainsi l'ovulation. Ces contractions sont à l'origine de l'ouverture de la spermathèque afin d'y faire pénétrer l'ovocyte. Dès que l'ovocyte est à l'intérieur de la spermathèque, celle-ci se referme, et l'ovocyte est immédiatement fécondé puis relâché dans l'utérus [168]. L'embryon va alors poursuivre son développement *in utero* avant d'être pondue. Un adulte hermaphrodite pond environ 300 œufs fécondés sur une période de 4 jours à 20°C.

La Figure 15 récapitule les différentes étapes du développement de l'appareil reproducteur de *C. elegans*.

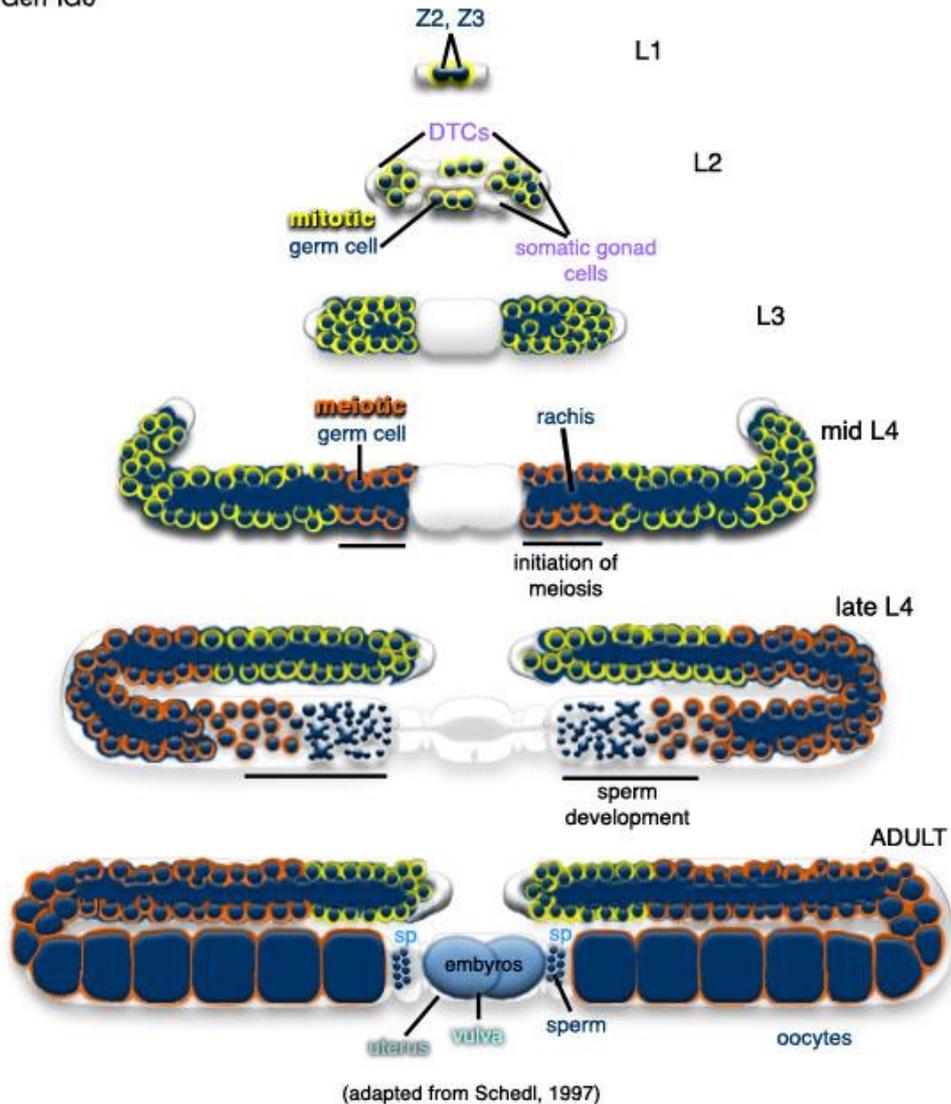


Figure 15 : Synthèse du développement de l'appareil reproducteur de l'hermaphrodite [168]

2. Etat de l'art sur les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants sur *C. elegans*

Comme vu dans le chapitre précédent, il existe une radiosensibilité différente en fonction des groupes taxonomiques. Les nématodes font partie des espèces qui sont moins radiosensibles que les amphibiens et les mammifères mais plus radiosensibles que les virus par exemple. Comme évoqué précédemment, les nombreux avantages de *C. elegans* en tant qu'organisme modèle de laboratoire ont permis de réaliser des études et d'acquies des données après irradiation. Les différentes données recensées dans la littérature sur les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants chez *C. elegans* après irradiation aiguë et chronique sont présentées ci-après. La dichotomie aiguë / chronique telle que présentée dans le chapitre III a été conservée.

a. Irradiation aiguë

i. Traits d'histoire de vie

Concernant la survie du nématode après irradiation aiguë, il a été montré que celle-ci était significativement impactée à partir de 1000Gy délivrés ($27\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$). Cette même étude a également démontré que la sensibilité du nématode à l'irradiation était dépendante de son stade de vie. En effet, les nématodes au stade L3 sont plus sensibles à l'irradiation en terme de survie que les adultes âgés de 8jours [177].

Plusieurs études ont été menées sur les conséquences d'une irradiation aiguë sur la reproduction du nématode. Concernant la survie des descendants issus de parents irradiés au stade L4, il a été montré qu'une dose de 120Gy induisait une diminution de 60% du succès d'éclosion [178]. De plus, l'équipe de Takanami en 2000 a mis en évidence que la sensibilité des gamètes à l'irradiation aiguë était dépendante de leur stade de développement au moment de l'irradiation, ce qui influençait directement le succès d'éclosion des œufs issus de parents irradiés [18], [179]. En effet, lorsque l'irradiation aiguë s'effectue sur les cellules en fin de diacinèse (5^{ème} et dernière phase de la prophase I de la méiose aboutissant à la formation de gamètes matures) ou d'embryogénèse précoce, la survie des embryons est impactée dès 40Gy. Alors que lorsque l'irradiation s'effectue sur des cellules au stade pachytène (3^{ème} phase de la prophase I de la méiose), la survie des embryons n'est alors que peu affectée, y compris pour une dose de 100Gy (baisse de 5%) [179]. Outre le succès d'éclosion, le taux de ponte peut également être affecté par l'irradiation (nombre d'œufs pondus par heure). En effet, les équipes de Gartner en 2000 et de Shumacher en 2005 ont montré que le taux de ponte de *C. elegans* était affecté dès 30Gy [13], [178].

A ce jour, une seule étude s'est intéressée à la croissance de *C. elegans* après exposition aiguë. Lee et collaborateurs ont montré que la croissance d'individus exposés au stade L1 était impactée dès 10Gy [180].

ii. Dommages subcellulaires

Il a été vu précédemment que l'irradiation aiguë provoquait des dommages génotoxiques sur la lignée germinale de *C. elegans* sans pour autant affecter la lignée somatique [12]. Les réponses moléculaires et cellulaires du nématode après irradiation aiguë ont été largement étudiées [12], [13]. Les impacts de l'irradiation gamma aiguë sur les dommages à l'ADN, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire sont détaillés ci- après.

La particularité de *C. elegans* est que l'arrêt du cycle cellulaire est spécifique des cellules mitotiques (lignée germinale et somatique) tandis que l'apoptose ne concerne que les cellules méiotiques, soit les cellules germinales [12].

Chez *C. elegans* l'apoptose fait intervenir des complexes de protéines telles que CED-3, CED-4 et CED-9. Sous l'impulsion d'un stimulus pro-apoptotique, la protéine CED-4 va se désolidariser du complexe et conduire par la suite à l'activation de la caspase CED-3 et à

l'induction de l'apoptose [181]. Si les stimuli physiologiques induisant l'apoptose sont encore méconnus et font l'objet de recherches intensives, ceux induits par irradiation sont bien documentés [182]. En effet, une irradiation va induire la production de protéines appelées EGL-1 et CED-13 qui vont se lier à CED-9 et ainsi libérer CED-4 afin d'induire l'apoptose. Un homologue de p53 (protéine pro-apoptotique) a été identifié dans le génome du nématode : CEP-1 (*C. elegans* p 53-like 1) [183]. La protéine CEP-1 s'est révélée être un activateur transcriptionnel direct d'EGL-1. Comme chez les mammifères, la protéine CEP-1 est connue pour être phosphorylée en réponse aux rayonnements ionisants [178], [184]. De plus, il est intéressant de noter que l'induction de CEP-1 est située dans une région précise de la gonade : le pachytène [182]. Bailly et Gartner ont montré qu'il existait une augmentation de l'apoptose dose dépendante chez *C. elegans* après irradiation aiguë de 7,5 à 120Gy [182]. Par conséquent, la diminution de la capacité de ponte du nématode pourrait être expliquée par une induction de l'apoptose sur les cellules germinales au stade pachytène.

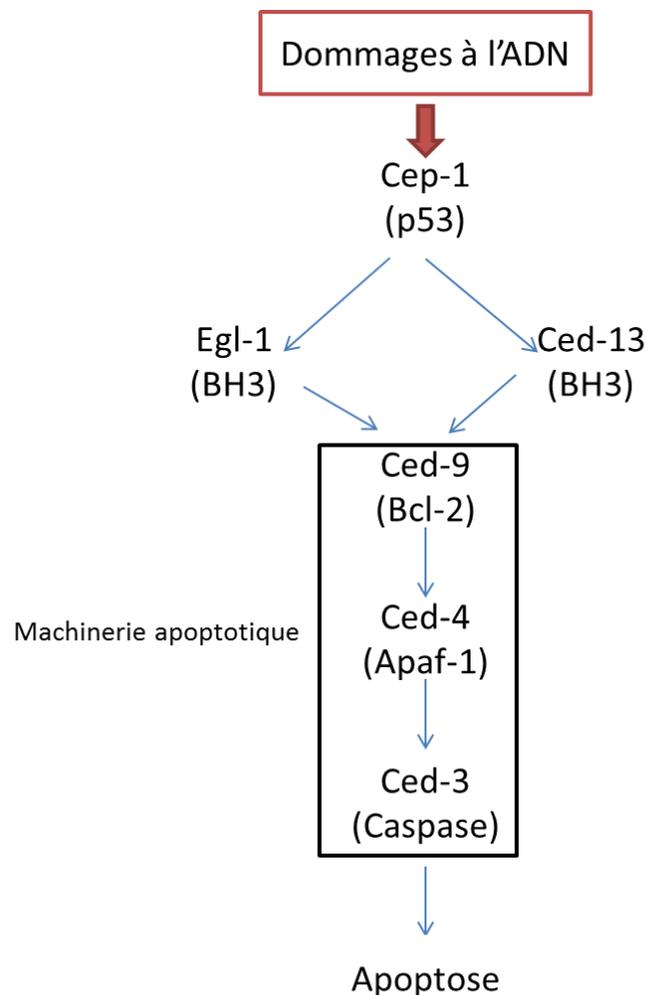


Figure 16 : Schéma récapitulatif des différentes protéines impliquées dans l'apoptose des cellules de la lignée germinale chez *C. elegans* [185]

Concernant l'arrêt du cycle cellulaire suite à une irradiation, celui-ci intervient dans la lignée germinale de *C. elegans* principalement en phase G2. En effet, la protéine CDK-1 nécessaire

à la progression du cycle cellulaire vers la phase M est connue comme étant inactive après irradiation aiguë. Bailly et Gartner ont montré un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules germinales irradiées à 60 et 120Gy [12].

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux dommages oxydatifs sur les protéines, et en particulier à la carbonylation des protéines, après irradiation aiguë sur *C. elegans*. Cette étude a notamment montré qu'il existait une augmentation du taux de protéines carbonylées à 200Gy qui semblait être corrélée à une diminution du succès d'éclosion chez *C. elegans* [18].

b. Irradiation chronique

Les données présentées ci-après ne sont issues que d'une seule étude visant à caractériser les réponses d'une irradiation chronique sur trois générations de nématodes issus de parents exposés (étude multigénérationnelle (parents et descendants irradiés) et transgénérationnelle (parents irradiés uniquement)) à l'échelle individuelle et subcellulaire [143].

i. Traits d'histoire de vie

Concernant la génération parentale de *C. elegans*, exposée à une irradiation gamma, de précédents travaux de thèse ont révélé que pour une exposition chronique de 65h (du stade œuf jusqu'au stade L4-JA), à des débits de doses compris entre 37 et 337mGy.h⁻¹, aucun impact sur les paramètres de croissance du nématode n'était observé [143]. Cependant, concernant les effets de l'irradiation chronique sur la reproduction du nématode, une diminution de la capacité de ponte (capacité à produire des descendants) a été observée à partir de 51mGy.h⁻¹, et ce de manière dose dépendante. Buisset et collaborateurs, ont observé une diminution significative de la capacité de ponte des individus exposés, une augmentation de la radiosensibilité au fil des générations, sur 3 générations, en particulier sur la reproduction du nématode [143]. Concernant les générations placées en environnement contrôlé après irradiation parentale, une diminution du nombre de larve par individu a été observée à partir de 7,1mGy.h⁻¹.

Ces travaux ont également montré que quel que soit le débit de dose et la génération considérée, le succès d'éclosion n'était pas impacté par l'irradiation chronique entre 7,1mGy.h⁻¹ et 337mGy.h⁻¹.

ii. Dommages subcellulaires

Les différents tests menés en parallèle au niveau moléculaire et cellulaire dans cette même étude ont mis en évidence que la diminution de la capacité de ponte était associée à une diminution du stock de spermatozoïdes, à une augmentation de l'apoptose et dans une moindre mesure à un arrêt du cycle cellulaire chez les générations exposées. Concernant les générations placées en environnement contrôlé après exposition parentale, seule la diminution du nombre de spermatozoïdes est associée à l'effet sur la reproduction. Cette étude suggère que les effets observés sur les générations non exposées pourraient être

expliqués soit par l'exposition directe des embryons dans la mère soit par une transmission d'effets maternels aux générations suivantes [143].

c. Bilan

En conclusion de ce chapitre sur l'impact des rayonnements ionisants sur *C.elegans*, la reproduction est le paramètre individuel le plus radiosensible (en particulier la capacité de ponte), que ce soit après irradiation aiguë ou chronique par rapport à la croissance et à la survie. De plus, Bailly et collaborateurs, Takanami et collaborateurs ainsi que Buisset et collaborateurs ont démontré un lien entre une augmentation de l'apoptose et une baisse du nombre de descendants par individus après irradiation aiguë et chronique, respectivement [143], [179], [182]. Cependant, à ce jour toutes les explications mécanistes concernant la baisse du nombre de descendants par individus après irradiation et chronique et la baisse du succès d'éclosion de *C. elegans* après irradiation aiguë ne sont pas totalement connues.

Partie B : Hypothèses, objectifs et choix stratégiques

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ISATIS (IoniSing rAdiation and biological mechaniSms) qui a pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires radio-induits après exposition aiguë et chronique aux rayonnements ionisants en adoptant une démarche intégrée (à plusieurs niveaux d'organisation biologique) et comparée, multi-phylum. Cette étude s'appuie sur l'utilisation d'espèces plus ou moins radiosensibles, représentatives de l'environnement. Le travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des mécanismes moléculaires de radio-toxicité sur le modèle biologique *C. elegans*. Comme présenté dans la partie précédente, *C. elegans* est un organisme eucaryote naturellement présent dans le sol. Son cycle de vie court (3 jours), son taux de reproduction élevé facilitent sa culture en laboratoire et en font un organisme modèle pour les études en exposition chronique. De plus, son génome est entièrement séquencé et de nombreux outils sont disponibles pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant lors d'une exposition à une pollution. Ce chapitre décrit l'objectif général de la thèse au vu des différents éléments de contexte présentés dans la partie A de ce manuscrit, ainsi que la stratégie scientifique mise en place pour y répondre.

1. Objectif

L'objectif de ce doctorat est d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de radiotoxicité en condition d'exposition aiguë vs chronique selon une approche centrée sur la contribution du protéome.

Afin de répondre à cet objectif une stratégie en deux étapes a été adoptée pour chacune des conditions d'exposition étudiées (aigu vs chronique), à savoir : i) la caractérisation des dommages protéiques radio-induits et leur régulation et ii) l'analyse de la réponse globale du protéome. Les effets observés sur le protéome seront comparés à ceux observés sur les grandes fonctions biologiques et à d'autres marqueurs moléculaires (bien décrits dans la littérature). A terme cette étude doit nous permettre d'une part de mieux comprendre les différences de toxicité entre l'irradiation aiguë et chronique et d'autre part d'identifier des marqueurs sensibles et précoces de l'irradiation.

2. Les marqueurs biologiques retenus

La reproduction est le terme qui définit le succès reproducteur d'une population, c'est-à-dire sa fécondité (capacité à se reproduire) et sa fertilité (capacité à produire une descendance viable et abondante). Au vu de la synthèse bibliographique, la reproduction est le paramètre individuel le plus radiosensible chez *C. elegans* par rapport à la croissance et à la longévité.

De plus, ce paramètre individuel est pertinent pour l'évaluation environnementale des risques radiologiques puisqu'il influence directement la dynamique des populations. Par conséquent, la reproduction sera choisie comme critère d'effet individuel principal dans cette thèse.

En ce qui concerne les marqueurs de dommages protéiques, une approche avec *a priori* sera en premier lieu mise en place. En effet, la carbonylation est une modification post-traductionnelle irréversible des protéines pouvant entraîner une perte de leur fonctionnalité. Radman et collaborateurs ont montré une corrélation entre le taux de protéines carbonylées et la mortalité chez *E. coli* après irradiation aiguë à des doses supérieures à 200Gy, ainsi qu'une baisse du succès d'éclosion chez *C. elegans* [17], [18]. De plus, après irradiation aiguë forte dose (>200Gy), et à dommages à l'ADN équivalents, il a été démontré qu'une radiosensibilité différente entre deux espèces (*Deinococcus radiodurans* et *Escherichia coli*) pouvait être expliquée par une différence au niveau du système de protection du protéome, particulièrement contre l'oxydation (*i.e.* carbonylation) [17]. La carbonylation des protéines a été étudiée à très fortes doses d'irradiation gamma aiguë sur plusieurs espèces, mais aucune étude publiée ne s'est intéressée à la pertinence de ce dommage pour des doses <200Gy (en irradiation aiguë) et pour des conditions d'irradiation chronique. Par conséquent, une partie de cette thèse sera consacrée au développement de ce marqueur après irradiation aiguë et chronique.

De plus, le niveau de protéines carbonylées est la résultante entre la production (proportionnelle aux ERO) et l'élimination (en lien avec l'activité protéolytique cellulaire) des protéines carbonylées. Par conséquent, afin de caractériser les mécanismes d'élimination des protéines carbonylées, notamment l'activité de type chymotrypsine contenue dans le protéasome 20S, les processus cellulaires susceptibles de les éliminer seront analysés [33]. Cette activité protéolytique est déjà connue pour être la cible des rayonnements ionisants après irradiation aiguë à partir de 2Gy [89]. Cependant aucune étude publiée à notre connaissance ne s'est intéressée à la sensibilité du protéasome après irradiation chronique ; ce mécanisme de défense cellulaire sera analysé durant cette thèse, par l'étude des 3 formes principales le composant, *i.e les formes 30S, 26S et 20S*.

Enfin, les radiations ionisantes, peuvent entre-autre, avoir pour conséquence une modification de l'expression des protéines. La protéomique est la discipline qui permet d'étudier l'ensemble des protéines d'un organisme, d'un tissu, d'un organe ou d'un fluide biologique à un temps donné et sous des conditions données. Cet ensemble de protéines est nommé « protéome ». L'approche protéomique permet de mettre en évidence les modifications de l'expression des protéines pour un individu irradié par rapport à un individu témoin et ainsi établir un profil de modification suite à une exposition. Ainsi, afin d'identifier des marqueurs sensibles des effets moléculaires de l'irradiation au regard des effets individuels sur la reproduction de *C. elegans*, et expliquer les mécanismes moléculaires de radio-toxicité, une approche de protéomique globale, exhaustive et sans *a priori* sera mise

en place. Le but de ces expériences sera de déterminer si certaines protéines impliquées dans la reproduction, l'apoptose et les dommages à l'ADN sont modulées après irradiation aiguë vs chronique.

3. Choix dans l'approche expérimentale

Afin de répondre à l'objectif principal, une stratégie en deux étapes sera appliquée. Premièrement, l'étude des effets d'une irradiation gamma aiguë et chronique sur de larges gammes de doses sera opérée au niveau individuel. Deuxièmement, en complément de l'analyse de ces effets individuels, des études au niveau subcellulaire seront réalisées, et notamment au niveau protéique.

Parmi les marqueurs protéiques, la carbonylation des protéines sera étudiée après irradiation aiguë et chronique en dessous des doses d'irradiation aiguë testées dans la littérature. Le but de ces expériences sera d'établir des courbes dose-réponse du marqueur carbonylation des protéines afin de tester sa sensibilité au regard d'autres marqueurs moléculaires (tels que l'apoptose et les dommages à l'ADN). Cependant, en raison du peu de données présentes dans la littérature concernant l'analyse de ce marqueur, des expériences préliminaires seront nécessaires afin de mettre en place des conditions précises d'analyse. Une fois ces conditions calibrées, des expositions aiguë et chronique sur de larges gammes de doses, incluant des doses pour lesquelles aucun effet sur la reproduction n'est détecté, seront effectuées et l'ensemble des mesures (protéines carbonylées, activité du protéasome, expression des protéines) sera réalisé.

Enfin un travail de synthèse permettra *in fine* de comparer la toxicité après exposition aiguë vs chronique aux rayonnements ionisants et mieux comprendre le lien entre les processus biologiques et les critères individuels tel que la reproduction, susceptible d'avoir des impacts sur la dynamique des populations.

Partie C : Matériel et méthodes

I. Maintenance et conditions de culture de *Caenorhabditis elegans*

La souche de *C. elegans* testée dans les différentes études menées dans le cadre de ce projet de thèse est la souche de type sauvage N2, souche de référence en laboratoire et communément utilisée lors d'études écotoxicologiques [186], [187]. Cette souche est fournie par le *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), basé à l'Université du Minnesota (Missouri, Etats-Unis).

1. Conditions de culture

La population destinée à l'élevage ainsi que les individus utilisés lors des expérimentations sont maintenus en incubateur à 19°C, 80% d'humidité relative (RH), à l'obscurité, sur des boîtes de pétri 9 cm contenant du milieu de culture pour nématode, le Nematode Growth Medium (NGM) [157]. La composition du NGM est donnée en Tableau 3. La présence de cholestérol dans le milieu NGM s'explique par l'incapacité du nématode à produire cette molécule pourtant indispensable à son développement [188].

Tableau 3 : Composition des milieux NGM et M9, utilisés pour la culture, la préparation et l'exposition de *C. elegans*.

Composé	Concentration finale	
	NGM	M9
Pastagar (% (w/v))	2	-
NaCl (mmol.L ⁻¹)	51,3	51,3
CaCl ₂ (mmol.L ⁻¹)	1	-
MgSO ₄ (mmol.L ⁻¹)	1	1
KPO ₄ (mmol.L ⁻¹)	25	25
Cholestérol (5mg/ml de cholestérol dans de l'éthanol absolu)	5	-

D'autres milieux que les milieux solides gélosés sont couramment utilisés pour cultiver *C. elegans*, tels que les milieux liquides (recommandés pour l'étude d'un grand nombre d'individus). Cependant, les milieux liquides ne permettent pas une observation rapide des traits d'histoire de vie en raison de l'opacité du milieu. De plus, ce type de culture est susceptible de générer une anoxie chez les individus, ce qui potentiellement pourrait faire varier le niveau de protéines carbonylées. Les nématodes ont donc été cultivés en milieu NGM solide qui permet une observation rapide et un suivi quotidien de certains critères d'effet, tels que la reproduction, et ne provoque pas d'anoxie chez les individus.

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations par des champignons ou d'autres bactéries indésirables, le dépôt du NGM dans les boîtes de Pétri est réalisé en conditions stériles (hotte à flux laminaire, utilisation d'un bec bunsen, de matériel et de solutions de cultures stérilisées). Lorsque le NGM est solidifié, un tapis bactérien, source nutritive de *C. elegans* est déposé à sa surface. Les bactéries utilisées dans le cadre de ces travaux de recherche sont des *Escherichia coli* de la souche OP50 (non pathogène). Cette souche a la particularité d'être auxotrophe à l'uracile (incapable de synthétiser l'uracile), ce qui limite le développement du tapis bactérien sur le NGM et de ce fait, facilite les observations [157]. La veille de l'ensemencement, les bactéries sont cultivées durant 20h dans du milieu *Lysogeny Broth* (LB) à 37°C et sous agitation constante (130 rpm). Le lendemain, l'incubation est stoppée lorsqu'une densité optique de 0,3 est atteinte à 595nm. A l'issue de l'incubation, les bactéries sont écartées du milieu LB puis concentrées 10 fois (centrifugation à 3500 g durant 10 minutes, retrait du surnageant, puis re-suspension dans le volume adéquat) à l'aide d'une solution de NaCl à 5g.L⁻¹, afin d'obtenir la solution bactérienne finale prête à être ensemencée sur le NGM [189].

2. Synchronisation des individus

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour synchroniser des nématodes [190]. Parmi elles, la méthode de synchronisation sur 1h, et la méthode dite de « bleaching » sont détaillées ci-après.

La méthode de synchronisation sur 1h consiste à déposer des nématodes adultes manuellement sur une boîte de pétri, puis de les retirer au bout d'une heure une fois qu'ils ont pondu. Cette méthode permet une synchronisation fine mais demande énormément de temps pour générer de grandes quantités d'individus.

Une large quantité d'individus synchronisés, sur 15 h, peut être obtenue par « bleaching ». Cette méthode de synchronisation consiste à traiter une population contenant des adultes avec une solution alcaline d'hypochlorite de sodium (NaClO, Tableau 4), solution de « bleach ». Celle-ci dissout la cuticule ainsi que les membranes des nématodes adultes gravides sans affecter l'intégrité des œufs.

Tableau 4 : Composition de la solution d'hypochlorite de sodium pour la synchronisation de nématodes

Composé	Concentration finale
NaClO (%)	10
NaOH (mmol.L-1)	1

Les nématodes issus d'une population sont d'abord collectés dans du milieu M9 (Tableau 3). Ensuite, trois cycles de centrifugation (3min, 400 g) et de re-suspension dans le milieu M9 permettent de séparer les nématodes des bactéries résiduelles. Une fois les nématodes débarrassés des bactéries, la solution de « bleach » est ajoutée au culot et l'étape de

digestion débute. Toutes les minutes, le tube contenant les nématodes et la solution est agité et l'état d'avancement de la réaction est évalué au stéréo-microscope. A la fin de la digestion (~5 min), une étape de centrifugation rapide est réalisée (1min, 1000g), la solution de « bleach » est retirée, et le culot est rincé par trois étapes de centrifugation (2min, 800g) et de re-suspension dans du milieu M9. A l'issue de ces étapes les œufs sont prêts à être déposés sur les boîtes de Pétri.

Cette synchronisation classique *via* bleaching des nématodes permet de récupérer les œufs *in utero* mais également ceux déjà pondus. Les œufs ainsi synchronisés peuvent avoir une différence de 15h (3h *in utero* +12h post ponte). Cette différence inter-individuelle pourrait conduire à une population « multi stade », métaboliquement très différente. Une méthode intermédiaire a donc été développée, validée et employée en alternative, afin de ne récupérer uniquement les œufs *in utero*, garantissant une synchronisation plus fine, sur 3h. Elle est présentée ci-dessous.

Pour obtenir des œufs synchronisés sur 3h, une pré-synchronisation par « bleaching » est réalisée afin d'obtenir des œufs synchronisés sur 15h. Après incubation des œufs à 19°C pendant 4jours, les individus gravides ainsi que les œufs déjà pondus sont collectés et déposés sur un gradient de sucrose (7% et 3%). Après 10minutes de sédimentation, les individus gravides, plus denses que les œufs sédimentent dans la phase à 7%, alors que les œufs et les bactéries sédimentent dans celle à 3%. La phase à 3% est alors retirée, et trois étapes de centrifugation (2min, 400g) sont réalisées afin de rincer les nématodes gravides de la solution de sucrose résiduelle. Une seconde synchronisation par « bleaching » classique est alors réalisée sur les individus gravides afin de ne récupérer uniquement les œufs présents *in utero*.

Le traitement par le sucrose peut induire un choc osmotique et donc possiblement un stress sur les individus gravides ainsi que sur les œufs. Par conséquent, une étape de validation de la méthode de synchronisation sur 3h a été réalisée par mesure de la mortalité et du bagging chez les individus adultes (en conditions non favorables, l'individu gravide retient ses œufs jusqu'à ce que ceux-ci éclosent *in utero*) ainsi que le succès d'éclosion des œufs synchronisés. Les résultats de cette validation ont révélé 100% de survie, 0% de bagging et 90% de succès d'éclosion par rapport à des individus synchronisés sur 1h par repiquage.

Cette méthode de synchronisation sur 3h a donc été validée et appliquée pour toutes les expériences réalisées durant cette thèse.

NB : Afin de mesurer le niveau basal de protéines carbonylées chez *C. elegans*, 1000 œufs synchronisés sur 3h par la méthode détaillée ci-dessus, ont été déposés par boîte de pétri. Les œufs ont ainsi été placés dans un incubateur contrôle (19°C, 80% d'HR). Les nématodes ont ensuite été collectés et congelés dans de l'azote liquide à différents temps post-synchronisation (43h, 45h, 48h, 52h, 61h et 67h) correspondant aux différents stades de vie (Début de L3, Milieu de L3, Fin de L3, Début de L4, Fin de L4, L4-JA).

II. Irradiations

Comme décrit dans la partie A de ce manuscrit, une exposition externe est caractérisée par l'action des rayonnements ionisants émis par une source située à l'extérieur de l'organisme. Lorsque cette exposition est sans contact avec l'organisme, on parle d'irradiation. La dose cumulée est exprimée en Gray (Gy) et correspond au produit entre le débit de dose et le temps d'exposition. Le débit de dose (Gy par unité de temps) est calculé selon l'élément radioactif, l'activité de la source radioactive et la distance des individus par rapport à celle-ci. La détermination et la vérification de ces débits de dose avant et pendant une exposition sont réalisées à l'aide de la dosimétrie. Lors de ces travaux de thèse, les nématodes synchronisés ont été exposés de manière aiguë et chronique à une source de césium 137, 4 doses cumulées étant communes aux deux modes d'irradiation.

1. Définition des designs expérimentaux et dosimétrie

Dans le but d'obtenir des courbes dose-réponse sur la reproduction et sur le niveau de protéines carbonylées après irradiation aiguë et chronique, une large gamme de doses cumulées a été testée. Les irradiations aiguës ont été réalisées sur des temps variables mais courts avec deux débits de doses, afin justement de rester dans des temps d'irradiation équivalents (et que les nématodes restent au même stade de vie). Les irradiations chroniques ont été réalisées sur une période de temps fixe et continue (65h correspondant au cycle de vie complet de *C. elegans*) mais à des débits de doses différents.

Des dosimètres ont été déposés lors des irradiations sur chacune des boîtes de pétri de manière à mesurer la dose délivrée aux nématodes.

Le débit de dose d'une source radioactive décroît avec le carré de la distance. Par exemple, pour 1 Bq de césium 137 (élément radioactif utilisé lors de cette thèse), le débit de dose à un mètre de la source est de $9,2 \cdot 10^{-8} \mu\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Le débit de dose à un mètre, spécifique de l'activité de la source et du radioélément, est fourni par la formule suivante :

$$D_0 \times (d_0)^2 = A_0 \times T$$

Avec :

D_0 = débit de dose proportionnel au carré de la distance $(d_0)^2$

A_0 = activité de la source en Bq;

T: énergie spécifique de la source radioactive en keV

Ce débit de dose va par la suite permettre de calculer à quelle distance positionner les unités expérimentales en fonction des débits de dose souhaités. La formule suivante est alors utilisée :

$$D_2 = \frac{D_1}{(d_2)^2}$$

Avec :

$^{\circ}D2$ = débit de dose souhaité dépendant du débit de dose $^{\circ}D1$ à 1mètre de la source et de sa distance à la source $d2$.

Ces calculs ne prennent cependant pas en compte le transport et les interactions des particules dans et avec la matière. Aussi, pour apporter plus de précisions sur les débits de dose en considérant l'atténuation des rayonnements ionisants par les unités expérimentales (boîtes de Pétri en plastique) et le milieu (NGM), une simulation numérique utilisant le code MCNP (Monte-Carlo d'interaction rayonnement-matière) a été utilisée. Cette simulation, a été réalisée par Nicolas Dubourg (IRSN/LECO). Le schéma du dispositif expérimental ainsi que les informations concernant la source utilisée (activité, débit de dose à 30 cm) sont tout d'abord implémentés dans le logiciel MCNP. Trois phases sont ensuite définies dans les unités expérimentales (boîtes de Petri) : l'air, le NGM, et le centre d'intérêt dans l'air qui correspond à la position du nématode à la surface du NGM. C'est sur ce centre d'intérêt que les débits de dose ont été calculés par simulation numérique pour chaque unité expérimentale, en prenant en compte l'atténuation des rayonnements émis par le plastique de la boîte de Pétri, la composition et l'épaisseur du NGM (Figure 17).

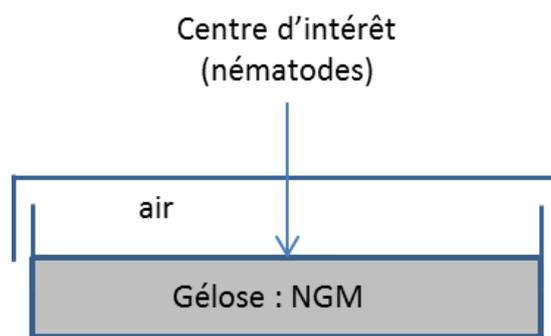


Figure 17 : Schéma des trois phases définies dans une unité expérimentale (boite de pétri) : L'air, le NGM et le centre d'intérêt correspondant à la position des nématodes.

Les débits de dose théoriques ont été vérifiés à l'aide de la mesure, en utilisant des dosimètres Radio Photo Luminescent (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation, Japan). Ainsi, lors de la validation expérimentale des débits de dose, un dosimètre est placé sur la gélose au centre d'intérêt et un dosimètre est placé en position excentré (à l'arrière de la boîte de pétri par exemple) (Figure 18A). Lors d'une expérience d'irradiation, aucun dosimètre n'est placé sur la gélose, en revanche, un dosimètre est placé sur la position excentrée, et c'est le débit de dose mesuré à cette position qui est mesuré et comparé au débit de dose modélisé, afin de déterminer si le débit de dose au centre d'intérêt (c'est-à-dire sur la gélose) est bien celui envisagé par la modélisation (Figure 18B). Ces dosimètres sont composés d'un verre phosphaté composé d'ions argent (Ag^+), qui, lorsqu'ils sont exposés à un rayonnement ionisant, vont se transformer en Ag^0 et Ag^{++} . Ce sont ces ions qui vont former les centres de luminescence du verre. Lors de la lecture, une excitation du verre par rayonnement UV est réalisée. Les centres de luminescence vont alors émettre une fluorescence orangée ; phénomène appelé « radiophotoluminescence » ; qui est

proportionnelle à la dose de radioactivité. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'un lecteur DOSE-ACE FGDS-1000 (Chiyoda technol corporation).

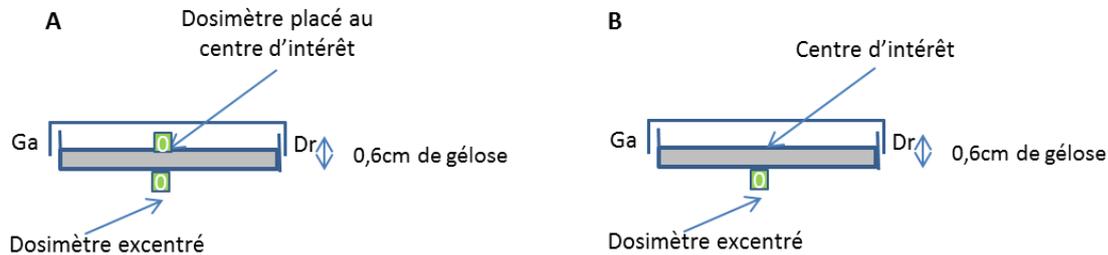


Figure 18 : A/ Design de validation des débits de doses théoriques, où deux dosimètres sont placés en position excentrée et au centre d'intérêt. B/ Design d'expérience d'irradiation, où un seul dosimètre est placé en position excentrée.

2. Irradiation aiguë

a. Design expérimental

10 doses cumulées ont été testées : 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 3,3 ; 6,5 ; 14,4, 50, 75 ; 80 et 200Gy. Afin d'obtenir les différentes doses cumulées, les nématodes ont été exposés à deux différents débits de dose : $1\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ et $15\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, et les temps d'exposition étaient compris entre 30secondes et 15minutes. Le débit de dose de $1\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisé pour atteindre les doses comprises entre 0,5Gy et 14,4Gy, tandis que le débit de dose de $15\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ était nécessaire pour atteindre les doses comprises entre 50 et 200Gy. Ces doses ont été atteintes à l'aide d'un dispositif d'irradiation situé à l'institut Curie à Orsay (GSR-D1, source de césium 137 d'une activité de 200 TBq).

Comme présenté en Figure 19, l'irradiateur se présente sous la forme d'un caisson fermé, ventilé et climatisé à une température de 19°C . A l'intérieur du caisson d'irradiation sont positionnées deux sources de césium 137 (schématisées par les carrés gris dans la Figure 19). Les nématodes sont donc irradiés par le bas. Comme déjà évoqué dans ce chapitre, le débit de dose d'une source radioactive décroît avec le carré de la distance. Pour cette raison, 3 plateaux sont positionnés à l'intérieur du caisson d'irradiation correspondant à différents débits de dose. Ainsi, les plateaux 0 et 2 ont été utilisés lors de nos expériences afin d'atteindre 15 et $1\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivement. Une contrainte majeure a été rencontrée lors des irradiations aiguës menées ici : la contrainte du nombre d'individus nécessaires aux différentes analyses. En effet, afin de réaliser toutes les analyses pour répondre aux problématiques de ce projet de thèse, un grand nombre d'individus était nécessaire. De plus, en raison de la nature conique du faisceau d'irradiation, à chaque irradiation sur le niveau le plus bas ($15\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$), seules deux boites de pétri de diamètre 6cm (pouvant contenir moins de nématodes que des boites de pétri 9cm) pouvaient être utilisées afin d'obtenir une dose homogène sur la surface du milieu NGM (Figure 19). Ainsi, afin de générer le nombre nécessaire d'individus irradiés, les expositions aiguës à $15\text{Gy}\cdot\text{mn}^{-1}$ ont été réalisées trois fois.

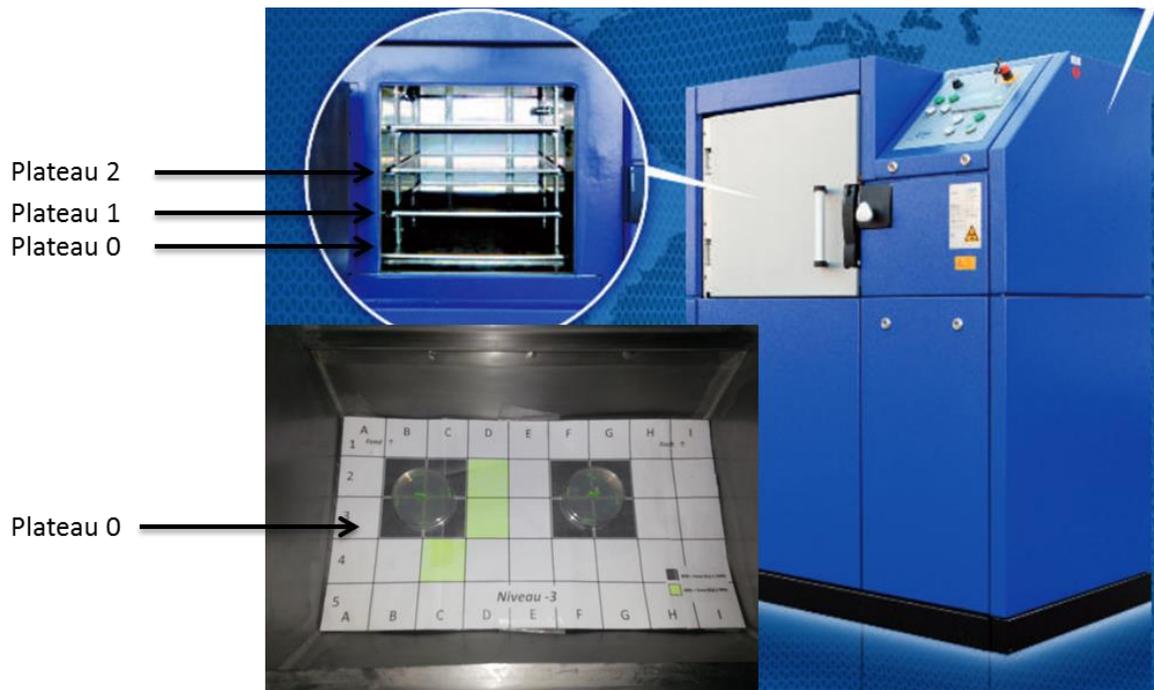


Figure 19 : Dispositif d'irradiation situé à l'institut Curie à Orsay (GSR-D1). Les zones grises sur le plateau 0 correspondent aux zones isodoses, deux boîtes de pétri 6cm étaient placées sur ces zones isodoses, et un dosimètre était placé en position excentré sur chacune des boîtes de pétri, ainsi que sur la feuille de papier dans la zone grise.

3000 œufs synchronisés ont été déposés sur des boîtes de pétri 6cm et placés dans un incubateur contrôle (19°C, 80% d'HR) jusqu'à atteindre le stade L4-JA. Les boîtes de pétri contenant les nématodes ont été enveloppées dans du parafilm, placés dans une glacière réfrigérée pour maintenir une température proche de 19°C, et transportés en train jusqu'à la plateforme d'irradiation à Orsay. La température durant le transport a été contrôlée par des datas logger qui avaient été placés dans la glacière.

Quelles que soient les doses, 6 unités expérimentales (correspondant aux boîtes de pétri contenant chacune 3000 nématodes au stade L4-JA) ont été irradiées. Les boîtes de pétri contenant les individus contrôles ont été descendues dans la pièce d'irradiateur, et ont été placées à l'obscurité et à 19°C tout le temps des irradiations.

A la fin des irradiations, les boîtes de pétri contenant les nématodes ont été rincées avec du milieu M9 et les nématodes ont été collectés dans des tubes en verre (2 boîtes par tube, à savoir 6000 individus ; 3 tubes par condition). Enfin, le culot de nématodes a été rincé par trois étapes de centrifugation (2min, 800g) et de re-suspension dans du milieu M9 puis M9/Triton afin d'éliminer les bactéries résiduelles. Les nématodes ont ensuite été aliquotés dans des tubes (eppendorf), mis à sec, puis congelés dans de l'azote liquide, 3h après irradiation, et maintenus à -80°C jusqu'à analyse. Afin de suivre les paramètres de reproduction, une partie des nématodes a été transférée sur des boîtes de pétri vierges. La répartition des nématodes par réplicats pour les différentes analyses est donnée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Répartition des nématodes en fonction des différents paramètres à tester.

Analyses	Nombre de nématodes utilisés / réplicat
Reproduction	20
Mesure du niveau de protéines carbonylées	1100
Identification des protéines carbonylées	3000
Mesure de l'activité du protéasome	2000
Expression des protéines	3000
Mesure de l'expression des gènes	500
Mesure des dommages à l'ADN	100

b. Dosimétrie

Les doses cumulées pour chaque condition ont été vérifiées à l'aide de dosimètres RPL placés en position excentrée sur chacune des boîtes de pétri positionnées dans le caisson d'irradiation (Figure 19).

Comme le montre le Tableau 6 les doses mesurées puis calculées aux nématodes après irradiation aiguë par les dosimètres RPL placés sur chacun des six réplicats biologiques sont identiques aux doses théoriques. De plus, il existe entre 1 et 5,8% d'erreur sur les doses mesurées entre les différents réplicats. Les doses qui seront utilisées par la suite dans la partie résultats sont les doses calculées aux nématodes après validation des doses théoriques mesurées par les dosimètres RPL.

Tableau 6: Doses mesurées par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne entre les réplicats, écart-type et pourcentage d'erreur entre les différents réplicats).

Dose théorique nématode (Gy)	Dose mesurée au dosimètre et calculée au nématode (Gy)	Ecartype standard inter boîtes (n=6)	% d'erreur entre les réplicats
0,5	0,5	0,01	2,3
1	1,0	0,03	3,3
3,3	3,3	0,03	1,0
6,5	6,5	0,38	5,8
14,4	14,4	0,19	1,3
50	50	0,80	1,5
80	80	1,4	1,5
200	200	5,6	2,6

3. Irradiation chronique

a. Design expérimental

6 doses cumulées ont été testées : 0,5 ; 1 ; 3 ; 3,3 ; 4,5 et 6,5Gy. Afin d'obtenir les différentes doses cumulées, les nématodes ont été exposés à 6 débits de dose différents : 7 ; 14 ; 45 ; 51 ; 75 et 100mGy.h⁻¹, durant 65h. Ces doses ont été obtenues à l'aide de 2 dispositifs d'irradiation situés à Cadarache (IRSN). Ainsi la plateforme MIRE (Mini Irradiator for Radio-Ecology) a été utilisée afin d'atteindre les doses cumulées comprises entre 0,5 et 3,3Gy, tandis que la plateforme MICADO-Lab (Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations Dose-effet en Laboratoire) a été utilisée pour atteindre les doses cumulées comprises entre 3 et 6,5Gy. Ces deux dispositifs contiennent une source de césium 137 possédant des activités différentes de 1,6GBq et de 370GBq, respectivement pour MIRE et MICADO. En effet, le débit de dose maximum de la plateforme MIRE étant de 51mGy.h⁻¹, la plateforme MICADO-Lab a été utilisée afin d'atteindre les plus forts débits de dose (jusqu'à 100mGy.h⁻¹). Sur MIRE chaque irradiateur utilisé est constitué d'un incubateur thermostaté à 19°C, entouré par des protections en plomb (briques et tabliers) (Figure 20A). L'incubateur dispose en son centre d'un plateau métallique permettant d'accueillir les échantillons à irradier. La source radioactive de césium 137 (fournie par Actémium NDT PES, Brétigny sur orges, France), est placée au milieu de ce plateau, dans un château de plomb, amovible par le biais d'un levier. Elle se présente sous forme solide (paillettes de césium) et est encapsulée dans de l'inoc (source scellée). Le château de plomb permet d'atténuer les rayonnements gamma et est baissé pour permettre les interventions. Lors d'une irradiation, il est relevé afin de découvrir la source radioactive (Figure 20B).

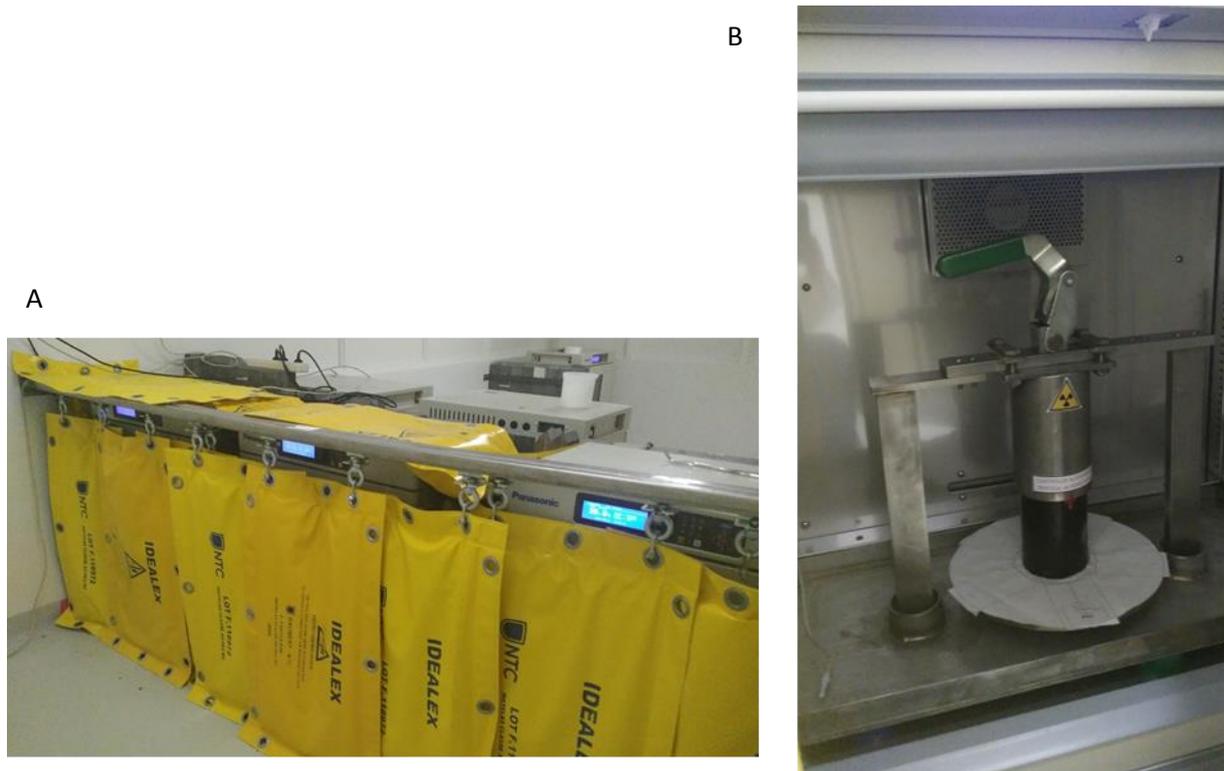


Figure 20 : Dispositif d'irradiation de l'IRSN. A/ Vue générale de l'irradiateur MIRE (incubateur thermo-régulé) entouré de plomb. B/ présentation de l'incubateur ouvert avec le plateau permettant d'accueillir les échantillons et la source de Césium-137 au centre du plateau protégée par un château de plomb.

Les unités expérimentales sont disposées autour de la source sur le plateau métallique, et les dosimètres RPL sont disposés sur le support en carton servant à maintenir les unités expérimentales. Deux irradiateurs identiques ont été utilisés pour les besoins de l'expérimentation.

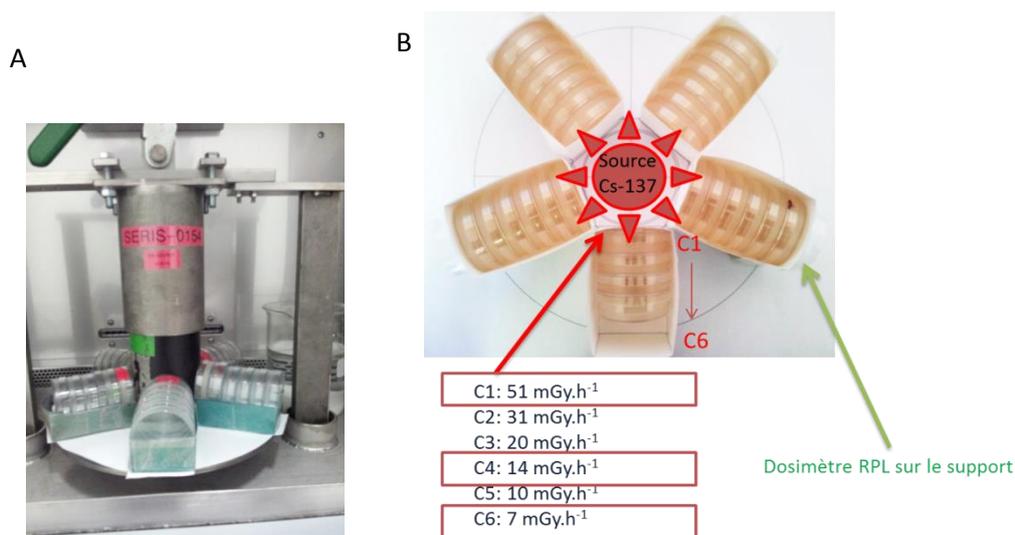


Figure 21 : Présentation du dispositif d'irradiation MIRE. A/ Présentation du plateau, de la source confinée dans un château de plomb et des unités expérimentales disposées autour de la source. B/ Schéma de positionnement des unités expérimentales autour de la source, et des différents débits de doses associés aux différentes positions.

Quelles que soient les doses, 10 unités expérimentales (correspondant aux boîtes de pétri contenant chacune 3000 nématodes du stade œuf jusqu'au stade L4-JA) ont été irradiées dans deux irradiateurs contenant chacun 5 unités expérimentales. Les boîtes de pétri contenant les individus contrôles ont été placées durant tout le temps des irradiations (65h) dans un incubateur contrôle protégé par des briques de plomb, dans la même pièce.

A la fin des irradiations, les boîtes de pétri contenant les nématodes ont été rincées avec du milieu M9 et les nématodes ont été collectés dans des tubes en verre (3 boîtes par tubes, 3 tubes par condition). Durant cette étape, les nématodes issus de trois boîtes de pétri ont été groupés de manière à obtenir 9000 individus par réplicat biologique, nécessaires pour les analyses ultérieures. Enfin, le culot de nématodes a été rincé par trois étapes de centrifugation (2min, 800g) et de re-suspension dans du milieu M9 afin d'éliminer les bactéries résiduelles. Les nématodes ont ensuite été aliquotés dans des eppendorfs, mis à sec puis congelés dans de l'azote liquide. Afin de suivre les paramètres de reproduction, une partie des nématodes a été transférée sur des boîtes de pétri vierges. La répartition des nématodes par réplicats pour les différentes analyses est donnée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Répartition des nématodes en fonction des différents paramètres à tester.

Analyses	Nombre de nématodes utilisés / réplicat
Reproduction	20
Longévité	150
Mesure du niveau de protéines carbonylées	1100
Identification des protéines carbonylées	3000
Mesure de l'activité du protéasome	2000
Expression des protéines	3000
Mesure de l'expression des gènes	500
Mesure des dommages à l'ADN	100

L'irradiateur MICADO-Lab utilisé est constitué d'un incubateur thermo-régulé à 19°C, 80% humidité obtenue en y plaçant un béccher d'eau saturée en NaCl, disposant de plusieurs plateaux permettant d'accueillir les échantillons à irradier (Figure 22). Quatre sources radioactives de césium 137 (fournie par actémium NDT PES, Brétigny sur orges, France), sont placées en haut de l'incubateur dans les caissons blindés oranges sur la Figure 22A (deux autres sont à l'arrière). Lors d'une irradiation, les sources de Césium-137 sortent de leur caisson de manière à se positionner en position latérale au-dessus de l'incubateur.

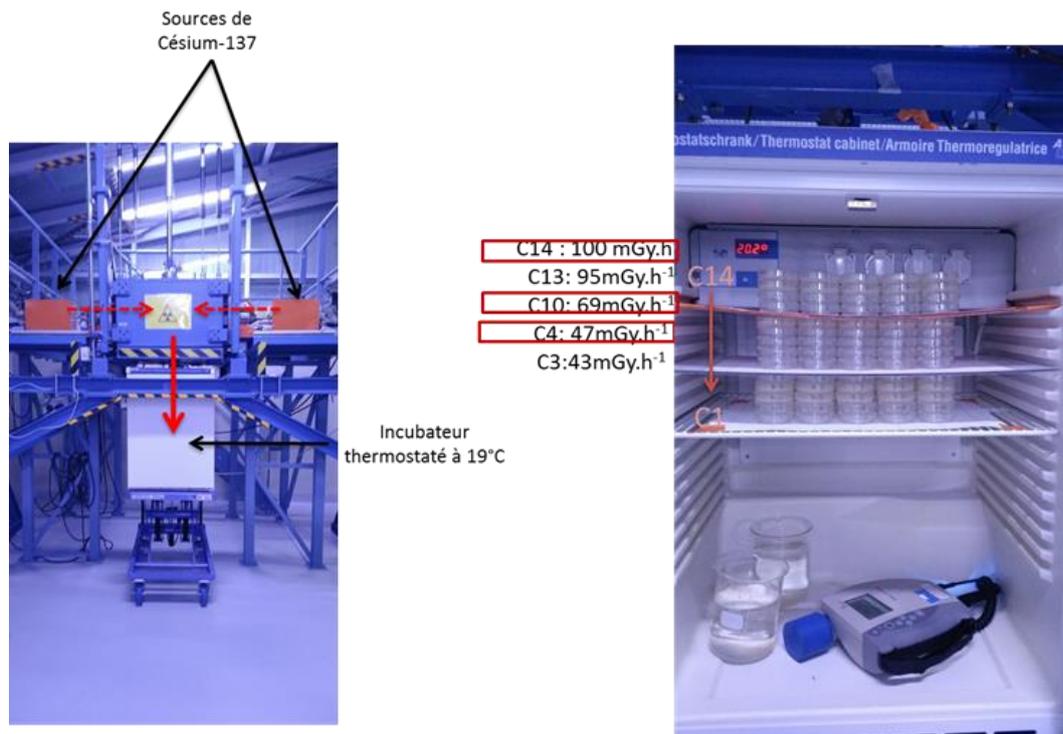


Figure 22 : Dispositif d'irradiation de l'IRSN. A/ Vue générale de l'irradiateur MICADO-Lab avec en haut de l'incubateur les deux sources radioactives. B/ présentation de l'incubateur ouvert avec les différents plateaux permettant d'accueillir les échantillons et positionnement des unités expérimentales au-dessous des sources, et les différents débits de doses associés aux différentes positions. Deux béccher d'eau saturée en NaCl étaient placés dans l'incubateur de manière à atteindre 80% d'humidité. Des datas logger étaient également placés dans l'incubateur de manière à mesurer la température durant les irradiations.

Lors des irradiations menées dans la plateforme MICADO-Lab les dosimètres RPL étaient positionnés pour chacune des unités expérimentales en position C13 et en position C3 afin de mesurer les différents débits de dose et vérifier les valeurs données par la modélisation sur le calcul de la dose reçue par les nématodes (Figure 22).

Quelles que soient les doses, 10 unités expérimentales (correspondant aux boîtes de pétri contenant chacune 3000 nématodes du stade œuf jusqu'au stade L4-JA) ont été irradiées dans l'incubateur. L'activité des sources de Césium étant importante, les boîtes de pétri contenant les individus contrôles ont dû être placées dans une pièce à part, dans un incubateur contrôle à 19°C et 80% d'humidité durant tout le temps des irradiations.

A la fin des irradiations, les échantillons ont été collectés de manière identique avec les expériences menées dans MIRE.

b. Dosimétrie

Comme le montre le Tableau 8 les doses mesurées puis calculées pour les nématodes après irradiation chronique par les dosimètres RPL placés en position excentrée sur chacun des dix réplicats biologiques sont identiques aux doses nominales. De plus, il existe entre 1 et 5,8% d'erreur sur les doses mesurées entre les différents réplicats. Les doses qui seront utilisées

par la suite dans la partie résultats sont les doses calculées aux nématodes après validation des doses théoriques mesurées par les dosimètres RPL.

Tableau 8: Doses mesurées par les dosimètres radiophotoluminescents (RPL) (moyenne entre les répliqués, écart-type et pourcentage d'erreur entre les différents répliqués).

Dose théorique nématode (Gy)	Dose cumulée mesurée au dosimètre et calculée au nématode (Gy)	Écart-type standard inter boîtes (n=10)	% d'erreur entre les répliqués
0,5	0,5	0,01	2,6
1,0	1,0	0,02	2,6
3,0	3,0	0,08	2,7
3,3	3,3	0,08	2,6
4,5	4,5	0,08	2,7
6,5	6,5	0,29	4,4

III. Etude des paramètres individuels chez *C. elegans*

1. Reproduction

Au cours des différents travaux menés durant cette thèse, le nombre cumulé de larves et le nombre d'embryons non éclos ont été comptés sur 8 jours. La somme de ces deux paramètres constitue la ponte totale par individus. Après irradiation, 20 individus par condition au stade L4-JA ont été transférés quotidiennement et individuellement dans de nouvelles boîtes de pétri (contenant du NGM et un tapis bactérien). Les boîtes de pétri contenant les œufs ont été placées dans un incubateur témoin à 19°C pendant 15h minimum, afin de permettre aux œufs d'éclore. Le lendemain, le nombre de larves ainsi que d'œufs non-éclos était compté. Cette méthode permet de mesurer la ponte totale mais également le succès d'éclosion des œufs pondus. Huit transferts par nématode ont été effectués afin de couvrir l'intégralité de la ponte.

2. Longévité

La longévité des individus a été suivie quotidiennement depuis l'arrêt de l'irradiation au stade L4-JA jusqu'à la mort des individus (environ 25jours). Après irradiation, 150 individus par condition au stade L4-JA ont été transférés dans de nouvelles boîtes de pétri (contenant du milieu NGM et un tapis bactérien). Afin de bloquer la production d'œufs et ainsi faciliter le comptage des nématodes irradiés, l'agent FudR (5-fluoro-2'-deoxyuridine, Sigma Aldrich) a été ajouté au milieu NGM à raison de 0,5mM. Les boîtes de pétri contenant les nématodes étaient placées en incubateur contrôle à 19°C. Chaque jour, les nématodes morts étaient retirés des boîtes de pétri et comptés. Les nématodes considérés morts étaient ceux qui ne répondaient pas au stimulus externe (stimulation avec un fil de platine).

Des difficultés expérimentales ont été rencontrées lors des expériences d'irradiation, *i.e.* inefficacité de l'agent bloquant la reproduction (FuDR) empêchant le comptage des nématodes sur 25 jours (dû fait d'une trop grande population générée). Par conséquent, les résultats concernant la longévité des nématodes exposés aux rayonnements gamma ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

IV. Tests moléculaires

1. Etude de l'expression des protéines

Dans l'objectif de comparer la modulation de l'expression des protéines entre l'irradiation aiguë vs chronique, des analyses protéomiques différentielles ont été réalisées. La première approche a été une étude protéomique par 2D-DIGE qui a été ensuite complétée par une analyse protéomique label free. Ces analyses ont été réalisées sur les 3 doses cumulées communes entre ces deux modes d'irradiation, en plus des contrôles : 0,5 ; 1 et 3,3Gy. La complémentarité de ces deux méthodes sera détaillée dans leur chapitre dédié. Les analyses ont été menées sur chacun des 3 réplicats biologiques (1 réplicat = pool de 3000 nématodes), soit 24 échantillons au total. Ces analyses de protéomique ont été réalisées en collaboration avec le Centre de Cancérologie de Marseille (CRCM, Marseille). En particulier, les étapes d'excision des spots de protéines, leur digestion enzymatique et les analyses en spectrométrie de masse ont été entièrement réalisées par le CRCM.

a. Matériel et méthodes génériques

Les parties de « matériel et méthodes » présentées ci-après sont communes aux analyses de mesure de l'expression des protéines par la méthodologie 2D-DIGE et par la méthodologie Label-free. Les deux expériences de protéomique seront ensuite détaillées séparément.

i. Extraction des protéines

300µL de billes de zirconium (0,5mm de diamètre) ainsi qu'un volume égal de tampon de lyse ont été ajoutés sur le culot de nématodes et incubés 15 minutes à 4°C. La composition du tampon de lyse est donnée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Composition du tampon de lyse utilisé afin d'extraire les protéines de *C. elegans*.

Produits	Concentration finale dans le tampon de lyse
Tris-Hcl pH7,4	30mM
NaCl	150mM
Igepal CA-630	1% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)
Sodiumdeoxycholate	0,5% (w/v)
sodium dodecyl sulfate (SDS)	0,1%(w/v)
glycérol	2% (V/v)
1,4-dithiothreitol (DTT)	2mM
leupeptine	1mg/ml
aprotinine	1mg/ml
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	1mM
ethylenediaminetetraaceticacide (EDTA)	1mM

Les nématodes ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (Precellys grinder system (Bertin Technologies)). Après 3 cycles de broyage à 6800-rpm, et 1h d'incubation sur glace, les tubes en plastique contenant le lysat et les billes ont été percés, placés dans des tubes falcons de 15mL, puis centrifugés pendant 2minutes à 400g de manière à isoler le lysat des billes de zirconium. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 13500g pendant 15minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et aliquoté. La concentration en protéine dans les échantillons a été déterminée en utilisant le kit de dosage protéique BCA kit (ThermoScientific) basée sur la méthode du biuret [191], en utilisant la BSA comme standard (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich).

ii. Purification des échantillons

Suite à l'extraction et au dosage des protéines, 110µg de protéines ont été purifiées par précipitation avec de l'acide trichloroacétique 10% (V/V). L'objectif de cette étape est de purifier l'extrait protéique pour éliminer les lipides, acides nucléiques et sucres qui pourraient interférer lors du marquage et de la migration des protéines. La procédure de clean-up a été adaptée au laboratoire et permet un taux de recouvrement des protéines de 80% [192]. Pour 50µL d'échantillon, les protéines ont été précipitées par 33µL d'acide trichloroacétique 10% à 4°C durant 30minutes. Le culot a ensuite été rincé par 3 cycles de rinçages avec 630 µL d'éthylacétate/ éthanol (V/V) et centrifugation à 13500g pendant 5minutes. Après les rinçages, le culot de protéines a été re-suspendu dans un tampon UTC9231 (9M urée, 2M thiourée, 3% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) ASB14, 20mM Tris, pH 9,5) sous agitation (1600rpm) à 30°C pendant 2heures. A la fin de cette étape de re-suspension, le pH des extraits protéique a été ajusté à 8,7 grâce à l'ajout de 16µL d'une solution de 50mM tris-

HCl pH 8,5, afin de permettre ultérieurement la réaction de marquage fluorescent. Les extraits de protéines ainsi purifiés et re-solubilisés ont été congelés et stockés à -80°C, pour être analysés ultérieurement.

iii. Excision des spots pour analyse en spectrométrie de masse

Après électrophorèse 2D et analyse des spots de protéines différentiels, les spots sont piqués grâce au robot schimadzu Xcise (Schimadzu).

Après stacking des protéines sur gel pour l'analyse label free, les bandes de protéines ont été excisées à l'aide d'un scalpel.

iv. Digestion trypsique

La première étape du protocole de digestion des protéines à la trypsine est nécessaire afin d'éliminer le bleu de coomassie ainsi que le SDS par des étapes de lavage par déshydratation/réhydratation. En effet, le SDS inhibe l'activité de la trypsine. Ainsi les spots de protéines différentiels (issus de l'analyse 2D-DIGE) et les bandes de protéines (issues du stacking de protéines pour l'analyse label free), subissent d'abord deux lavages successifs avec 200µL de bicarbonate d'ammonium/acétonitrile (NH₄HCO₃ 0,1M /CH₃CN (V/V)) pendant 15minutes. Les spots/bandes de protéines sont ensuite réhydratés avec 100µL de bicarbonate d'ammonium 0,1M pendant 5minutes. Finalement, 100µL d'acétonitrile sont ajoutés en remplacement sur les spots/bandes pendant 15minutes, puis retirés. Ces 2 étapes sont répétées une fois puis les spots/bandes sont laissés à sécher.

La deuxième phase du protocole de digestion trypsique correspond à une phase de réduction des ponts disulfures au DTT et d'une alkylation des cystéines à l'iodoacétamide. Ainsi, les spots/bandes de protéines sont incubés pendant 45 minutes à 56°C dans 100µL de DTT 10mM/bicarbonate d'ammonium 0,1M. Cette solution est ensuite remplacée par 100µL d'iodoacétamide 55mM dilué extemporanément dans du bicarbonate d'ammonium 0,025M. Après une étape d'incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes, la solution est retirée, puis le DTT et l'iodoacétamide sont éliminés par deux lavages successifs avec une solution de bicarbonate d'ammonium 0,025M/acétonitrile (V/V) pendant 5minutes.

La phase de digestion est réalisée sur glace afin de limiter la réaction d'autolyse de la trypsine. Après préparation de la solution de trypsine (12,5ng de trypsine par µL de bicarbonate d'ammonium), 25µL de celle-ci sont ajoutés sur les morceaux de gel. Après incubation sur glace pendant 15minutes, 75µL de bicarbonate d'ammonium 0,025M sont ajoutés suivi d'une phase d'incubation sur la nuit à 37°C.

Après arrêt de la digestion par l'ajout de 75µL d'acide formique 5%, les peptides sont extraits par sonication durant 5 minutes. Le surnageant contenant les peptides est alors transvasé dans des tubes eppendorfs puis 75µL d'acétonitrile/acide formique 5% (60/40) sont ajoutés. L'étape de sonication/lavage est répétée 2 fois.

Les tubes contenant les peptides sont ensuite passés au speedVac pendant 3 heures afin que l'acétonitrile et l'acide formique s'évaporent.

v. *Analyse par spectrométrie de masse*

Dans le cas d'une analyse protéomique d'un mélange biologique complexe, des milliers de peptides sont générés après digestion à la trypsine. Pour simplifier ce mélange une séparation chromatographique en amont est nécessaire. Ici les peptides contenus dans chacun des échantillons ont été séparés par chromatographie liquide (Ultimate3000 NanoRSLC Dionex). Ensuite les peptides ont été analysés en spectrométrie de masse (Orbitrap LTQ Velos ou Orbitrap Fusion Lumos ThermoFischer Scientific), qui est une étape nécessaire pour séparer les peptides co-élus en chromatographie liquide.

vi. *Recherche des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les protéines variantes*

Suite à l'identification des protéines différemment exprimées après irradiation chez *C. elegans*, une analyse des fonctions biologiques a été réalisée *via* l'outil d'interaction DAVID gene [193]. En effet, les protéines ont été regroupées selon les processus biologiques qu'elles régissent (GOTERM) pour une analyse simplifiée. Après sélection de l'organisme d'étude (*C. elegans*), les identifiants Uniprot des protéines différemment exprimées ont été implémentées dans l'outil David gene, ainsi que le bruit de fond (*i.e.*, l'ensemble des protéines identifiées lors des analyses protéomiques). Ensuite, les processus biologiques dans lesquels sont impliqués les protéines variantes entre les différentes conditions d'irradiation ont été recherchés et classés en fonction de leur *p. value* (<0.1).

b. *Par la méthodologie 2D DIGE*

L'électrophorèse DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) est une technique d'analyse permettant la comparaison quantitative de protéomes [194]. Les extraits protéiques sont séparés selon 2 dimensions : en fonction du point isoélectrique des protéines, par focalisation isoélectrique (IEF), et de leur masse moléculaire par migration en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Le marquage fluorescent des lysines des protéines, par réaction chimique avec un ester de N-hydroxy-succinimide (NHS) porteur d'un fluorophore, en amont de la séparation permet la détection et la quantification sensible des spots protéiques. Un jeu de trois fluorophores (Cy2, Cy3, Cy5), de rendement quantique similaire, ne modifiant pas la réactivité de l'ester, est classiquement utilisé pour une expérimentation DIGE ; cela permet de comparer deux échantillons dans un même gel et d'utiliser un 3^{ème} fluorophore pour l'étalon interne servant à s'affranchir des variations intergels. L'étalon interne, commun à tous les gels, est composé d'un mélange de tous les échantillons marqués par le troisième fluorophore. Ainsi, il est par exemple possible de comparer 12 échantillons sur 6 gels, les différences de migrations des protéines d'un gel à un autre étant corrigées par l'étalon interne. 75µg de protéines par réplicat ont été utilisés pour les analyses de 2D-DIGE. L'étalon interne a quant à lui été constitué avec 25µg de protéines issus de chacun des 24 échantillons soit un total de 600µg de protéines.

i. Marquage des échantillons « dye swap »

Après purification des échantillons, les protéines subissent un marquage fluorescent. Ce marquage est appelé « minimal labelling » car seule une lysine par protéine est marquée par le fluorophore ce qui permet une distribution représentative et quantitative de l'ensemble des protéines. Ainsi le marquage a été réalisé par incubation de 400pmol de fluorophore pour 50µg de protéines ajustées à une concentration comprise entre 2,5 et 10µg.L⁻¹, sur glace et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Les solutions de cyanine NHS ester ont été reconstituées avec 12,5µl de Diméthylformamide (DMF anhydre) pour 5nmol de fluorophore, pour obtenir une concentration de 400pmol.ml⁻¹. La réaction de marquage est ensuite arrêtée par ajout de lysine à 10 mmol.L⁻¹. 19,6µL de chaque échantillon protéique (concentré à 2,6µg.l⁻¹) (24 au total) a été marqué avec 1,2µL de fluorophore cyanine NHS, soit cyanine3-NHS soit cyanine5-NHS. Les protéines constituant l'étalon interne (196µL) ont été marquées par l'ajout de 12,2µL de fluorophore cyanine2-NHS.

Pour la constitution des groupes d'échantillons, une procédure dite de « dye swap » a été utilisée afin d'augmenter la robustesse de l'analyse 2D-DIGE. En effet, les échantillons sont répartis entre les différents gels de manière à éviter que les échantillons issus d'une même condition ne se retrouvent sur un même gel. De plus, les échantillons issus d'une même condition sont répartis entre les fluorophores cyanine3-NHS et cyanine5-NHS. Ainsi, cette procédure permet d'éviter d'éventuels biais lors de l'acquisition du signal de fluorescence entre les deux couleurs. L'organisation des échantillons par gel est présentée dans le Tableau 10.

NB : Dans la perspective de comparaison étroite aiguë / chronique, les expériences de protéomiques ont été dimensionnées de manière à ce que les échantillons issus des irradiations aiguë et chronique soient analysés ensembles pour éviter tout biais analytique.

Tableau 10 : Répartition des échantillons pour chaque gel. Les chiffres entre parenthèse correspondent au numéro du réplicat biologique : 1 ; 2 ou 3.

N° strip IEF	N° de gel	ID échantillon Cye5-NHS	ID échantillon Cye3-NHS
47216	1	3,3Gy chronique (2)	Contrôle aigu (2)
47217	2	Contrôle chronique (1)	0,5Gy aigu (3)
47218	3	0,5Gy chronique (2)	1Gy aigu (2)
47219	4	0,5Gy chronique (1)	Contrôle aigu (3)
47220	5	Contrôle aigu (1)	1Gy chronique (3)
47230	6	0,5Gy aigu (1)	3,3Gy aigu (3)
47231	7	3,3Gy aigu (1)	Contrôle chronique (3)
47232	8	1Gy chronique (1)	Contrôle chronique (2)
47233	9	0,5Gy aigu (2)	3,3 Gy chronique (3)
47234	10	3,3Gy chronique (1)	1Gy aigu (3)
47235	11	3,3Gy aigu (2)	0,5Gy chronique (3)
47236	12	1Gy aigu (1)	1Gy chronique (2)

A l'issue du marquage, 50µg d'échantillon marqué en cye3-NHS, 50µg d'échantillon marqué en cye5-NHS et 50µg d'étalon interne marqué en cye2-NHS sont assemblés pour constituer la solution à séparer (12 solutions au total). A chaque solution sont ajoutés 60µL de tampon de dilution d'échantillon (4M Urée, 2M Thiourée, 1% CHAPS, 1% ASB14, 10% glycérol, 1,2% HED, bleu de bromophénol) préalablement supplémenté en IPG de manière à obtenir 0,75% d'ampholytes IPG pH 3-11 dans l'échantillon, afin d'obtenir une concentration de 1.5µg/µL de protéines et un volume de 120µL. L'ajout d'IPG permet de créer un gradient de pH nécessaire pour la focalisation iso-électrique.

ii. Première dimension de séparation des protéines : focalisation iso-électrique

La veille de la séparation par focalisation iso-électrique, les bandelettes IEF (immobiline dry strip, pH 3-11 NL 24 cm, GE Healthcare) ont été réhydratées sur la nuit à l'aide de 450µL de solution de réhydratation (4M Urée, 2M Thiourée, 1% CHAPS, 1% ASB14, 10% glycérol, 1,2% HED, bleu de bromophénol) contenant 0,75% d'IPG pH 3-11. Une fois réhydratées, les bandelettes sont placées dans l'IPGphor (Ettan IPGphor IEF system, GE Healthcare), couvertes d'huile minérale pour éviter leur déshydratation.

Les 120µL d'échantillons protéiques ont été déposés sur la bandelette à l'aide d'un système de cupule (Figure 23).

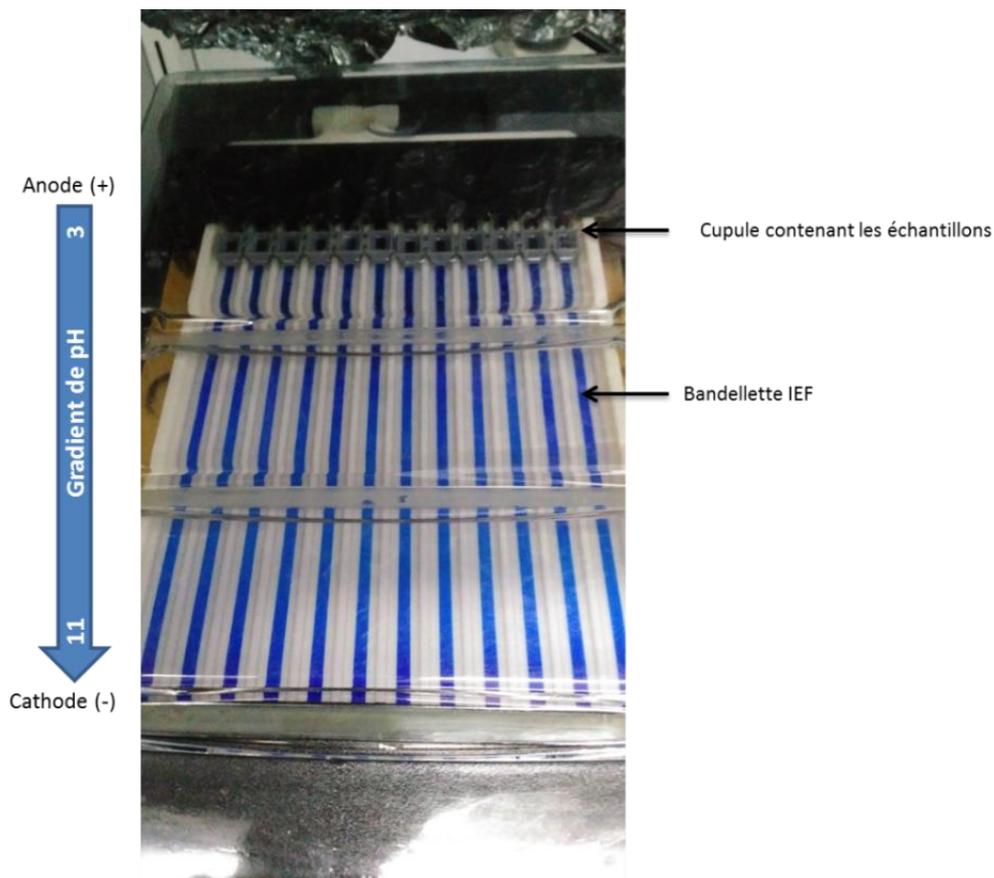


Figure 23 : Présentation du dispositif de focalisation iso-électrique par gradient de pH. Les protéines déposées dans la cupule sont séparées en migrant de l'anode vers la cathode en fonction de leur point iso-électrique (PI).

Une fois les échantillons déposés, un courant électrique est appliqué au système pendant 20h. La température est maintenue à 15°C et le courant maximum à 50 µA par bandelettes. Le programme d'électrofocalisation est indiqué dans la Figure 24.

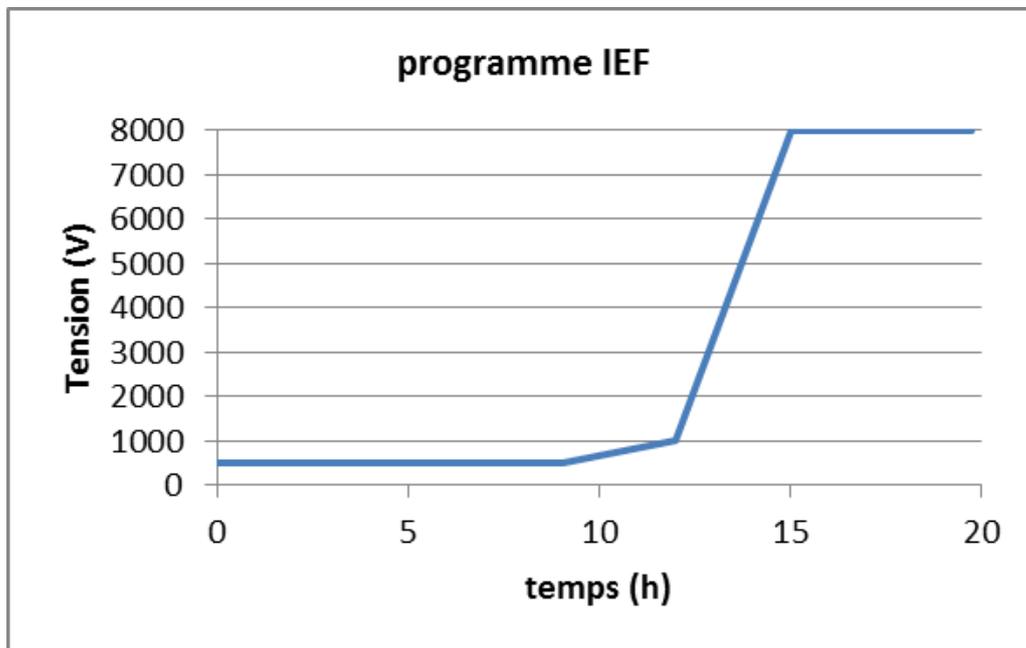


Figure 24 : Paramètres de focalisation iso-électrique.

iii. Deuxième dimension de séparation des protéines : électrophorèse sur gel

Après la focalisation iso-électrique des protéines, les bandelettes ont été transférées sur gels d'acrylamide 24cm à 12% (Acrylamide-bisacrylamide 37,1 : 1) préalablement coulés et stockés à 4°C en chambre humide pour éviter tout dessèchement.

Cependant, avant de déposer les bandelettes IEF sur les gels, une étape de préparation des bandelettes est nécessaire afin de faciliter la migration des protéines vers et dans le gel. Ainsi les bandelettes ont été incubées pendant 15minutes à l'obscurité dans un tampon d'équilibration contenant 1% de DTT (4M Urée, 2M Thiourée, 1% CHAPS, 1% ASB14, 30% glycérol, 75mM Tris, 2% SDS, bleu de bromophénol, pH 8,8). Cette étape est nécessaire afin de réduire les ponts disulfures contenus entre deux cystéines dans les protéines et ainsi faciliter la migration des protéines. Ensuite, les bandelettes sont incubées pendant 15minutes supplémentaires et à l'obscurité dans le tampon d'équilibration contenant 2,5% d'iodoacétamide. L'iodoacétamide est utilisé ici afin d'alkyler les groupements thiols des cystéines une fois réduits, afin d'éviter la re-formation de ponts disulfures. Les bandelettes sont ensuite déposées sur le gel et scellées avec une solution d'agarose à 0,5% préparée dans du tampon Tris-Glycine-SDS (TGS, Bio-Rad).

Une fois l'agarose polymérisé, la migration des protéines s'effectue pendant 20h à 1,5Watt par gel en cuve d'électrophorèse (Ettan6 GE Healthcare) et à l'abri de la lumière (Figure

25). La migration s'effectue à 12°C grâce à un système de circulation thermostatique MultiTemp IV (GE Healthcare) qui permet de maintenir la température du tampon de migration (TGS). Pour éviter l'épuisement des électrolytes, du tampon 2x est utilisé pour la chambre haute.

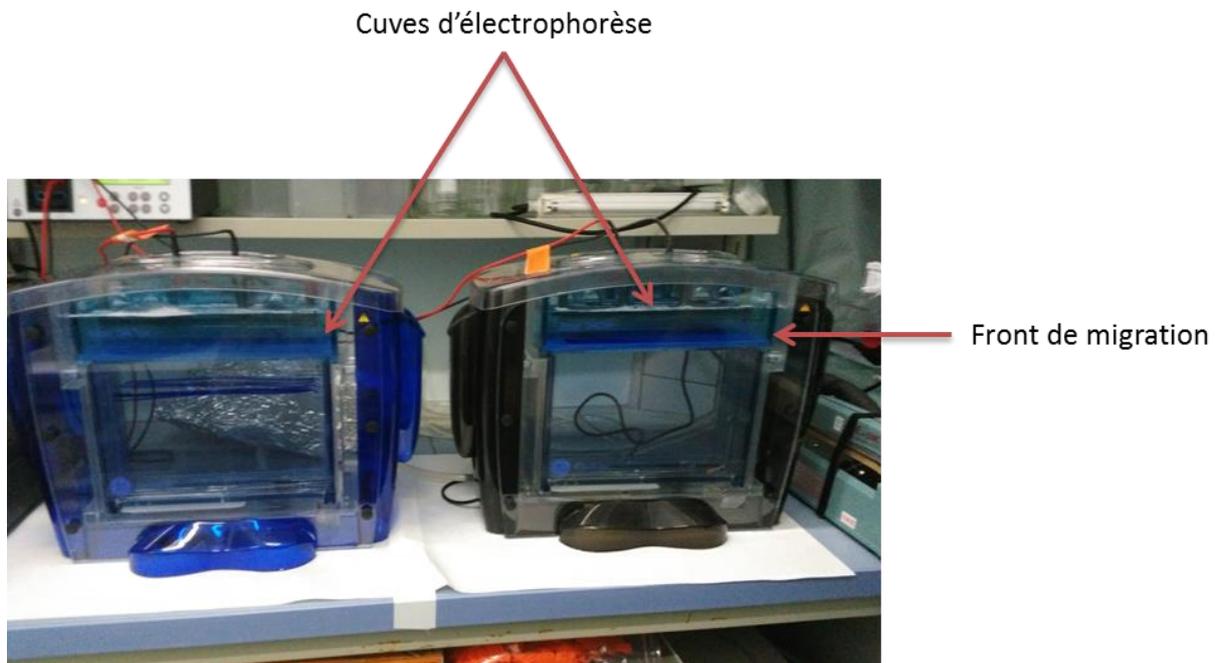


Figure 25 : Illustration du dispositif d'électrophorèse en deuxième dimension pour 12 gels (6 gels par cuve d'électrophorèse).

iv. Analyse des spots de protéines différentiels

Les gels ont ensuite été scannés afin de détecter et de quantifier les spots de protéines sur les différents canaux correspondant aux différents fluorophores (Cye2 ; Cye3 ; Cye5) via un scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). L'appareil dispose d'un jeu de lasers permettant d'émettre 4 longueurs d'onde d'excitation et d'un jeu de filtres permettant de sélectionner la longueur d'émission associée au fluorophore. Il est donc possible d'analyser plusieurs fluorophores cyanine NHS ester sur un même gel (multiplexing). Le signal est amplifié par des photomultiplicateurs avant détection. L'utilisation d'un scanner laser permet d'augmenter le rapport signal sur bruit, de discriminer les spots protéiques de faible abondance et d'optimiser le nombre de spots protéiques détectés.

L'ensemble des gels a été analysé et comparé par logiciel d'analyse Delta2D (Decodon). Après filtrage des traces et impuretés, un alignement de spots protéiques de l'étalon interne entre les différents gels a été réalisé. Au sein d'un même gel, les signaux des différents fluorophores cy2, cy3 et cy5 ont été alignés. A l'issue, une image de synthèse a été créée à partir de l'ensemble des signaux des échantillons, hormis l'étalon, afin d'identifier et d'isoler les spots protéiques. Ces deux étapes, assistées par le logiciel ont été révisées

manuellement. La sélection des spots différemment exprimés est réalisée en fonction du ratio d'intensité du spot entre les témoins et les différentes doses (0,5Gy vs témoin, 1Gy vs témoin et 3,3Gy vs témoin) et de la *p. value* associée. Ainsi, si le ratio d'intensité du spot est supérieur à 1,5 (sur-exprimé) ou inférieur à 0,75 (réprimé) associé à une *p. value* inférieure à 0,05 alors le spot est considéré comme différentiel (test de Student).

v. Analyse en spectrométrie de masse et interrogations des bases de données

Pour la DIGE, après digestion trypsique, les différents peptides ont été caractérisés par spectrométrie de masse (MALDI-Tof MS/MS UltraFlexIII Bruker Daltonics ; et Orbitrap LTQ velos ThermoFischer Scientific) et les protéines ont été identifiées par interrogation des bases de données NCBI/nr/C. *elegans* et Uniprot/UPP_C.elegans. Le MALDI TOF/TOF a été utilisé pour une première identification, raffinée par l'utilisation de l'Orbitrap.

c. Par la méthodologie « label free »

L'approche de protéomique *label free* (sans marquage) est une méthode quantitative moins contraignante que la DIGE en termes de préparation d'échantillons. La technologie Label-Free regroupe différentes méthodes de quantification relative de protéines qui ne nécessitent pas de marquage chimique des protéines comme pour la DIGE. Cette méthode est complémentaire à la DIGE car elle permet de rendre accessibles les protéines qui auraient pu être perdues lors de l'analyse 2D-DIGE (protéines hydrophobes par exemple ou protéines qui possèdent des masses moléculaires <5kDa et >150KDa) et les protéines qui seraient peu abondantes et donc invisibles. Les stratégies de protéomique quantitative de type « Label-free » ont été récemment développées pour répondre aux limitations d'autres approches de protéomique quantitative comme celle citée plus haut. Les approches Label-free sont applicables à tout type d'échantillon dans des conceptions d'expériences plus complexes, à condition que la reproductibilité entre les échantillons soit élevée lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Par rapport aux approches par gel, ici toutes les protéines identifiables sont quantifiables. Néanmoins, il est nécessaire de normaliser les données brutes, d'aligner les analyses LC-MS, de transférer les détections entre les LC-MS pour permettre la quantification des pics chromatographiques. Ce type d'approche semi-quantitative en spectrométrie de masse a fait son apparition parallèlement à l'introduction des spectromètres de masse à haute résolution (mesure de masse *m/z* beaucoup plus précise permettant l'alignement et la normalisation des acquisitions LC-MS) et par l'amélioration toujours plus grande des vitesses de détection et de retraitement des données par de nouveaux outils bioinformatiques. Plusieurs stratégies se sont développées dont deux largement utilisées en protéomique ; la quantification par courant ionique et la quantification de type « Spectral Counting » (Figure 26). Dans notre étude, nous avons utilisé l'approche de quantification par courant ionique qui est décrite ci-dessous.

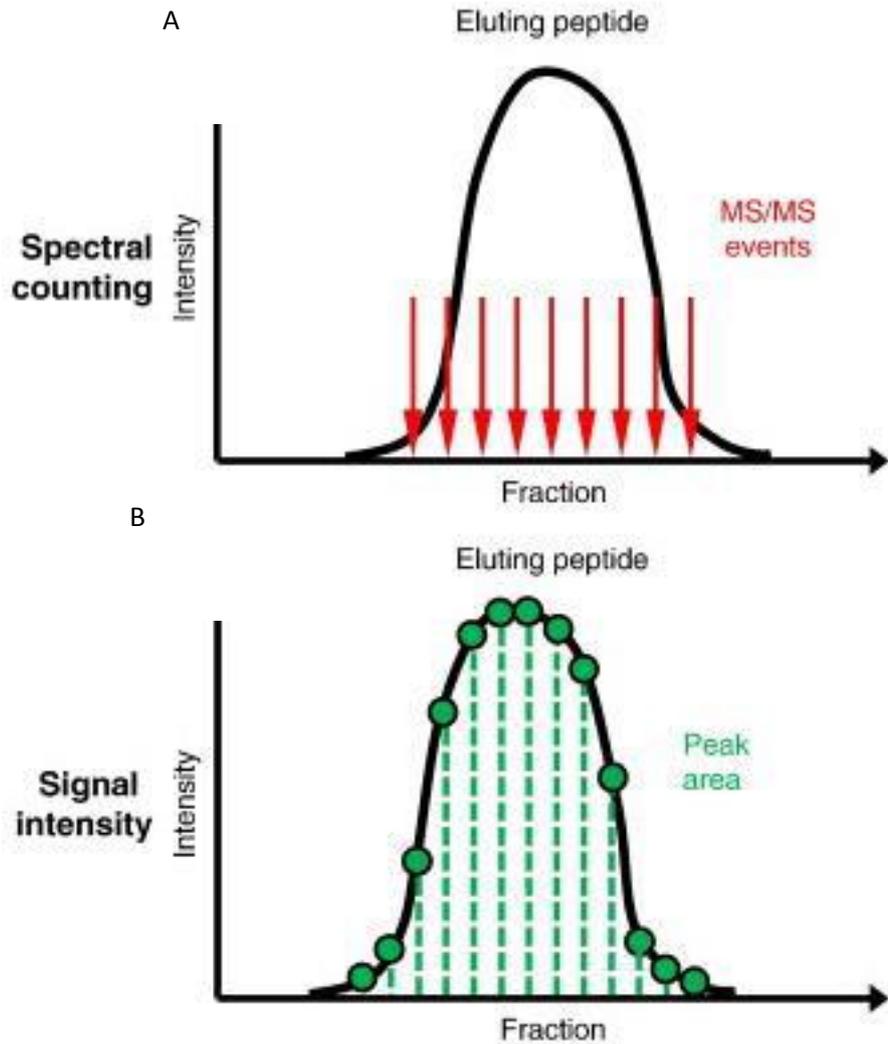


Figure 26: Représentation schématique des deux principes de quantification Label-free. L'analyse Label-free de type spectral counting (A) se base sur le nombre de spectres MS/MS effectué en spectrométrie de masse. L'analyse Label-free de type courant ionique (B) (ion current) se base sur l'intégration de l'aire du pic chromatographique du peptide élué de la chromatographie liquide et détecté en spectrométrie de masse [195].

La quantification Label-free par courant ionique se base sur la mesure et la comparaison des signaux des ions précurseurs détectés en spectrométrie de masse LC-MS/MS et spécifiques d'une protéine. L'abondance des ions précurseurs, à un m/z spécifique, sera calculé par l'intégration de l'aire du pic chromatographique extrait du chromatogramme du courant ionique obtenu par spectrométrie de masse [196]. La quantification par courant ionique est influencée par deux paramètres expérimentaux :

- L'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution réduit l'influence des signaux parasites de masses proches mais distinctes.
- La reproductibilité de la séparation en chromatographie liquide est un facteur important entre les différentes expériences pour l'alignement bioinformatique des chromatogrammes.

L'approche quantitative par label free a été appliquée sur des extraits protéiques issus d'organismes soumis à différentes conditions d'irradiation, purifiés et digérés enzymatiquement, préalablement séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Contrairement aux méthodes de quantification basées sur un marquage, les échantillons à comparer sont analysés séparément, mais la reproductibilité des méthodes de séparation (LC) et la précision de masse de l'analyse par spectrométrie de masse en fait une méthode robuste peu sujette aux variations possiblement rencontrées en DiGE. L'analyse label free consiste ensuite à comparer la quantité relative d'un peptide dans un échantillon par rapport à un autre par mesure de l'intégration de l'aire du pic chromatographique exprimée en unité d'intensité LFQ (pour label Free Quantification).

i. Préparation des échantillons

Lors de ces travaux de thèse, une étape de purification de l'échantillon, préalable à l'analyse label free, a été réalisée par « stacking » sur gel.

Ainsi, après extraction, dosage et purification des échantillons protéiques (décrits dans la partie « matériel et méthode généraux »), 15µg de protéines par réplicat sont déposés sur un gel NuPAGE 4-12% (Life technologies). Ensuite les protéines migrent pendant 6 minutes à 80V dans du tampon MOPS (acide 4-Morpholinopropanesulphonique, acide édétique, et acide acétique ; Thermofisher). Cette étape dite de « stacking » permet de concentrer les protéines sur le haut du gel avant de les colorer au bleu de coomassie pour ensuite découper les bandes de protéines avant l'étape de digestion trypsique.

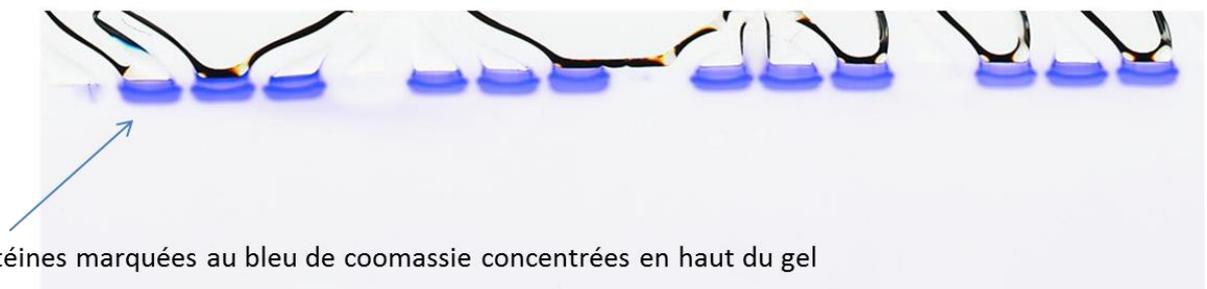


Figure 27 : Photo illustrant les protéines marquées au bleu de coomassie après l'étape de stacking sur gel. Un échantillon (réplicat biologique) est déposé par puits.

ii. Analyse en spectrométrie de masse et interrogations des bases de données

Afin de caractériser le protéome le plus complet possible, l'approche Label-free, utilisée ici, repose sur les mêmes échantillons précédemment analysés en 2D-DIGE. Après nettoyage des échantillons par une approche gel SDS-PAGE en stack décrite ci-dessus, les protéomes immobilisés dans le gel d'acrylamide ont subi les étapes de réduction, d'alkylation et de digestion par la trypsine. Chaque conditions (contrôle, 0,5, 1 et 3,3 Gy en chronique et aigu) ont été injectées en 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques en nano-chromatographie liquide (RSLC, Dionex) couplé au spectromètre de masse Orbitrap Fusion

Lumos. Un gradient linéaire utile de 150 min de 3,2% d'acétonitrile, 0,1% d'acide formique (jusqu'à 37% d'acétonitrile, 0,1% acide formique) est délivré à un débit de 300 nL.min⁻¹ pour séparer les peptides en fonction de leur degré d'hydrophobicité. En spectrométrie de masse, les peptides préalablement ionisés au niveau de la source, sont analysés dans la cellule Orbitrap dans une gamme de masse de m/z 300 – 1 700, à une résolution de 60 000 (m/z = 200). Les 10 ions précurseurs les plus abondants sont alors sélectionnés, fragmentés en CID (collision induced dissociation) à une énergie de collision de 35% et analysés dans la trappe ionique du spectromètre de masse. Ces conditions chromatographiques ont été optimisées préalablement avec un pool protéique issu de l'ensemble des échantillons ; 2600 protéines ont alors pu être identifiées suggérant que l'approche label-free permettra de couvrir un protéome plus large que la 2D-DIGE.

Les intensités relatives basées sur la quantification label-free (LFQ) ont été calculées en utilisant l'algorithme MaxLFQ [197] disponible dans la suite gratuite MaxQuant version 1.5.3.8 [198]. De plus, une intensité permettant d'estimer la quantité des protéines a été également calculé avec l'algorithme iBAQ [199]. Le logiciel MaxQuant se décompose en plusieurs étapes qui permettent d'extraire, d'identifier et de quantifier les peptides et protéines d'intérêts parmi les 8 conditions étudiées. Les 48 acquisitions brutes LC-MS ont été traitées par le moteur de recherche Andromeda intégré à MaxQuant [200]. L'identification des ions précurseurs présents dans les spectres de masse a été réalisée par comparaison avec la base de données protéiques de *C. elegans* extraite d'Uniprot en date du 17 janvier 2017 et contenant 28 794 entrées. Cette base de données a été complétée avec un ensemble de 245 protéines que l'on retrouve fréquemment comme contaminants. Les paramètres suivants ont été utilisés pour ces recherches : (i) autorisation de coupure par la trypsine avant les prolines ; (ii) autorisation de deux clivages ratés ; (iii) modification fixe des cystéines par carbamidométhylation (+57.02146 Da) et modification variable des méthionines par oxydation (+15.99491) et du N-terminal des protéines par acétylation (+42.0116) ; (iv) autorisation de 5 modifications par peptide ; et (v) longueur des peptides minimum de 7 acide aminés et une masse maximum de 4600 Da. Les spectres ont été automatiquement analysés par le logiciel MaxQuant. L'alignement est réalisé suivant les deux dimensions; le temps d'élution des ions précurseurs (min) et la gamme de masse paramétrée sur le spectromètre de masse (*e-g*, m/z 300-1700). L'option « Match between runs » a été activé pour permettre le transfert des identifications entre les LC-MS/MS sur la base des masses et du temps de rétention en utilisant les paramètres par défaut. Le taux de faux positifs sur l'identification a été fixé à 1%. L'analyse statistique a été réalisée avec le programme Perseus (version 1.6.0.7) de l'environnement MaxQuant. L'intensité normalisée LFQ a été transformé par un logarithme de base 2 pour obtenir une distribution normale. Les protéines différentielles ont été mises en évidence par l'application d'un t-test multiple ANOVA ou un test de student réalisé en contrôlant le taux de faux positif à 1% en employant 250 permutations. Les protéines différemment exprimées entre les échantillons est réalisée en fonction de la différence en log₂ de l'intensité LFQ de la protéine entre les témoins et les

différentes doses (0,5Gy vs témoin, 1Gy vs témoin et 3,3Gy vs témoin) et du log10 de la *p*. *value* associée et ces résultats sont visualisés par un volcano plot. La quantification LFQ des protéines a été réalisée après élimination des peptides modifiés, des peptides partagés avec d'autres protéines, des protéines contaminants (kératine par exemple) et des protéines qui ne sont représentées que dans 2 réplicats sur 6 d'une même condition.

2. Dommages aux protéines-Etude de la carbonylation

La mesure des protéines carbonylées est basée sur la réaction spécifique d'un composé hydrazide, couplé à un fluorophore pour une détection sensible, avec les fonctions carbonyles des aldéhydes et des cétones des protéines.

Cette mesure peut se faire avec différents niveaux de précision en fonction des objectifs requis : après séparation des protéines sur gel 1D (en fonction du poids moléculaire), au niveau de l'individu entier par imagerie, et après séparation des protéines sur gel 2D (en fonction du point isoélectrique et du poids moléculaire).

Le niveau global de protéines carbonylées a été évalué à l'aide des deux premières méthodes citées ci-dessus. Ces techniques sont complémentaires et concordantes et ont été optimisées au laboratoire [192], [201]. La première méthode consiste à mesurer le niveau de protéines carbonylées après extraction protéique, purification, marquage des carbonyles, séparation et mesure de fluorescence [192]. La seconde méthode ne requiert aucune extraction des protéines, les carbonyles sont marqués *in situ* dans le nématode [201]. L'utilisation de l'électrophorèse 2D des protéines sur gel, comme détaillé plus haut dans ce chapitre, permet d'établir, après dérivation préalable des carbonyles par un hydrazide fluorescent, une cartographie des protéines carbonylées, afin de pouvoir déterminer quelles protéines sont plus ou moins carbonylées mais aussi plus ou moins exprimées par rapport aux témoins. Cette méthode a également été optimisée au laboratoire (Méthode dite de « 2D-OxyDIGE ») bien que certaines expériences ont aussi été menées en parallèle dans le cadre d'une collaboration avec le MedILs.

a. Etude du niveau global de protéines carbonylées

i. Par électrophorèse 1D

Dérivation des carbonyles

Après extraction et dosage des protéines (décrits dans la partie « matériel et méthodes généraux »), les concentrations protéiques sont ajustées à 1,2µg/µl par ajout de tampon d'extraction afin de travailler à concentration identique pour tous les échantillons et une même prise d'essai.

La solution de cyanine5-hydrazide (FP-IO2490, Interchim) est préparée en ajoutant 35,14µL de DMSO (dimethylsulfoxyde, Sigma Aldrich) à 1mg de Cy5-Hz pour obtenir une

concentration de 50mM (cette solution mère peut être conservée 1mois à -20°C). Cette solution est ensuite diluée 100 fois dans le tampon de dilution suivant : 0,1M Acétate de sodium, 1mM EDTA, 1%SDS, pH 4,5) [202].

15µg de protéines (soit 16,5µL d'extrait protéique) sont ensuite dérivés par l'ajout de 16,5µL de la solution à 0,5mM de cyanine5-Hydrazide, suivis d'une incubation pendant 20minutes dans l'obscurité et à 25°C. La réaction est ensuite stoppée et stabilisée par l'addition de 1,35µL de NaBH4 à 0,2M et de 8,25µL de tris à 2M, suivis d'une incubation pendant 10minutes dans l'obscurité à 25°C.

Purification et « minimal labelling »

Les protéines sont ensuite purifiées par précipitation au TCA 50% et les lysines des protéines sont marquées avec le fluorophore Cyanine3 –NHS ester (FP- LV2330, Interchim) comme décrit dans la partie « matériels et méthodes généraux ».

Electrophorèse

15µl d'échantillons sont préalablement incubés avec 3 µl de tampon de charge 5X à 95°C pendant 15 minutes dans un bloc thermomixer sous agitation douce (300 rpm) afin de dénaturer les protéines et ainsi faciliter la migration.

La migration a été réalisée en cuve d'électrophorèse Mini-Protean (Biorad) selon le protocole de migration du manuel d'instruction « Mini-Protean Tetra vertical electrophoresis cell, rev. D » (Biorad). Après focalisation des protéines pendant 15 minutes à 100V, celles-ci ont migré pendant 45minutes à 150V, jusqu'à la sortie du front de migration.

Analyse du signal

Les gels ont ensuite été scannés afin de détecter et de quantifier les signaux de fluorescence sur les différents canaux correspondant aux différents fluorophores (Cye3 et Cye5) *via* un scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

Les images ont ensuite été analysées à l'aide du mode « 1D analysis » du logiciel Image Quant TL (GE Healthcare). Les intégrations ont été réalisées à l'aide de la fonction « minium profile » du logiciel. Une piste contenant tous les tampons précités sans extrait protéique a été utilisée afin de soustraire le bruit de fond pour chacune des pistes intégrées (Figure 28B). La quantification en nmoles de carbonyles /mg de protéines a été effectuée en spottant 1µL de dilutions sériées de solutions de cye5-Hz (Figure 28A). Enfin un contrôle positif (nématodes stimulés aux UV) ou une condition commune ont été déposés sur une piste pour chacun des gels pour faciliter la comparaison de plusieurs gels entre eux.

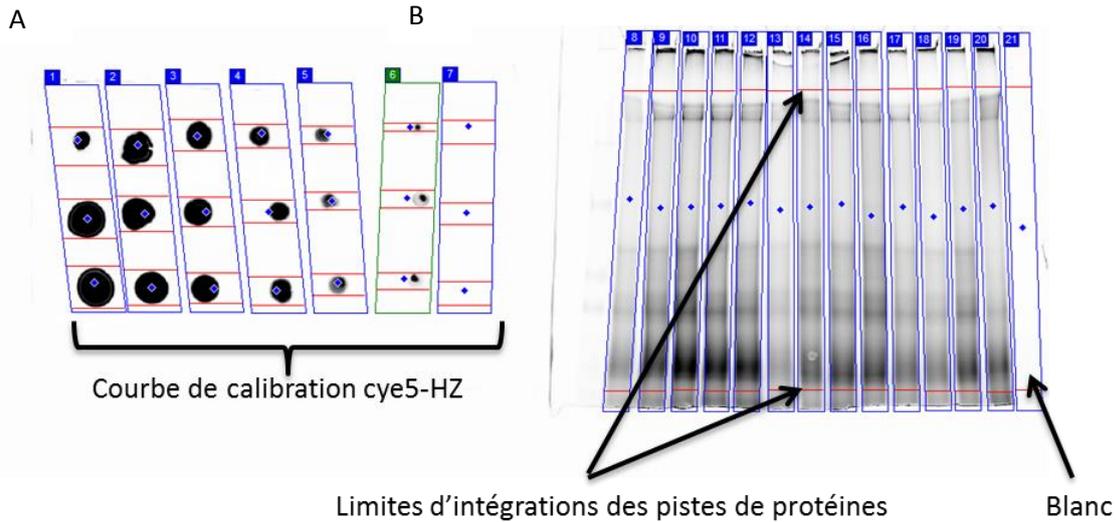


Figure 28 : Illustration de la méthode d'intégration avec le logiciel IQTL. A/ courbe de calibration de cye5-Hz (de 2,5 à 20pmoles de carbonyles) et B/ intégration de chaque piste de gel par la fonction minimum profile du logiciel.

ii. Par marquage *in situ* des carbonyles

Contrairement à la mesure des carbonyles après électrophorèse qui permet la mesure des protéines carbonylées, cette technique *in situ* permet le marquage des carbonyles présents sur toutes les biomolécules de l'organisme (ADN, lipides, protéines, sucres, ARN). Le protocole de marquage *in situ* des carbonyles est le même que celui qui est présenté dans le chapitre suivant « localisation *in situ* des carbonyles ».

b. Localisation *in situ* des carbonyles

i. Préparation des échantillons suivant Kuzmic et al 2016

Avant marquage, les nématodes ont été incubés pendant 3 minutes sur glace dans une solution d'isopropanol 40% afin de permettre aux différentes solutions de fluorophores de pénétrer dans les cellules. Les tubes contenant les nématodes ont ensuite été centrifugés pendant 1 minute à 13500g afin de retirer la totalité d'isopropanol.

Afin de marquer les carbonyles *in situ*, le culot de nématode a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation (500rpm) dans 150µL d'une solution à 4µg/mL de cyanine5 Mono hydrazide (GE Healthcare) dans de l'isopropanol 40%. Le culot de nématodes a ensuite été rincé avec du milieu M9 supplémenté par 0,01% de triton X100 par 3 cycles de centrifugation à 13500g à température ambiante suivis par le retrait complet du surnageant.

Après le marquage des carbonyles, les protéines totales ont été marquées en incubant les nématodes pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation (500rpm) dans 150µL d'une solution à 0,5µg/mL de Cyanine 3 NHS ester minimal dye (Interchim) dans de l'isopropanol à 40%. Le culot de nématodes a ensuite été rincé comme mentionné ci-dessus.

L'ADN a été marqué avec du DAPI. Ainsi, le culot de nématodes a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation (500rpm) dans 150µL d'une solution à 0,4µg/mL de DAPI Vectashield milieu de montage pour fluorescence (Vector Laboratories) dans de l'éthanol absolu dilué à 70%. Aucun rinçage n'a été effectué après cette étape, uniquement une étape de centrifugation pendant 1 minute à 13500g a été réalisée.

Le dernier marquage effectué concernait les lipides (lipides contenus dans l'hypoderme et lipides acides). Ainsi, le culot de nématodes a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation (500rpm) dans 150µL d'une solution à 2µg/mL de BODIPY 505/ 515 (Molecular Probes ThermoFisher Scientific) dans de l'isopropanol à 40%. Le culot de nématodes a ensuite été rincé avec du milieu M9 supplémenté par 0,01% de triton X100 par 4 cycles de centrifugation à 13500g à température ambiante suivis par le retrait complet du surnageant.

Une fois les marquages des carbonyles, des protéines, de l'ADN et des lipides réalisés, 5µL d'échantillon (contenant les nématodes marqués) ont été déposés sur des lames de microscopie préalablement supplémentées d'une solution d'agarose à 2%. Les lames contenant les nématodes ont ensuite été recouvertes d'une lamelle de microscopie.

ii. Analyse

Par scanner

Les lames ont ensuite été scannées afin de détecter et de quantifier les signaux de fluorescence émis par chacun des nématodes sur les différents canaux correspondant aux différents fluorophores (Cye2 pour le bodipy; Cye3 pour les protéines; Cye5 pour les carbonyles) *via* un scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Entre 30 et 100 nématodes par réplicat biologique ont été analysés. Une résolution de pixel de 10µm a été utilisée de manière à pouvoir visualiser chacun des nématodes. Les signaux issus de chacun des canaux ont ensuite été intégrés par le logiciel Image Quant TL (GE Healthcare) en utilisant le mode « colony counting » du programme. Les intégrations effectuées pour chacun des signaux cye2, cye3 et cye5 ont été réalisées sur le même nématode. Ensuite, la moyenne d'intensité de fluorescence (intensité de fluorescence normalisée par l'aire de la zone intégrée) de chaque nématode a été considérée. Enfin la moyenne et l'écartype ont été calculés pour chaque condition d'exposition et pour chaque réplicat biologique. Les intensités observées après les différentes conditions d'exposition ont été comparées entre elles (quantification relative) mais une quantification absolue n'a pas pu être réalisée.

Signal de fluorescence (ici cye5) issu des nématodes

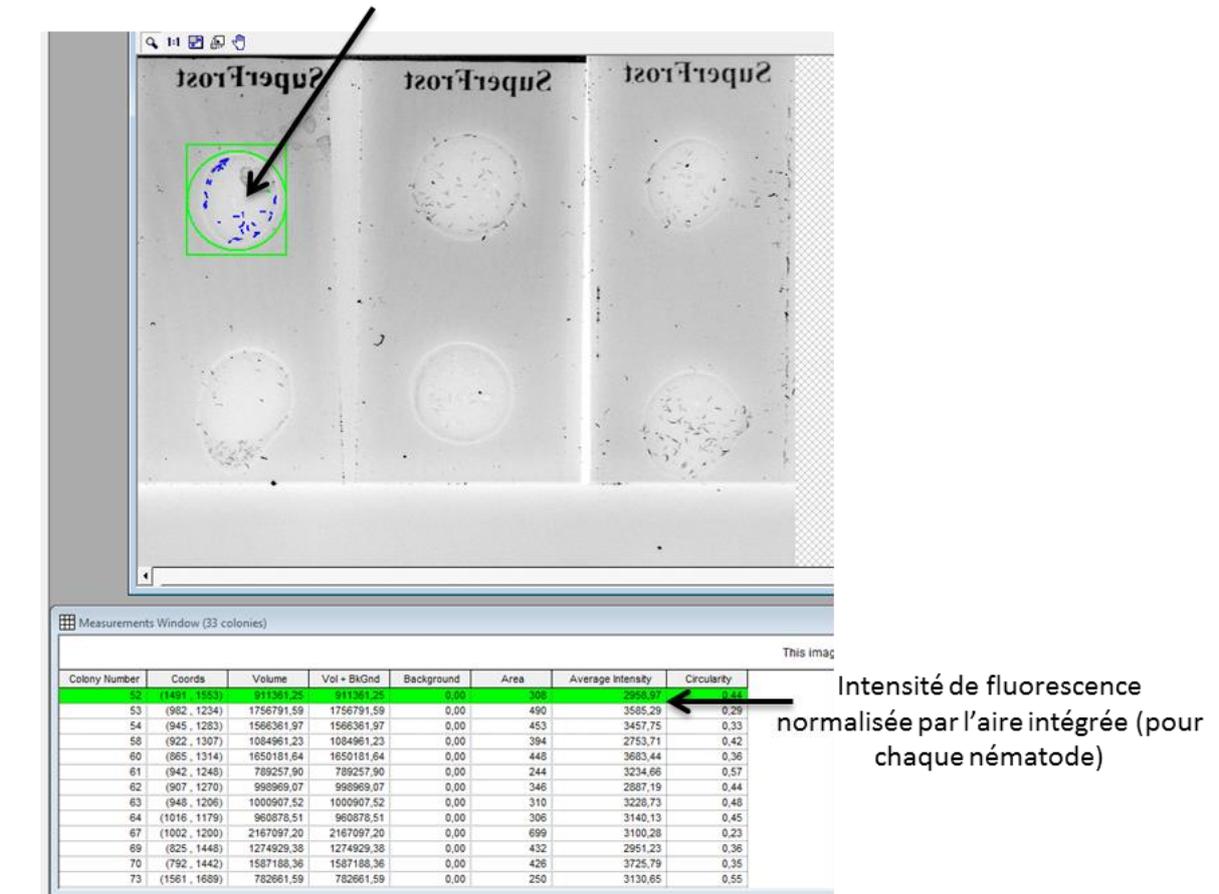


Figure 29 : Exemple d'intégration du signal de fluorescence en Cy5 issu des nématodes marqués par le logiciel IQTL par le mode d'intégration « colony counting ».

Par microscopie confocale

Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal LSM 780 (Carl Zeiss, France) en utilisant un objectif X10 afin de pouvoir visualiser les nématodes entiers, avec un sténopé de 1,31 (unité arbitraire) et une résolution de 12bits.

Les fluorophores Cy5, cye3, Dapi et Bodipy ont été excités simultanément avec 3 lasers respectifs : 633 (puissance 65% de puissance) ; 561 (20% de puissance) et 405nm (1,1% de puissance). Les images ont été acquises en mode spectral (en utilisant le filtre MBS 405/561/633) et le signal a été collecté de 411 à 696nm en utilisant le détecteur spectral GaSP. Les spectres d'émission de référence ont été enregistrés pour chaque fluorophore séparément (en utilisant leur excitation laser correspondante). En outre, un spectre de référence a également été enregistré sur des échantillons non marqués pour chaque laser afin de déterminer l'autofluorescence des nématodes. Une séparation spectrale utilisant ces spectres de référence a été appliquée sur les images acquises en quadruple marquage avec une dissociation linéaire des signaux issus des différents canaux (« linear un-mixing ») [203]. Cette méthode permet d'obtenir pour une même image 4 canaux correspondant aux 4 fluorophores de manière séparée et 3 bruits de fond correspondant aux spectres

d'autofluorescence. La Figure 30 schématise le principe de dissociation linéaire des canaux afin de pouvoir visualiser le signal de fluorescence pour chacun des 4 fluorophores.

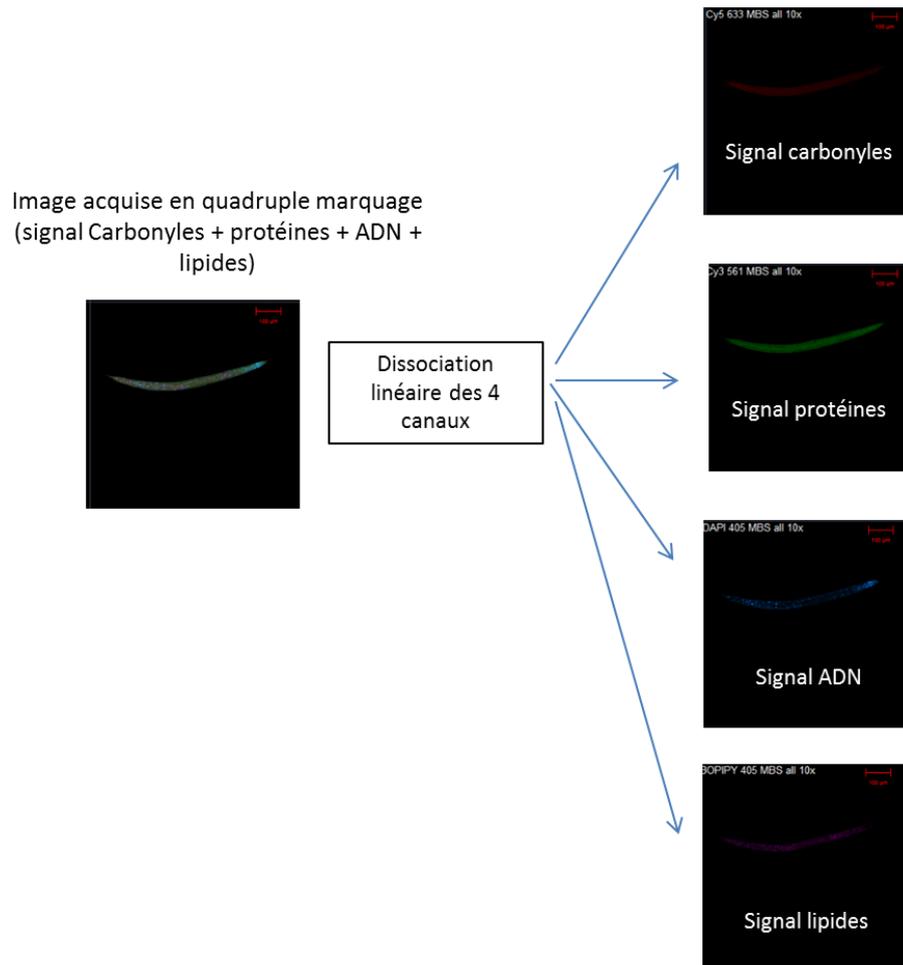


Figure 30 : Images confocales de nématodes acquises avec l'objectif X10. Schématisation du principe de dissociation linéaire des canaux afin de pouvoir visualiser le signal de fluorescence pour chacun de 4 fluorophores.

c. Mesure de la nature des protéines carbonylées

L'analyse de l'expression et de la carbonylation différentielle des protéines chez *C. elegans* a été réalisée par la méthodologie 2D-oxyDIGE pour chacune des doses : 0,5, 1, 3,3, 6,5, 14,4, 50, 80 et 200Gy d'irradiation aiguë.

Le principe de la 2D-oxyDIGE est le même que la mesure du niveau de protéines carbonylées par électrophorèse 1D, à la différence qu'au lieu de déposer les extraits protéiques marqués directement sur gel, ceux-ci sont déposés sur un strip IEF à l'image de l'analyse DIGE. Une fois la séparation iso-electrique des protéines réalisée, le strip est déposé sur gel. Pour la mesure de l'expression et de la carbonylation différentielle des protéines, un jeu de trois fluorophores sont utilisés : cyanine5-Hz qui va marquer les carbonyles, une cyanine2-NHS et une cyanine3-NHS qui vont marquer les protéines totales, la cyanine3-NHS est utilisée pour marquer les protéines totales du standard interne. Contrairement à la DIGE classique, cette méthode ne permet pas d'analyser 2 échantillons par gel.

L'ensemble des gels a été analysé et comparé par logiciel d'analyse Delta2D (Decodon). Après filtrage des traces et impuretés, un alignement de spots protéiques de l'étalon interne entre les différents gels a été réalisé. Au sein d'un même gel, les signaux des différents fluorophores cy2, cy3 et cy5 ont été alignés. La sélection des spots différemment exprimés/carboxylés est réalisée en fonction du ratio d'intensité du spot entre les témoins et les différentes doses (0,5Gy vs témoin, 1Gy vs témoin et 3,3Gy vs témoin, etc...) et de la *p. value* associée.

Cependant, afin de limiter la consommation d'échantillons, mais également car l'expérience 2D-oxyDIGE impose d'utiliser un seul échantillon par gel, ce qui la rend longue et fastidieuse, les extraits protéiques issus des triplicats biologiques ont été poolés. Par conséquent, aucun test statistique n'a pu être réalisé lors de cette expérience, et aucune *p. value* n'a pu être calculée. Donc si le ratio d'intensité du spot est supérieur à 1,5 ou inférieur à 0,75 le spot est considéré comme variant, mais pas de manière significative.

3. Analyse de l'activité du protéasome

Les mesures d'activité et de niveau d'expression du protéasome ont été réalisées en collaboration avec le Centre de Recherche sur les BioMolécules (CRBM, Montpellier).

a. Extraction protéique

L'extraction des protéines a été réalisée à l'aide d'un tampon de lyse non dénaturant (natif) afin de préserver les activités enzymatiques du protéasome. Le tampon d'extraction est préparé fraîchement et est conservé dans la glace au cours de la série de préparation des échantillons. Ainsi, 100µL de tampon de lyse ajusté à pH 8 ont été ajoutés sur le culot de 2000 nématodes. La composition du tampon de lyse est donnée dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Composition du tampon de lyse utilisé afin d'extraire les protéines de *C. elegans* en conditions natives.

Produits	Concentration finale dans le tampon de lyse
Tris-Hcl	20mM
MgCl ₂	5mM
Igepal CA-630	0,2% (v/v)
Adénosine tri-phosphate (ATP)	1mM
1,4-dithiothreitol (DTT)	1mM
glycérol	10% (V/v)
aprotinine	1mg/ml
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	1mM

Les nématodes ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem (Eurostar digital ika labortechnik) à 4°C. Après 4 minutes de broyage à 2000rot.min⁻¹, le broyat a ensuite été transféré dans un tube eppendorf 1,5mL à l'aide d'une pipette pasteur. L'échantillon a été centrifugé à 13500g pendant 15minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré, aliquoté congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C. La concentration en protéine dans les échantillons a été déterminée sur 3µL (triplicat) par la méthode de Bradford en utilisant la BSA comme standard (Sigma Aldrich).

b. Mesure globale d'activité

Afin de préserver les échantillons pour la mesure d'activité sur gel, l'activité globale du protéasome n'a été mesurée que sur quelques échantillons issus de l'irradiation chronique qui présentaient les plus fortes concentrations protéiques. L'inhibition par le MG132 a notamment été testée.

Dans les échantillons, l'activité de type chymotrypsine a été testée en microplaque 384 puits en suivant la cinétique d'hydrolyse du peptide Suc-LLVY-AMC (Sigma Aldrich) pendant 30minutes à 37°C, en présence ou pas d'un inhibiteur du protéasome (MG132 ; Sigma Aldrich). Ainsi, à 15µg de protéines ajustées à 1,2µg/µl sont ajoutés 100µM de peptide suc-LLVY-AMC plus ou moins 20µM de MG132. La fluorescence émise a été mesurée pendant 30 mn à l'aide d'un lecteur de microplaque FLx800™ fluorescence spectrophotometer (Biotek Laboratories).

Sur la partie linéaire des courbes, les pentes ont ensuite été calculées pour chaque échantillon (avec ou sans MG132). L'activité du protéasome a ensuite été déterminée comme la différence entre l'activité mesurée dans les extraits dépourvus d'inhibiteur du protéasome et l'activité résiduelle en présence de MG132.

c. Electrophorèse en conditions natives

Les gels natifs 3,5-8% (acrylamide : bis acrylamide 37,5 :1) ont été préparés fraîchement avant chaque électrophorèse. La composition des gels natifs est présentée Tableau 12.

Tableau 12 : Composition d'un gel d'électrophorèse en conditions natives.

réactifs	Volume gel à 3.5%	Volume gel à 8%
Tris Borat	3mL	3mL
acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 30% : 37.5 :1)	1.75mL	4mL
1,4-dithiothreitol (DTT) 1M	15µL	15µL
Adénosine tri-phosphate (ATP) 100mM	150µL	150µL
Amonium PerSulfate (APS) 10%	120µL	120µL
TEMED QSP 15mL	12µL	12µL

Après polymérisation des gels, 40µg de protéines extraites en conditions natives et ajustées entre 1 et 2µg.µL⁻¹ sont supplémentées par 2µL de tampon de charge natif puis chargées sur gel. La migration a été réalisée en cuve d'électrophorèse Mini-Protean (Biorad) avec un tampon d'électrophorèse tris-borat ajusté à pH8 à 4°C selon le protocole de migration du manuel d'instruction « Mini-Protean Tetra vertical electrophoresis cell, rev. D » (Biorad). Une première étape de migration des protéines à lieu pendant 2h à 100V, puis une seconde pendant 2h30 à 150V.

Une fois la migration électrophorétique achevée, les gels sont démoulés puis incubés 2minutes sous agitation douce dans une solution de rinçage (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl₂; 10% glycerol (v/v), 1mM DTT, 1mM ATP). Après retrait de la solution de rinçage, les gels sont incubés 30minutes à 37°C dans une solution contenant 100µM de peptide suc-LLVY-AMC (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 5 mM MgCl₂; 10% glycerol (v/v), 1mM DTT, 1mM ATP, 100µM suc-LLVY-AMC). L'activité des 3 formes du protéasome est ensuite détectée pendant 15secondes sous une lampe UV à l'aide d'une G-Box (Fusion FX Vilber).

d. Westernblot

Le transfert des protéines du gel natif d'électrophorèse sur membrane a été réalisé en phase liquide, appelé « transfert humide », par le système « Mini Trans-Blot Cell » (Biorad). Le dispositif était lui-même placé dans une enceinte thermostatée à 4°C pour limiter l'échauffement de la cellule de transfert et l'éventuelle dégradation du matériel biologique. Ainsi, après 3 étapes de rinçage des gels dans une solution de TGS 10X pH 8,5 (Biorad), suivi d'une dernière étape de rinçage avec du TGS1X sous agitation douce à température ambiante, le transfert des protéines du gel sur membrane PVDF (0,22µm Merck Millipore) préalablement activée dans une solution de méthanol, est effectué à 40V sur la nuit à 4°C.

Une fois le transfert effectué, les sites d'interaction non-spécifiques entre la membrane et les anticorps sont bloqués en incubant la membrane dans une solution de TBS (Tris-base, NaCl ajustée à pH8)-0,1% tween et 0,5% BSA filtrée (Bovine serum albumin Sigma-Aldrich), durant 1h à température ambiante et sous agitation douce. Une solution contenant l'anticorps primaire, dilué 200 fois dans la solution de blocage des membranes (TBS-0,1%Tween-0,5%BSA) est ajoutée aux membranes ; l'incubation se fait sur la nuit, à 4°C. L'anticorps primaire utilisé ici est dirigé contre les sous-unités alpha 1-7 du protéasome 20S et est produit chez la souris (BML-PW8195 Enzolifesciences). Après retrait de la solution contenant l'anticorps primaire, et 3 rinçages des membranes dans la solution TBS-0,1%tween-0,5% BSA, elles sont incubées pendant 1h à température ambiante sous agitation douce dans une solution contenant l'anticorps secondaire dilué 10 000 fois dans la solution de blocage des membranes. L'anticorps secondaire qui est produit chez le lapin est dirigé contre l'anticorps primaire (anti-souris) (ab6728 rabbit anti-mouse IgG HL (HRP), abcam).

Après retrait de la solution contenant l'anticorps secondaire, les membranes sont rincées 3 fois dans la solution de blocage des membranes, 1 fois dans une solution de TBS-0,1% tween et une dernière fois dans une solution de TBS.

Afin de détecter les trois formes du protéasome (30S, 26S et 20S), les membranes sont incubées dans un réactif ECL (électrochimiluminescence) (Kit Immobilon Pierce) puis exposées 10 secondes en utilisant la méthode de chimiluminescence horseradish peroxydase (HRP) (Fusion FX Vilber). En raison d'un artéfact probablement dû au temps d'exposition trop court (car dilution de l'anticorps primaire trop faible) afin de révéler le signal en chimiluminescence, les formes 30S et 26S de certaines conditions d'exposition n'ont pu être quantifiées correctement. A l'avenir, il serait judicieux d'essayer une dilution au millième de l'anticorps primaire, afin de pouvoir allonger les temps d'expositions et ainsi obtenir un signal plus stable et quantifiable.

e. Analyse du signal

Les images correspondant aux signaux d'activité sur gel natif et aux niveaux d'expression du protéasome ont ensuite été analysées à l'aide du mode « 1D analysis » du logiciel Image Quant TL (GE Healthcare). Les intégrations ont été réalisées à l'aide de la fonction « manual baseline » du logiciel. Pour chacun des gels, un standard interne a été chargé sur une piste afin de normaliser le signal entre les différents gels et blots de manière à pouvoir comparer les différentes conditions d'expositions entre elles (Figure 31).

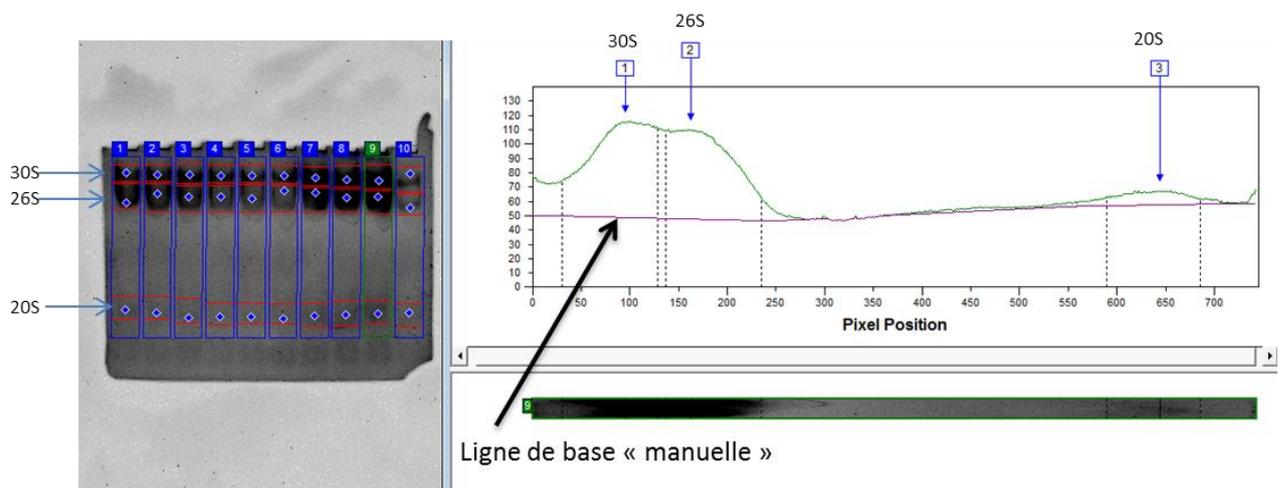


Figure 31 : Illustration de la méthode d'intégration avec le logiciel IQTL. A/ Signal d'activité issu de chacune des trois formes du protéasome et B/ intégration de chaque piste de gel par la fonction manual baseline du logiciel ; 1 correspond au signal du 30S, 2 correspond au signal du 26S et 3 correspond au signal du 20S.

V. Traitements statistiques et modélisation des données de reproduction

Toutes les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.2.4 et le logiciel RStudio environnement version 0.99.893 (RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>)

1. Modélisation des données de reproduction

Les données de reproduction (ici la ponte totale par individus et le succès d'éclosion) ont été utilisées pour établir une relation dose-réponse afin d'estimer les doses d'effet pour lesquelles une réduction de 50% de la ponte totale et du succès d'éclosion est observée (DE50). Les relations dose-réponse ont été modélisées à l'aide d'un modèle log-logistique à trois paramètres dont l'équation est la suivante :

$$y = \frac{d}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(e))]}$$

Avec :

b = pente au point d'inflexion de la courbe

d = limite haute de la réponse

e = dose correspondant à une variation de 50% de la réponse (DE50)

x = dose

y = réponse biologique

2. Traitements statistiques des données

La normalité (test Shapiro-Wilk) et l'homogénéité de la variance des données (test de Levene) ont été testées avant toute analyse statistique. Lorsque ces deux hypothèses n'ont pas été acceptées, une transformation logarithmique décimale a été appliquée. Les effets des traitements considérés ont été évalués à l'aide d'une ANOVA (one way) suivie d'une comparaison par paire de type post-hoc (test Dunnett et test Tukey). Le niveau de significativité (risque d'erreur α) a été fixé à 0,05.

Partie D : Résultats et discussion

Comme décrit dans la partie A de ce manuscrit, la reproduction est le paramètre individuel le plus radiosensible par rapport à la croissance et à la survie, que ce soit après irradiation aiguë ou chronique. Cependant les mécanismes associés ne sont pas complètement élucidés. L'objectif principal de ces travaux de thèse est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de radiotoxicité induits après irradiation gamma, et particulièrement en étudiant la contribution du protéome ; pour ce faire, une approche intégrée a été utilisée après irradiation aiguë et chronique. Au niveau individuel, la reproduction du nématode a été mesurée pour chaque mode d'exposition sur de larges gammes de doses.

Au niveau moléculaire, deux axes ont été mis en place, à savoir : i) mettre au point l'analyse de marqueurs protéiques (tels que les dommages aux protéines et leur dégradation) susceptibles d'être des marqueurs d'exposition aux rayonnements ionisants et ii) comparer ces marqueurs protéiques en plus de l'expression des protéines à d'autres marqueurs moléculaires (dommage à l'ADN, apoptose) et individuels (reproduction), afin d'identifier quels marqueurs sont les plus sensibles et précoces et de définir si les mécanismes moléculaires sont modulés différemment entre l'irradiation aiguë et chronique.

Parmi les marqueurs protéiques étudiés, la carbonylation des protéines est un marqueur de stress oxydant largement utilisé dans différents domaines [31], [204]. Cependant très peu d'articles décrivent précisément son utilisation chez *C. elegans*, ainsi un travail préliminaire sur le stade de vie de *C. elegans* à irradier et le temps de prélèvement post-irradiation a donc été nécessaire. Puis, le niveau de protéines carbonylées a été mesuré après irradiation aiguë en dessous de 200Gy et après irradiation chronique. Enfin, un essai de colocalisation de ces dommages avec les biomolécules susceptibles d'être carbonylées, *i.e.* ADN, lipides, protéines, a été réalisé au niveau de l'organisme entier. Une fois les dommages aux protéines déterminés, les processus cellulaires susceptibles de les éliminer ont été analysés. En particulier, l'activité et le niveau d'expression du protéasome ont été mesurés afin de caractériser les mécanismes d'élimination des protéines carbonylées après irradiation aiguë et chronique. Enfin, deux études protéomiques complémentaires, ont été utilisées afin d'établir un profil de modification du protéome suite à une irradiation, puis *in fine* de valider l'utilisation de biomarqueurs protéiques de l'irradiation.

L'ensemble des résultats acquis au niveau individuel et moléculaire après exposition aiguë puis après exposition chronique sont présentés dans cette partie. Le dernier chapitre est consacré à la synthèse et à la comparaison des résultats acquis pour ces deux modes d'exposition.

I. Résultats et discussion sur l'irradiation aiguë

1. Effets à l'échelle individuelle

La ponte totale (œufs non éclos + larves) par individus ainsi que le succès d'éclosion (survie des descendants issus de parents irradiés) ont été mesurés après irradiation aiguë multidose durant 8 jours afin de couvrir la totalité de la période de reproduction du nématode.

a. Ponte totale par individus

Les résultats ont été modélisés avec un modèle log-logistique. La Figure 32 ci-dessous correspond à la courbe dose-réponse de la ponte totale par individus chez le nématode en fonction de la dose d'irradiation aiguë reçue ; de 0 à 200Gy.

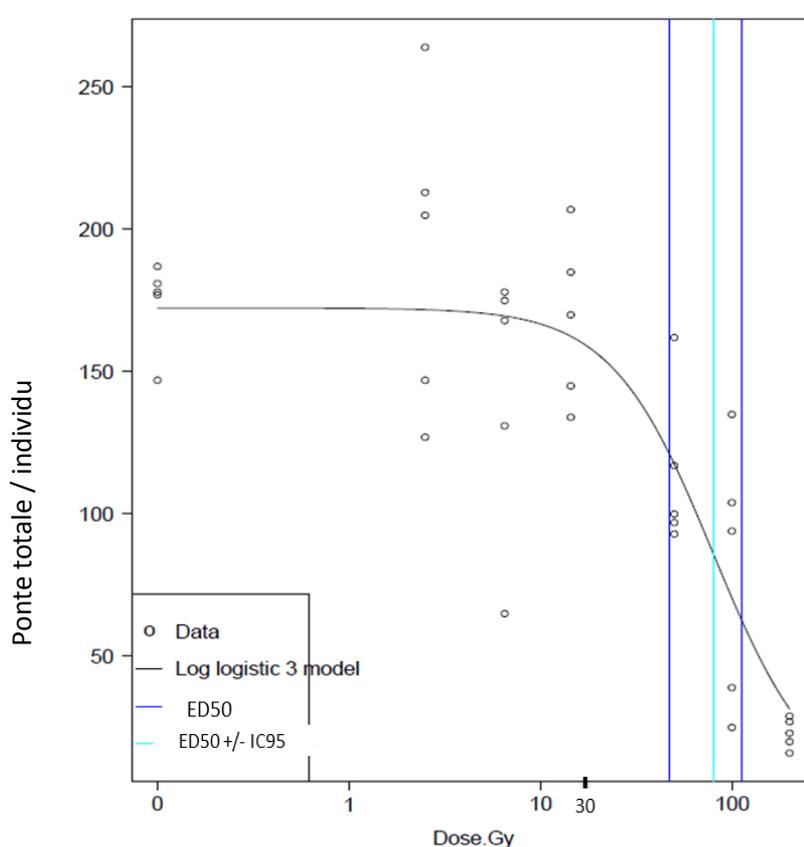


Figure 32: Courbe dose réponse de la ponte totale par individus en fonction de la dose reçue d'exposition aiguë (de 0 à 200Gy) chez *C. elegans* exposé au stade L4 (63h post synchronisation). Modélisation avec un modèle log-logistique (3 paramètres : $b= 1.63$, $d= 172.41$, $e= 79.83$). L'ED50 a été mesurée à 79,84 Gy (IC95 = [47,48 ; 112,19]).

L'ED50_{ponte totale par individus} (dose induisant 50% d'effets par rapport aux témoins) a été mesurée *via* l'utilisation d'un modèle log-logistique à 79,84 Gy (IC95 = [47,48 ; 112,19]). De plus, une diminution significative de la ponte totale par individus par rapport aux témoins a été observée à partir de 30Gy de manière dose-dépendante jusqu'à 200Gy.

Ces résultats concordent avec une précédente étude qui a montré que la ponte totale par individu était affecté à partir de 30Gy d'irradiation gamma aiguë [179].

b. Taux d'éclosion

La Figure 33 ci-dessous correspond à la courbe dose-réponse du succès d'éclosion chez le nématode en fonction de la dose d'irradiation aiguë reçue ; de 0 à 200Gy.

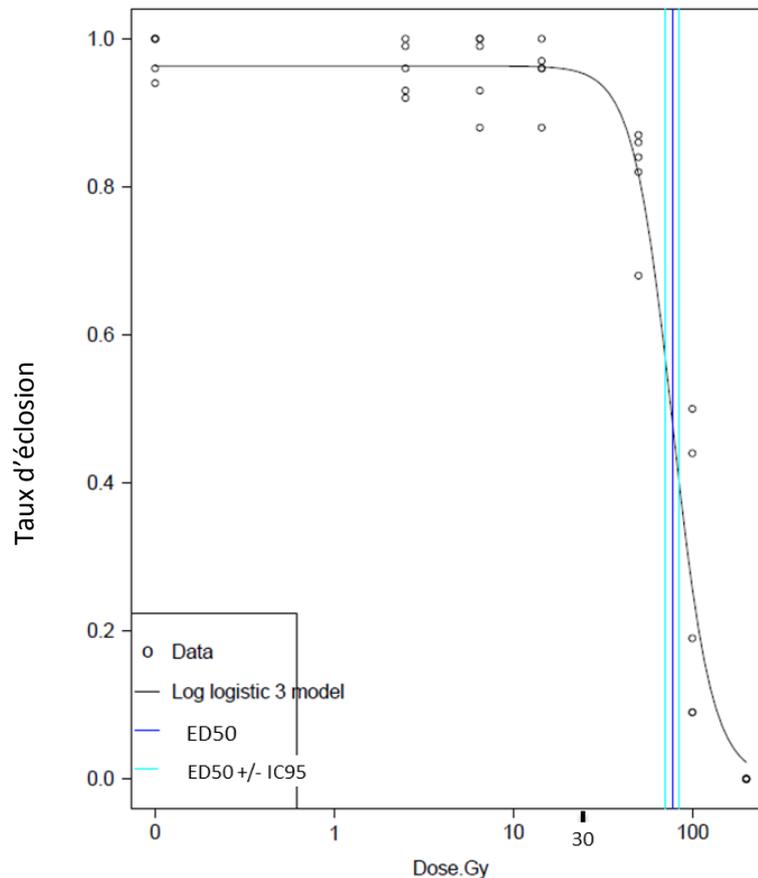


Figure 33 : Courbe dose réponse du succès d'éclosion des œufs pondus en fonction de la dose reçue d'exposition aiguë (de 0 à 200Gy) chez *C. elegans* exposé au stade L4 (63h post synchronisation). Modélisation avec un modèle log-logistique (3 paramètres: $b=3.94$, $d=0.96$, $e=77.40$). L'ED50 a été mesurée à 77,40 Gy (IC95 = [70,40 ; 84,42]).

L'ED50 succès d'éclosion a été calculée *via* l'utilisation d'un modèle log-logistique à 77,40 Gy ((IC95 = [70,40 ; 84,42])). De plus, une diminution du succès d'éclosion est observée à partir de 30Gy de manière dose-dépendante jusqu'à 200Gy. Ces résultats sur le succès d'éclosion de *C. elegans* après irradiation aiguë sont concordants avec la littérature. En effet, l'équipe de Takanami en 2000 a mis en évidence que la survie des embryons (capacité d'éclosion des œufs pondus par les parents irradiés) est impactée dès 40Gy d'irradiation gamma aiguë [179].

c. Discussion

Notre étude confirme que l'irradiation aiguë a un impact à la fois sur la capacité de ponte du nématode ainsi que sur le succès d'éclosion. Ces résultats suggèrent donc que la

gamétogénèse (impact sur la ponte totale) et l'embryogénèse (impact sur le succès d'éclosion) sont impactées après irradiation aiguë. D'autres études exposant des invertébrés à un rayonnement gamma (césium-137) ont montré que le succès d'éclosion de *Neanthes arenaceodentata* était affecté dès 0,5Gy d'irradiation aiguë, et que l'ED50 succès d'éclosion pour *Folsomia candida* et *Eisenia fetida* était de 21,9Gy et 11,1Gy, respectivement [117], [119], [134]. Ces résultats suggèrent donc que *C. elegans* est moins sensible aux rayonnements ionisants que ces autres invertébrés. Les auteurs des études précédemment citées ont émis l'hypothèse selon laquelle la réduction du succès d'éclosion pouvait résulter de mutations létales dans les gamètes en développement, ce qui affecterait la survie des embryons [134]. Cependant, la mort des ovocytes ou des spermatozoïdes résultant de mutations devrait affecter principalement le nombre de progénitures par individu, mais pas le succès d'éclosion. Une des éventuelles explications à la réduction du succès d'éclosion après irradiation aiguë serait donc l'induction de mutations létales induisant une augmentation de l'apoptose durant la phase d'embryogénèse précoce [179].

2. Effets sur le protéome

Dans ce chapitre sont présentés les effets observés après irradiation aiguë sur le niveau de carbonylation des protéines, l'activité du protéasome et l'expression des protéines.

Après les mises au point nécessaires, les résultats concernant les niveaux de protéines carbonylées chez le nématode ont été validés par deux méthodes complémentaires : i) marquage des carbonyles après extraction protéique, séparation, mesure par fluorescence et ii) marquage *in situ* des carbonyles [192], [201].

a. Mises au point des conditions expérimentales

La sensibilité du marqueur carbonylation des protéines a été évaluée sur la même gamme de dose que celle utilisée pour mesurer la reproduction incluant des doses en dessous desquelles aucun impact sur la reproduction de *C. elegans* n'a été observé. Comme décrit dans la partie A de ce manuscrit, le nématode possède un cycle de vie court, ce qui implique des variations métaboliques rapides en fonction de son stade de vie, et nécessite de définir le stade de vie le plus pertinent pour faire les mesures de carbonylation. Ainsi, le niveau de protéines carbonylées a été mesuré à différents stades de vie, permettant d'identifier le plus faible niveau de carbonylation en conditions basales et ainsi d'améliorer la sensibilité de ce marqueur pour les expériences d'irradiations futures. En outre, la cinétique de production des protéines carbonylées après irradiation aiguë est très peu documentée et le temps optimum auquel l'analyse doit être faite est peu décrit. Une cinétique de production des protéines carbonylées a donc été mesurée après irradiation aiguë à deux doses et débits de doses différents afin de déterminer un temps optimum post-irradiation de prélèvement et d'analyse des protéines carbonylées (résultante de la production (proportionnelle aux ERO) et de leur élimination (en lien avec l'activité protéolytique cellulaire)). Une fois les conditions expérimentales optimisées (stade de vie à irradier et temps post-irradiation optimal

d'analyse), celles-ci ont ensuite été appliquées à l'ensemble des analyses (activité protéolytique, expression des protéines, dommages à l'ADN) afin de pouvoir obtenir une cartographie des dommages moléculaires.

Les résultats de ces expériences sont présentés ci-après.

i. Stade de vie d'étude

Le cycle de vie du nématode est de 3 jours à 20°C, et au fil de ces trois jours il change 6 fois de stade de vie : stade œuf, stade L1, L2, L3, L4, L4-JA et adulte gravide. Sachant que ces travaux de thèse visent à comparer les effets de l'irradiation aiguë (courte) vs chronique (à partir du stade œuf et sur une période conséquente de la vie de l'animal), seuls les stades L3, L4 et L4-JA ont été testés. Le stade gravide n'a pas été testé en raison de la présence d'œufs dans son abdomen risquant d'apporter de la variabilité aux mesures. La Figure 34 présente les résultats du niveau de protéines carbonylées en fonction du stade de vie de *C. elegans*.

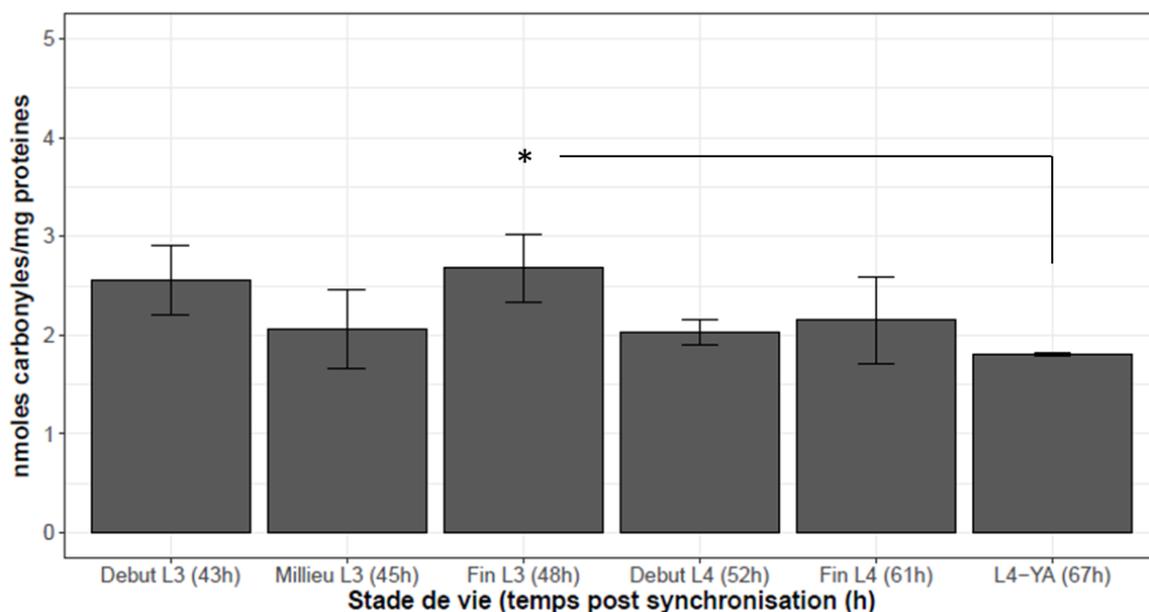


Figure 34 : Niveau basal du taux de protéines carbonylées chez *C. elegans* en fonction des différents stades de vie (L3, L4 et L4-JA). Les temps entre parenthèses correspondent aux temps post synchronisation (en heures). Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3 heures, puis collectés à différents temps post-synchronisation. N=3 (pool de 1000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau de protéines carbonylées (nmol de carbonyles/mg de protéines) ± écartype standard. Les différences statistiques significatives entre L4-JA (67h post-synchronisation) et Fin de L3 (48h post-synchronisation) sont représentées (test de Tukey) : *P<0.05.

La moyenne du niveau de protéines carbonylées sur les différents stades de vies testés est de 2,2ng de carbonyles par mg de protéines et varie entre 2,6 (±0,3) et 1,8 (±0,01) ng de carbonyles par mg de protéines. Les différences de niveaux sont faibles (< 30%). Seule une diminution significative du niveau de protéines carbonylées a été observée entre le stade L3 (48h post-synchronisation) et le stade L4-JA (67h post-synchronisation) (*p. value* =0,03). Une tendance à la diminution du niveau de protéines carbonylées est également observée au stade début de L4 (52h post-synchronisation) par rapport à la fin du stade L3 (48h post

synchronisation) ($p. value=0,1$). Le niveau de protéines carbonylées mesuré est la résultante entre leur production (proportionnelle aux ERO) et leur élimination (en lien avec l'activité protéolytique cellulaire), ainsi les différences observées sur le niveau de protéines carbonylées peuvent être expliquées par une différence d'activité mitochondriale entre les différents stades de vie du nématode.

Le stade L3 est marqué par une extension rapide du bras de gonade, ce qui signifie que les cellules ont un besoin accru en énergie durant ce stade de vie [173]. Le stade L3 est le stade de vie pour lequel les mitochondries sont les plus nombreuses. Or, celles-ci constituent également un stock d'ERO, qui pourraient éventuellement oxyder les protéines et donc produire des protéines carbonylées [205], [206]. A l'inverse, au stade L4-JA les divisions des cellules somatiques cessent et les gonades sont complètement établies et l'activité mitochondriale est moindre.

Le faible niveau de protéines carbonylées au stade L4-JA peut donc être lié à cette production moindre d'ERO mais aussi à une activité protéolytique accrue.

En conclusion, le stade de vie possédant le niveau basal et la variabilité de protéines carbonylées les plus faibles est le stade L4-JA. De plus, au laboratoire, le stade L4-JA est celui sur lequel la mesure de nombreux paramètres (apoptose, nombre de spermatozoïdes, reproduction) a précédemment été réalisée [143]. Par conséquent, toutes les expositions ont été réalisées au stade L4-JA.

ii. Temps de prélèvement post-irradiation

La cinétique de production des protéines carbonylées après irradiation aiguë a été mesurée sur deux doses et deux débits de doses différents. La justification du choix de ces doses est donnée ci-après.

- 2,5 Gy (débit de dose de $1\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$): Un des objectifs de ce projet de thèse est de comparer les modes d'irradiation aiguë et chronique. 2.5 Gy est une dose cumulée très étudiée lors de précédentes irradiations chroniques réalisées au laboratoire (du stade œuf jusqu'au stade L4-JA) (débit de dose de $37,2\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ [143]).
- 75 Gy ($15\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$): Radman et collaborateurs ayant démontré qu'à forte dose d'irradiation aiguë, la baisse du succès d'éclosion chez *C. elegans* était corrélée à une augmentation de protéines carbonylées [18], la seconde dose d'étude correspond à l'ED50_{succès d'éclosion} des œufs pondus par les nématodes exposés aux rayonnements gamma.

Les taux de protéines carbonylées varient en fonction du temps et des stades de développement du nématode (figure 3). Par conséquent les irradiations ont été réalisées au stade L4-JA avec des nématodes synchronisés le plus finement possible (sur 3h) mais également sur des périodes d'irradiation permettant aux nématodes de rester au même stade de vie pour minimiser la variabilité due au développement de l'organisme. Un seul contrôle a été réalisé (au temps 1h30 post-irradiation) pour l'ensemble des points cinétiques. Pour déterminer les inductions observées, les niveaux de protéines carbonylées

après irradiation ont été pondérés par les niveaux de ce contrôle pour chaque temps post-irradiation. Les résultats de cette analyse sont donnés Tableau 13.

Tableau 13: Cinétique de production des protéines carbonylées après irradiation aiguë à 2,5Gy (1Gy.min⁻¹) et à 75Gy(15Gy.min⁻¹). Les nématodes utilisés dans cette étude ont été synchronisés sur 3h et collectés à différents temps post-irradiation. N=3 (pool de 1000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau de protéines carbonylées relatif au contrôle (nmoles de carbonyles/mg de protéines) ± écartype standard. Les différences statistiques significatives sont représentées (test Tukey) : *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001. NA signifie « Données non disponibles ».**

Temps post-irradiation (h)	contrôle 1h30	1h	1h30	2h	2h40	3h	4h	5h	6h
2,5Gy	1±0,1	1,2±0,2	0,9±0,1	1,6±0,4	NA	2,0±0,7*	NA	1,9±0,7	1,3±0,2
75Gy	1±0,2	1,2±0,2	0,8±0,2	NA	2,0±0,2***	NA	1,9±0,1***	2,1±0,3***	NA

A 2,5Gy une augmentation significative du niveau de protéines carbonylées par rapport aux témoins a été observée à 3h post-irradiation (*p. value* = 0,03). Cette augmentation semble être corrigée à 6 heures, mais l'écart type élevé à 3 heures post-irradiation empêche la validation statistique de cette conclusion.

A 75Gy, une augmentation significative du niveau de protéines carbonylées est observée à 2h40, 4h et 5h post irradiation par rapport aux témoins (*p. values* respectives = 4×10^{-5} ; $3,8 \times 10^{-5}$; $1,1 \times 10^{-5}$).

Il est intéressant de noter que pour les deux doses étudiées, l'induction de protéines carbonylées est très similaire (2,0±0,7 et 2,0±0,2 respectivement pour 2,5Gy à 3h00 et 75Gy à 2h40), et ce malgré la différence de dose (facteur 30) et de débit de dose (facteur 15). Ceci suggère que l'induction de protéines carbonylées après irradiation aiguë n'est pas linéaire en fonction de la dose ou bien que dès 2,5Gy un seuil d'induction de protéines carbonylées est atteint.

Le niveau maximum de protéines carbonylées (résultante entre la production et la dégradation des protéines carbonylées) est donc compris entre 2h40 et 5h post irradiation. En conclusion, le temps optimal d'analyse des protéines carbonylées a été choisi à 3h post irradiation puisque ce temps correspond au niveau maximum de protéines carbonylées pour les deux conditions testées.

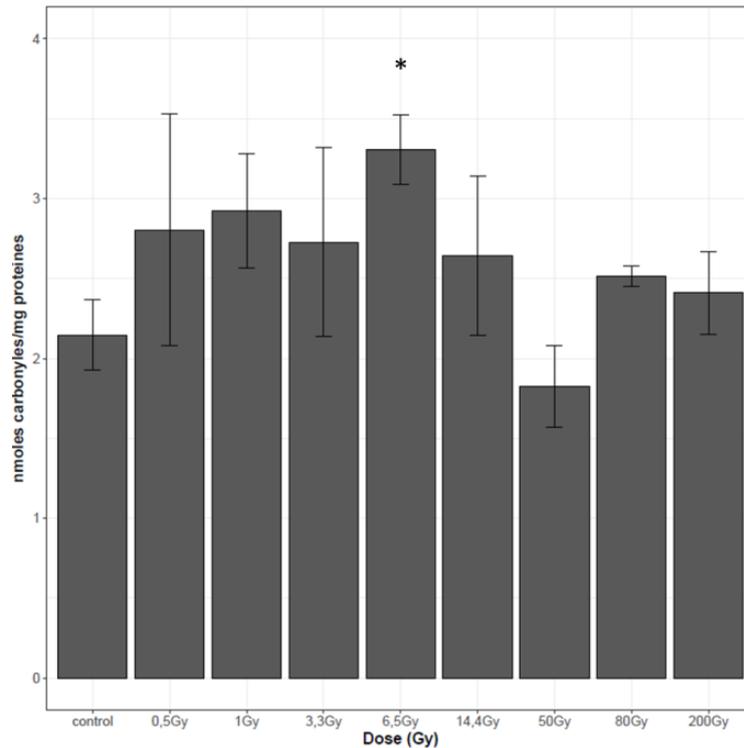
b. Dommages aux protéines-Etude de la carbonylation

i. Courbe dose réponse du niveau global de protéines carbonylées

Une fois les conditions expérimentales optimales déterminées (stade de vie à irradier, temps de prélèvements post-irradiation), les nématodes au stade L4-JA ont été exposés de 0,5 jusqu'à 200Gy d'irradiation aiguë. Les échantillons ont ensuite été prélevés à 3h post-irradiation, et les niveaux de protéines carbonylées ont été mesurés pour chacune des doses.

Les résultats de cette étude sont présentés Figure 35.

A



B

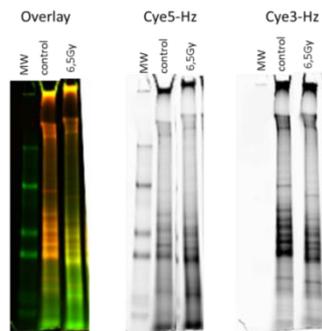


Figure 35 : A/Courbe dose-réponse du niveau de protéines carbonylées après irradiation gamma aiguë de 0,5Gy à 200Gy. Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 200Gy (1Gy.min⁻¹ et 15Gy.min⁻¹) et collectés à 3heures post-irradiation. N=3 (pool de 1000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau de protéines carbonylées relatif aux contrôles (nmoles de carbonyles/mg de protéines) ± écartype standard. Les différences statistiques significatives entre 6,5Gy et le témoin sont représentées (test de Dunnet) : *P<0.05. B/Signal obtenu sur gel. Overlay correspond à la superposition des deux canaux : cye5-Hz et cye3-NHS ; cye5-Hz correspond au signal des carbonyles et cye3-NHS correspond au signal des protéines totales. Pour chacune des images, le signal du marqueur de poids moléculaire est situé à gauche, le signal issu des nématodes contrôles est situé au milieu ; et le signal issu des nématodes exposés à 6,5Gy d'irradiation aiguë est situé à droite.

La Figure 35 montre une augmentation significative du niveau global de protéines carbonylées à 6,5Gy par rapport aux contrôles (*p. value* = 0,01), sans relation linéaire entre le niveau de protéines carbonylées et les doses d'irradiation aiguë testées. De plus, les taux d'induction de protéines carbonylées à 3,3Gy et 80Gy ($1,2 \pm 0,3$ et $1,2 \pm 0,02$ respectivement) sont différents de ceux présentés dans la partie cinétique pour des doses similaires (2,5 et 75Gy) ($2 \pm 0,7$ et $2 \pm 0,2$ respectivement). Ceci peut s'expliquer par l'absence de relation linéaire qui pourrait être associée à une efficacité différente des systèmes de protéolyse.

Comme présenté en introduction, Krisko *et al* ont déjà mesuré le niveau de protéines carbonylées directement après une irradiation aiguë de 200Gy à 6000Gy sur *C. elegans* (débits de doses de 26 et 38Gy.min⁻¹) [18]. Dans cette étude, à 200Gy, le taux d'induction par rapport aux témoins était de 3,3, puis augmentait jusqu'à atteindre un plateau de 4,6 à partir de 900Gy jusqu'à 6000Gy. Cette augmentation drastique du taux de protéines carbonylées pourrait être due à une saturation des mécanismes de défense contre les radicaux libres ou des systèmes de protéolyse. Dans notre étude, nous avons montré que l'induction de protéines carbonylées après une irradiation aiguë de 0,5 à 200 Gy était faible (1,3 ± 0,3 à 0,5Gy, 1,1 ± 0,1 à 200Gy). Cette différence avec Krisko et collaborateurs pourrait être due à un mécanisme efficace de dégradation des protéines carbonylées jusqu'à 200Gy, actif à des débits de dose de 1 et 15Gy.min⁻¹, inactif aux débits de doses utilisés par Krisko *et al*, 26 et 38Gy.min⁻¹. En effet, une étude a préalablement montré que l'activité du protéasome est significativement impactée 15minutes après une irradiation aiguë à 10Gy (débit de dose de 5Gy.min⁻¹), puis est progressivement récupérée jusqu'à 24h post-irradiation [89]. La légère induction de protéines carbonylées de 0,5 à 200 Gy observée dans notre étude pourrait donc être due à la récupération progressive de l'activité du protéasome à 3 heures post-irradiation. En outre, dans notre étude il ne semble pas y avoir de différence d'induction des protéines carbonylées entre 1 et 15Gy.min⁻¹. 26Gy.min⁻¹ pourrait être un débit de dose « seuil » pour lesquels l'activité du protéasome (ou d'autres systèmes de protéolyse cellulaire) est inhibée mais aucune donnée de la littérature ne peut étayer ce propos.

En conclusion sur le niveau global de protéines carbonylées, les résultats n'ont montré aucune corrélation dose-dépendante entre les niveaux de protéines carbonylées et la dose (entre 0,5 et 200Gy). En regard des résultats sur la reproduction, *i.e.* ponte totale par individu ainsi que succès d'éclosion impactés dès 30Gy et de manière dose-dépendante, le niveau de protéines carbonylées ne semble pas pouvoir directement expliquer les effets observés.

ii. Nature des protéines carbonylées après irradiation aiguë multidose

Au vu des résultats présentés ci-dessus, le niveau global de protéines carbonylées ne semble pas être un marqueur sensible et/ou précoce des effets de l'irradiation aiguë sur *C. elegans*. Cependant, en fonction de la fonction biologique des protéines carbonylées, il est possible que la carbonylation de certaines protéines après irradiation aiguë puisse avoir un impact sur la reproduction, comme observé dans notre étude. Des investigations plus fines ont été effectuées pour rechercher un lien avec la diminution de la reproduction, observée à partir de 30Gy chez *C. elegans* (Figure 32). L'analyse de l'expression et de la carbonylation différentielle des protéines après irradiation aiguë chez *C. elegans* a été réalisée par la méthodologie 2D-oxyDIGE. Une première expérience a été réalisée sur une dose pour laquelle aucun impact sur la reproduction n'avait été détecté (2,5Gy). Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Medils (MEDiterranean Institute for Life Science-Split-Croatie). Les résultats issus de cette expérience sont toujours en cours d'analyse.

Une expérience 2D-oxyDIGE a été menée en parallèle sur un pool d'extraits protéiques pour chacune des doses : 0,5, 1, 3,3, 6,5, 14,4, 50, 80 et 200Gy.

Parmi les 1507 spots détectés, 58 ont été considérés comme différemment carbonylés/exprimés après irradiation aiguë multidose. La position sur gel d'électrophorèse 2D des spots de protéines variantes entre les différents groupes est présentée ci-après en Figure 36.

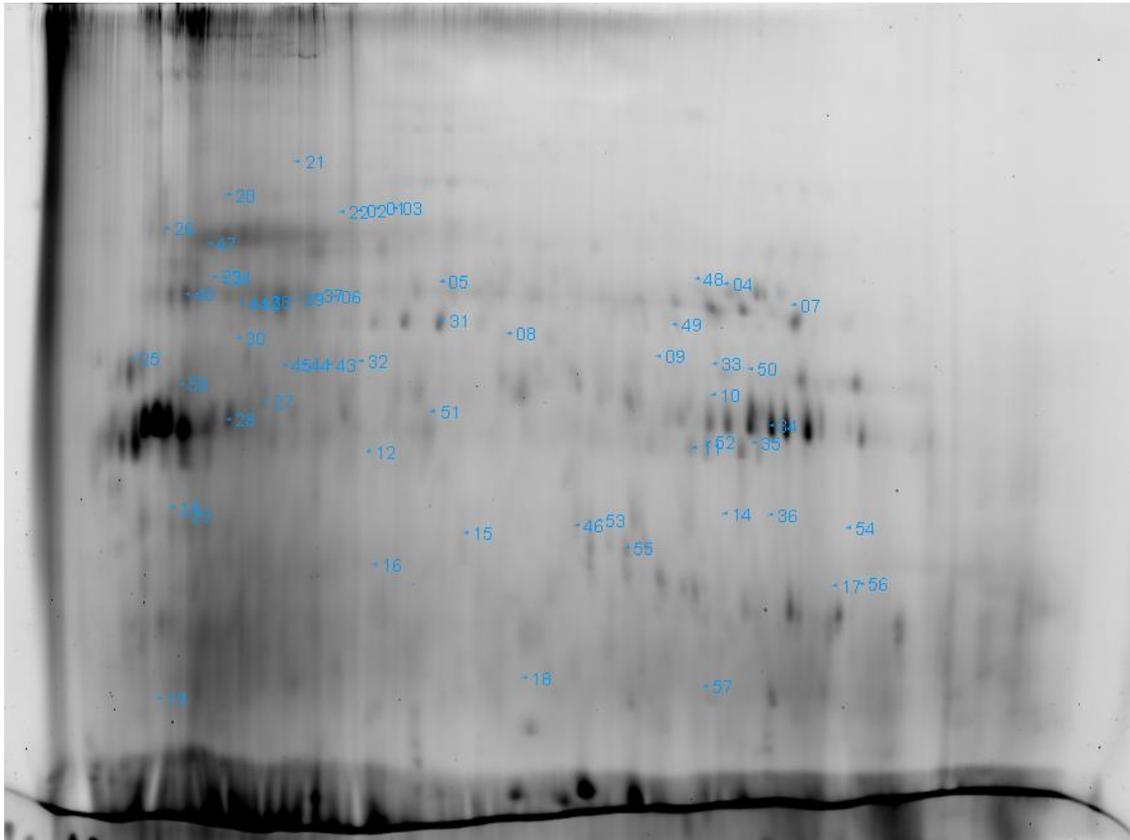


Figure 36 : Gel d'électrophorèse 2D-oxyDIGE. Illustration des 58 spots d'intérêt différemment carbonylés et/ou exprimés (annotés en bleu) analysés avec le logiciel delta2D.

Le Tableau 14 représente les résultats de l'analyse 2D-OxyDIGE *via* le logiciel Delta-2D.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des spots de protéines variants (carbonylés et total) entre les différentes conditions. Les cases surlignées en jaune signifient que le spot de protéine est variant à la fois en carbonylation et en total. C correspond au signal carbonyle et T correspond au signal protéine totale. Les valeurs correspondent au ratio d'intensité de chacun des spots de protéine variant.

spot ID	0,5Gy / contrôle		1Gy / contrôle		3,3Gy / contrôle		6,5Gy / contrôle		14,5Gy / contrôle		50Gy / contrôle		80Gy / contrôle		200Gy / contrôle	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
1	1,70	0,36		34,44	2,10	26,24		28,02	7,27	1,75	9,50			23,67	5,95	
2		0,28	0,36	5,34	0,37	4,49	0,04	3,71	3,89		6,43	0,14		4,28	2,70	0,45
3	1,82	0,36	0,69	4,80		2,72		5,32	4,92	0,00	6,50	0,22		5,24	3,74	0,00
4	1,59	0,48		3,46		2,93		1,99		1,94						1,99
5			2,40	1,53				2,07	3,96	4,57	3,89		1,94	1,60	2,56	7,73
6	1,69	1,75		3,57	0,67	2,17	1,71	2,09	3,15		1,83			2,55	2,42	
7	1,62		0,70	0,32	0,14		0,43	1,52		2,44	0,33	0,14		0,16		4,00
8		0,04	0,44	12,96	0,56	14,21		14,07	1,72	3,75		4,95	0,38	20,00	1,95	5,52
9		5,23		48,70	0,33	8,66	0,04	18,82		0,00		107,55	2,09	94,31	1,76	18,13
10		0,39	0,74		0,64	0,38	0,30	0,14	3,00		4,64	0,49	1,73	0,33		0,48
11	1,59		6,58	0,13		2,35		2,43						2,04		
12		1,92	4,99	6,13	5,03	24,63	6,05	21,18		10,83		4,00	2,24	12,17		24,26
13		3,81	2,98		0,59	4,94		2,18	3,31	2,74	2,96	8,12		3,39	1,88	9,79
14	1,62	46,33	4,86	1323,58		604,05		17,15		95,87		7238,48		2445,44		698,05
15		0,00	0,62	12,42	0,47	0,29		0,26		0,07	3,34	0,41	6,47	0,27	2,09	
16		0,04		4,87	0,30	29,32	0,03	32,75		28,55		10,81		13,36		8,32
17		0,49	1,55	2,57	0,70	0,19		0,47				4,85		3,76		3,10
18	1,78	2,57	3,97			0,40		0,33				9,31		0,23		0,47
19		0,00	0,59	49,35	1,89	0,00	2,84	2,09		0,05	2,53	104,99		0,00		27,41
20	0,34	0,49	0,13	4,41		1,80		3,33		0,31		0,09		2,54		0,05
21		3,94		10,77		24,21	1,90	25,93	0,39	7,79		0,00	2,65			
22	2,28	0,44	54,19	21,33	8,08	23,19	4,61	23,80	17,86	1,83	10,81	0,35	65,21	18,26	15,75	1,72
23	9,96	1,84	1,88	2,35	10,20	3,51		2,57			3,08	1,59	4,13	3,34	3,52	4,39
24	1,61	2,57	2,57	3,48		4,10	2,10	3,92	1,53		5,21		1,58	4,83	2,09	6,34
25	2,28	1,51	1,95	0,00	1,90	0,00		0,00	3,39	1,77	2,88		3,17	0,00		
26	2,05	1,61	3,55	0,00	0,36	0,06		0,00		0,44	1,86	0,45	0,20		0,17	
27	0,26	0,07	0,73													0,32
28	1,92		5,00													
29		3,08	9,88	0,32	0,63	2,82	0,26		0,30	2,73	2,27	3,15		1,95	3,58	4,16
30	4,56	0,05	6,07	182,40		55,79		89,24		22,34		0,25		61,49		
31	0,25		0,27	1,80					4,46				1,57	2,11	2,07	
32	2,52		6,16	16,62		20,43		26,08		3,06				9,44		1,80
33	0,45		0,69	9,31	0,12		0,04	0,04	0,24	0,42	3,03	14,98	2,05	0,15		
34			0,49	0,12	0,43	0,38	0,44	0,27			0,02	0,02	0,18		0,14	
35	0,37			0,50				1,58				0,38		1,77		1,80
36	0,00		1,85	1,94		7,65	1,66	3,16	0,00	7,31	0,01	14,81	0,04	5,84	0,46	
37				1,80						0,47		0,32		1,89		
38	1,50		4,86	2,07	3,57	1,71	3,12		5,49	0,42		0,13	0,01	2,63	1,66	
39			1,73	1,76	0,47		0,01		14,40		23,04	0,29			3,69	0,39
40			0,57	0,32	0,31	0,33	0,38	0,23	0,42		0,31			0,35		
41			1,60	3,94		3,27		2,80			0,45	0,19	2,12	2,02		0,14
42				3,43		2,70		2,45				0,27		2,82		0,34
43				5,84	1,64	7,19	1,56	7,75		0,20		0,10		2,50		0,33
44	1,93			10,91	2,25	19,44		14,30		0,38		0,26	2,10	7,03	1,63	
45	2,01			13,90	1,92	38,49	1,59	20,52	0,48	3,87		2,01	2,27	3,19		0,22
46			0,57				0,27		0,39		0,48	0,42		2,80		
47	2,43		0,04		0,00		0,00	1,63	5,82		6,94	0,48	0,01	0,17	1,96	
48			2,17	3,41			1,88								0,17	
49	2,63		0,00		0,04		0,00		2,95				0,06		2,58	
50				9,69							2,45	0,47		0,48		
51				2,10	2,72						0,37			0,25		
52	0,10		0,55	0,00	0,56				0,42							
53			4,93	0,02	4,87		6,28						2,52		3,19	
54			5,98		7,14		7,59				2,38		4,40		2,88	
55	4,68		0,48	1,63	6,33		1,70		0,42		1,93		1,65		2,88	
56	0,50		2,82	337,98	0,27						0,49				0,18	
57	2,61		0,23													
58			3,6	0,19	12,4		9,2		3,9		7,8					
total spots	31	26	45	48	34	36	28	39	26	28	31	35	25	40	28	28

Les résultats de cette analyse montrent que quelle que soit la dose délivrée, le nombre de protéines dont le niveau de carbonylation varie par rapport aux témoins est équivalent (entre 25 et 31), excepté pour la condition d'exposition 1Gy pour lequel 45 protéines sont différemment carbonylées par rapport aux témoins. Parmi ces protéines carbonylées, 4 sont retrouvées pour chacune des 8 conditions d'exposition (N°22, 47, 49 et 55). De plus, de manière générale, il existe plus de spots de protéines sur-carbonylés chez les nématodes exposés aux rayonnements gamma par rapport aux contrôles, indépendamment de l'expression des protéines excepté pour 0,5 ; 1 et 3,3Gy.

En revanche il semblerait que le nombre de protéines différemment exprimées par rapport aux témoins ne soit pas équivalent entre les doses (entre 26 et 48). Cependant, l'expression de 7 protéines est variée pour chacune des conditions d'exposition (N°3, 8, 9, 12, 16, 20 et 22). De manière générale, il existe plus de protéines sur-exprimées par rapport aux contrôles, excepté pour 0,5 et 50Gy.

Cependant, il est notable que la variation du carbonylome et du protéome n'est pas proportionnel à la dose d'irradiation aiguë. Pour le carbonylome, ceci est en accord avec les résultats précédents où il a été démontré que le niveau global de protéines carbonylées n'est pas linéaire en fonction de la dose délivrée après exposition aiguë.

Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec beaucoup de précaution, car comme souligné dans la partie C de ce manuscrit, aucun test statistique n'a pu être réalisé. De plus, aucune identification n'a pu être réalisée.

c. Activité du protéasome

Le niveau de protéines carbonylées est également dépendant de la capacité du protéasome à éliminer les protéines modifiées. Les activités des 3 formes du protéasome (30S, 26S et 20S) ont été mesurées sur gel natif après irradiation de *C. elegans* à des doses comprises entre 0,5 et 200Gy. Les résultats sont présentés en Figure 37A. La Figure 37B représente le signal d'activité des 3 formes du protéasome obtenu sur gel natif ainsi que le signal de leur niveau d'expression, obtenu après transfert et immunomarquage, pour les nématodes témoins et pour les nématodes exposés à 1Gy d'irradiation aiguë.

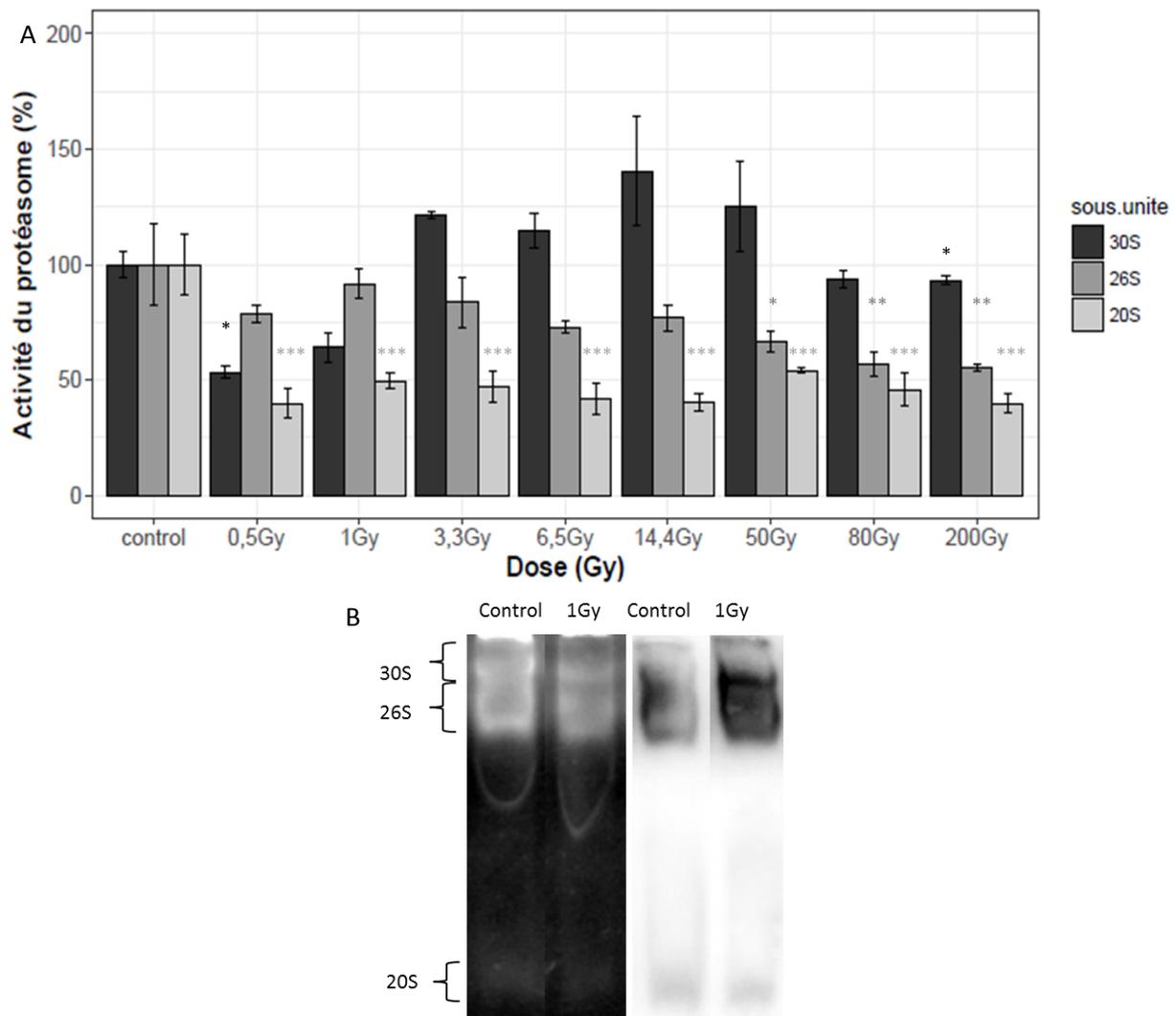


Figure 37 : A/Courbe dose-réponse de l'activité du protéasome 30S (histogramme noir), 26S (histogramme gris foncé) et 20S (histogramme gris clair) après irradiation gamma aiguë de 0,5Gy à 200Gy. Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 200Gy (1Gy.min⁻¹ et 15Gy.min⁻¹) et collectés à 3heures post-irradiation. N=3 (pool de 3000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne de l'activité du protéasome relatif aux témoins (% d'activité) ± erreur type de la moyenne. Les différences statistiques significatives sont représentées (test de Dunnet) : *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. B/ Electrophorèse sur gel natif, suivi par la mesure sur gel de l'activité des protéasomes 30S, 26S et 20S (panel de gauche) et niveaux d'expression des protéasomes 30S 26S et 20S par Westernblot (panel de droite). Pour chaque ensemble d'images, à gauche : Signal issu des nématodes témoins (définis comme 100% d'activité) et à droite : signal issus des nématodes exposés à 1Gy d'irradiation aiguë.

Les résultats de cette étude sur l'activité du protéasome après irradiation aiguë multidose montrent que globalement la modulation des activités des 3 formes du protéasome n'est pas dose-dépendante.

L'activité du protéasome 30S, en % d'activité par rapport aux témoins, est significativement diminuée à 0,5Gy (baisse de 46% de l'activité par rapport aux témoins) et 200Gy (baisse de

19%). Pour les autres doses en revanche, l'activité du 30S n'est pas significativement impactée par rapport aux témoins.

L'activité du protéasome 26S a tendance à diminuer de manière linéaire en fonction de la dose dès 0,5Gy (entre 7% et 30% de baisse d'activité par rapport aux témoins). De plus, elle est significativement réduite dès 50Gy et ce, de manière linéaire jusqu'à 200Gy par rapport aux nématodes témoins.

Enfin, l'activité du protéasome 20S est significativement diminuée à partir de 0,5Gy de manière non-dose-dépendante jusqu'à 200Gy par rapport aux nématodes témoins (entre 30% et 57% de baisse d'activité).

Le protéasome 20S semble donc être le plus impacté par l'irradiation aiguë puisque son activité diminue significativement dès 0,5Gy.

Après la mesure de l'activité du protéasome sur gel natif, une analyse des niveaux d'expression du protéasome a été réalisée par Western Blot. En raison d'un problème de révélation des membranes par chimiluminescence sur deux des trois contrôles des sous-unités 30S et 26S, seuls les niveaux d'expression de la sous-unité 20S après irradiation aiguë multidoses ont pu être normalisés par rapport aux témoins 20S. Les résultats issus de cette analyse sont présentés en Figure 38A et montrent qu'il n'y a pas d'impact significatif sur le niveau d'expression du protéasome 20S après irradiation aiguë de 0,5 à 200Gy par rapport aux nématodes témoins. Les niveaux d'expression des protéasomes 30/26S ont également été analysés, les différentes conditions d'irradiation ont été comparées en excluant les conditions contrôles car elles n'étaient pas quantifiables. Les résultats (Figure 38B) ont montré que, contrairement au protéasome 20S, les niveaux d'expression des formes 30S et 26S du protéasome ne semblaient pas modulés par l'irradiation aiguë, cependant il existe une diminution significative de leurs niveaux d'expression à partir de 80Gy par rapport à 0,5Gy.

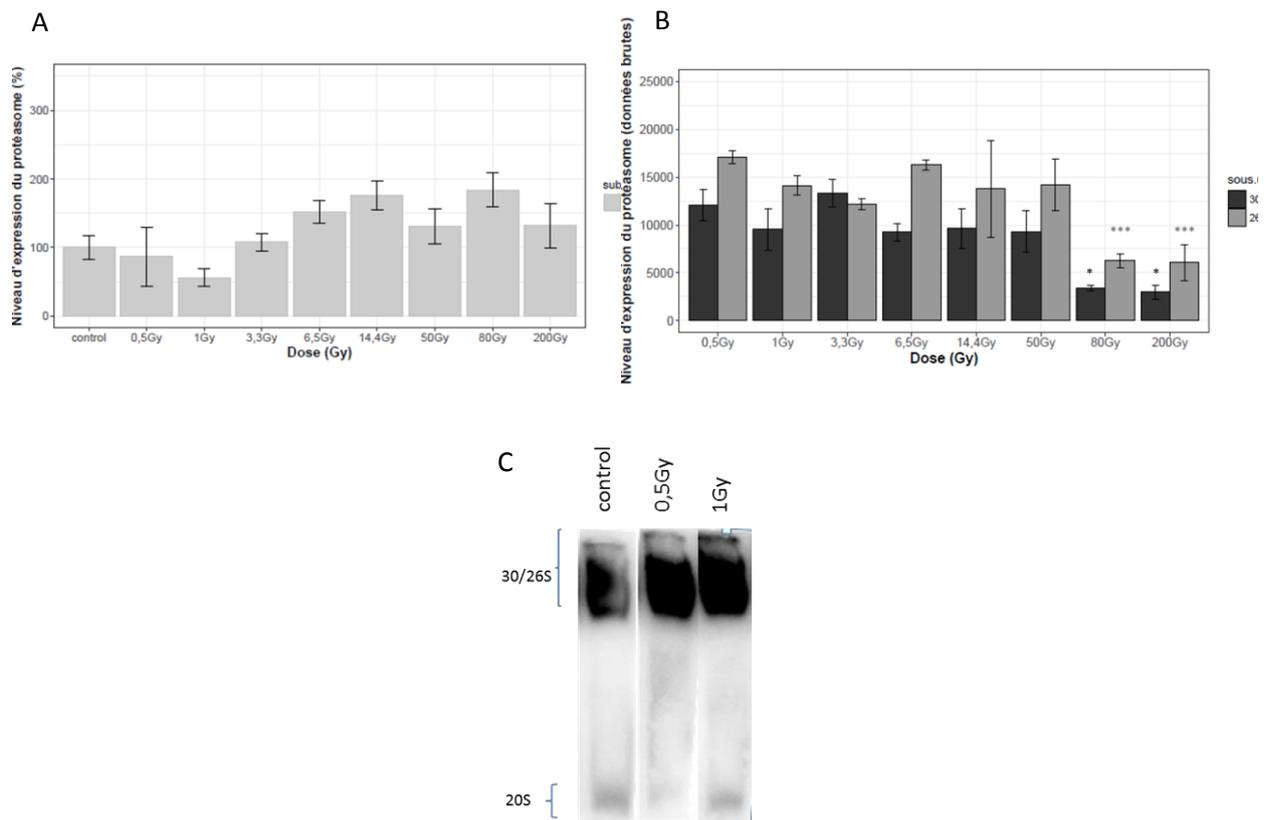


Figure 38 : A/ Courbe dose-réponse des niveaux d'expression du protéasome 20S après irradiation gamma aiguë de 0,5Gy à 200Gy. Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 200Gy (1Gy.min⁻¹ et 15Gy.min⁻¹) et collectés à 3heures post-irradiation. N=3 (pool de 3000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau d'expression du 20S relatif aux témoins (% de niveau d'expression) ± erreur type de la moyenne. B/ Courbe dose-réponse des niveaux d'expression des protéasomes 30S et 26S après irradiation gamma aiguë de 0,5Gy à 200Gy. N=3 (pool de 3000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau d'expression du 30S et 26S ± erreur type de la moyenne. C/ Niveaux d'expression des protéasomes 30S 26S et 20S par Westernblot. Sur le panel de droite : Signal issu des 3 protéasomes pour les nématodes témoins (définis comme 100% d'expression pour le 20S) ; Sur le panel du milieu : Signal issu des 3 protéasomes pour les nématodes exposés à 0,5Gy et sur le panel de gauche : signal issu des 3 protéasomes pour les nématodes exposés à 1Gy d'irradiation aiguë.

En conclusion, le comportement des 3 formes du protéasome semble distinct.

Alors que les formes ATP/Ubiquitine dépendantes du protéasome (30S et 26S), reflet de l'activité globale du protéasome de par leur abondance, semblent peu impactées (mis à part l'activité du 30S à 0,5Gy) aux doses les plus faibles, leur activité ainsi que leur expression sont diminuées à forte dose. Identique sur le plan de l'expression, ce résultat est différent de celui trouvé par Pervan et collaborateurs sur cellules humaines de carcinome prostatique, montrant que l'activité globale du protéasome était impactée dès 2Gy (5Gy.min⁻¹) à 3h post irradiation aiguë et ce sans relation dose-dépendante [89]. Cette différence peut être expliquée par l'utilisation de deux modèles biologiques totalement différents (*in vitro* vs *in vivo*, et vertébré supérieur vs invertébré mais surtout cellules cancéreuses vs saines). En

effet, plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses de mammifères présentaient une activité protéolytique plus importante que les cellules saines [207]. C'est d'ailleurs pour cette raison que les inhibiteurs du protéasome sont de plus en plus utilisés à des fins thérapeutiques. En effet, il a été démontré qu'ils permettraient de détruire les cellules tumorales en augmentant l'apoptose par accumulation de la protéine pro-apoptotique p53, préférentiellement dégradée dans les cellules cancéreuses [208].

Comme décrit précédemment une baisse de l'activité du protéasome provoque une augmentation de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, *via* l'accumulation de p53 (CEP-1 chez *C. elegans*) [209]–[211]. Dans notre étude, l'activité du protéasome 26S décroît à partir de 50Gy, alors que la reproduction (ponte totale et succès d'éclosion) est impactée dès 30Gy. Bailly et Gartner ont précédemment montré que l'irradiation aiguë a pour conséquence une augmentation des cassures double-brin de l'ADN ce qui aurait pour conséquence une augmentation de l'apoptose dose-dépendante de 7,5Gy jusqu'à 120Gy [182]. Comme décrit dans la partie A de ce manuscrit, l'apoptose est un mécanisme de défense cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes, permettant à l'organisme d'éliminer les cellules endommagées. Ce phénomène est hautement prévalent dans la lignée germinale et est dépendant de la protéine CEP-1 (orthologue de p53 chez le nématode)[12]. Tandis que la lignée somatique contribue à l'intégrité d'une seule génération, la lignée germinale est optimisée pour permettre à la fois le maintien de la prolifération cellulaire mais également pour maintenir la pluripotence nécessaire à la différenciation cellulaire après la fécondation. Par conséquent, les mécanismes de contrôle cellulaires sont primordiaux dans la lignée germinale afin de préserver les générations futures.

Au contraire, alors que le protéasome 20S est connu pour être moins sensible que les deux autres formes du protéasome aux rayonnements UV et aux faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), il semblerait que le protéasome 20S soit sensible aux rayonnements gamma aigus [212]–[214]. En revanche, la baisse d'activité du 20S ne semble pas être due à une baisse de son niveau d'expression. Ceci est concordant avec l'étude menée par Pervan et collaborateurs qui a montré sur cellules humaines de carcinome prostatique que les niveaux d'expression des trois sous-unités du protéasome n'étaient pas affectés après irradiation aiguë à 10Gy (5Gy.min⁻¹) [89]. Le cœur catalytique 20S est connu pour dégrader de manière sélective les protéines oxydées [33], [215], [216]. Comme l'irradiation n'induit pas de diminution des niveaux d'expression du 20S, l'hypothèse d'un effet indirect de l'irradiation sur l'activité du 20S pourrait être avancée pour expliquer ces résultats. Cet effet indirect pourrait correspondre à l'obstruction du protéasome. En effet, les protéines carbonylées ont la particularité de former des agrégats protéiques capables d'inhiber l'activité du protéasome en obstruant le cœur catalytique 20S [217]–[219].

Dans notre étude, l'activité du protéasome 20S semble être dépassée, ce qui ne lui permet pas de dégrader efficacement les protéines carbonylées après irradiation aiguë de 0,5 à 200Gy. Le niveau de protéines carbonylées étant constant malgré l'inhibition de l'activité du

20S dès 0,5Gy et la diminution de l'expression du protéasome 30S et 26S à partir de 80Gy, un autre de mécanisme de régulation des protéines carbonylées est probablement impliqué. Il a été précédemment démontré que le système ubiquitine protéasome (principalement représenté par le 30S et le 26S) était fonctionnellement lié à l'autophagie (deuxième système cellulaire majeur de protéolyse) [220]. L'autophagie est responsable de la dégradation des composants cellulaires mais également des protéines possédant une longue période biologique. Les données recensées dans la littérature suggèrent que l'autophagie joue un rôle compensatoire dans la protéolyse cellulaire lorsque le protéasome est inhibé [221]. Cependant les mécanismes moléculaires d'activation de l'autophagie sont encore peu connus. En outre, une étude a mis en évidence que le système protéasomal dégrade les protéines une par une alors que l'autophagie est capable de dégrader les agrégats protéiques [222]. Il est donc possible que dans notre étude l'autophagie soit impliquée dans la dégradation des protéines carbonylées. L'hypothèse qui peut être formulée ici est que les protéines carbonylées induites après irradiation aiguë tendent à s'accumuler et à s'agréger. Dès 0,5Gy alors que l'activité du 20S est inhibée, les systèmes d'autophagie seraient stimulés afin de dégrader les agrégats protéiques, entraînant alors la diminution du niveau de protéines carbonylées. Ce phénomène a déjà été observé dans le cadre d'états physiopathologiques qui peuvent être potentiellement liés à une accumulation de protéines carbonylées tels que les maladies neurodégénératives et le vieillissement [223], [224]. Il est également probable que les protéines préférentiellement carbonylées après irradiation aiguë soient des protéines à longue période biologique, qui nécessitent une dégradation *via* le système d'autophagie. Cette hypothèse a été testée dans notre étude après irradiation aiguë par la méthodologie 2D-oxyDIGE mais est encore en cours d'investigation.

Nous pouvons alors émettre l'hypothèse qu' i) un déclin de l'activité du protéasome 20S à partir de 0,5Gy pourrait entraîner un défaut des mécanismes de réparation à l'ADN (en empêchant le turnover d'enzyme de réparation) favorisant ainsi l'apoptose à des doses modérées d'irradiation aiguë et qu' ii) un déclin de la protéolyse ubiquitine-dépendante à partir de 50Gy pourrait conduire à l'accumulation de la protéine CEP-1 conduisant également à une augmentation de l'apoptose. Comme précédemment montré par Bailly *et al*, une augmentation de l'apoptose pourrait être liée à une baisse du succès d'éclosion des 30Gy d'irradiation aiguë, afin d'éliminer les embryons endommagés par l'irradiation gamma [182].

Pour conclure, il semblerait que les effets de l'irradiation aiguë (pour la gamme de doses testée dans cette étude) soient compensés par un équilibre cellulaire entre les deux principaux systèmes de protéolyse afin de maintenir un niveau faible de protéines carbonylées : le protéasome et l'autophagosome.

d. Expression différentielle et nature des protéines variantes

Comme précédemment évoqué, le marqueur carbonylation des protéines ne semble pas être un marqueur sensible et/ou précoce des effets de l'irradiation aiguë sur la reproduction de *C. elegans*.

Afin de déterminer un marqueur sensible des effets de l'irradiation aiguë sur la reproduction de *C. elegans*, l'expression différentielle et la nature des protéines variantes après irradiation aiguë ont été mesurées à des doses pour lesquelles aucun effet sur la reproduction n'est détecté.

Dans le cadre de la comparaison aigu vs chronique, aux doses comprises entre 0,5 et 3,3Gy, des investigations ont été poussées au niveau du protéome. Les expériences de protéomique ont été dimensionnées et réalisées ensemble, pour éviter tout biais analytique et de manière à comparer, à dose cumulée équivalente, l'expression des protéines entre le mode d'irradiation aiguë et chronique (0,5Gy chronique vs 0,5Gy aigu ; 1Gy chronique vs 1Gy aigu et 3,3Gy chronique vs 3,3Gy).

L'expression et la nature des protéines variantes après irradiation aiguë à 0,5 ; 1 et 3,3Gy ont été analysées *via* deux approches complémentaires : la méthodologie 2D-DIGE et label-free. L'avantage de la technique 2D-DIGE est notamment de pouvoir garder les protéines « entières » pour l'analyse et comparer les masses moléculaires théoriques (retrouvées dans les bases de données) et les masses moléculaires des protéines retrouvées sur gel, afin de déterminer si les protéines identifiées correspondent à des dimères de protéines ou à des sous-unités protéiques (protéine non mature, ou produits de dégradation). En revanche, l'analyse par 2D-DIGE manque de résolution, de sensibilité et d'exhaustivité ; en effet, certaines protéines, *i.e.* protéines >150kDa ; Protéines <5kDa, protéines hydrophobes, sont exclues par l'électrophorèse bidimensionnelle. L'analyse par label free en revanche permet une profondeur d'analyse plus importante notamment en rendant accessibles des protéines exclues par l'électrophorèse bidimensionnelle qui pourraient être d'intérêt au niveau biologique.

i. Cas des organismes contrôles

Ainsi, les témoins aigu et chronique ont tout d'abord été comparés lors de ces analyses. Cependant, nous nous sommes aperçus en les comparant, que les témoins aigu et chronique étaient différents (*via* la DIGE et *via* le label free), puisque 309 protéines étaient différemment modulées entre les deux témoins. Une analyse des GOTERM *via* David gène a permis de déterminer que les processus biologiques susceptibles d'être modulés par les protéines variantes entre les deux contrôles étaient majoritairement : les mécanismes de réponse au stress (10%, *p. value* = 3×10^{-8}) ; les réponses immunitaires (6%, *p. value* = 8×10^{-6}) ; processus métaboliques des composés organo-azotés (22%, *p. value* = 1×10^{-3}). Il semblerait donc qu'un stress ait joué un rôle dans les dissemblances observées entre les témoins aigus et chroniques. En effet, les irradiations aiguës ont été menées à Orsay, par conséquent les nématodes ont été transportés en train jusque-là. Il est donc probable que le

transport des nématodes ait provoqué un stress chez les individus dédiés à l'expérience d'irradiation aiguë.

C'est pour cette raison que toutes les analyses de protéomique présentées dans cette partie ont été analysées de manière indépendante en séparant les conditions aiguës et chroniques. Ainsi seules les comparaisons par rapport aux témoins respectifs ont été réalisées.

ii. Résultats des analyses protéomiques post-irradiation aiguë

1.1. DIGE

L'analyse de l'expression différentielle des protéines après irradiation aiguë chez *C. elegans* a tout d'abord été réalisée par la méthodologie 2D-DIGE. Les résultats de cette analyse ont montré que parmi les 937 spots détectés, 12 ont été considérés comme différemment exprimés après irradiation aiguë.

La position sur gel d'électrophorèse 2D des spots différemment exprimés entre les différents groupes est présentée en Figure 39.

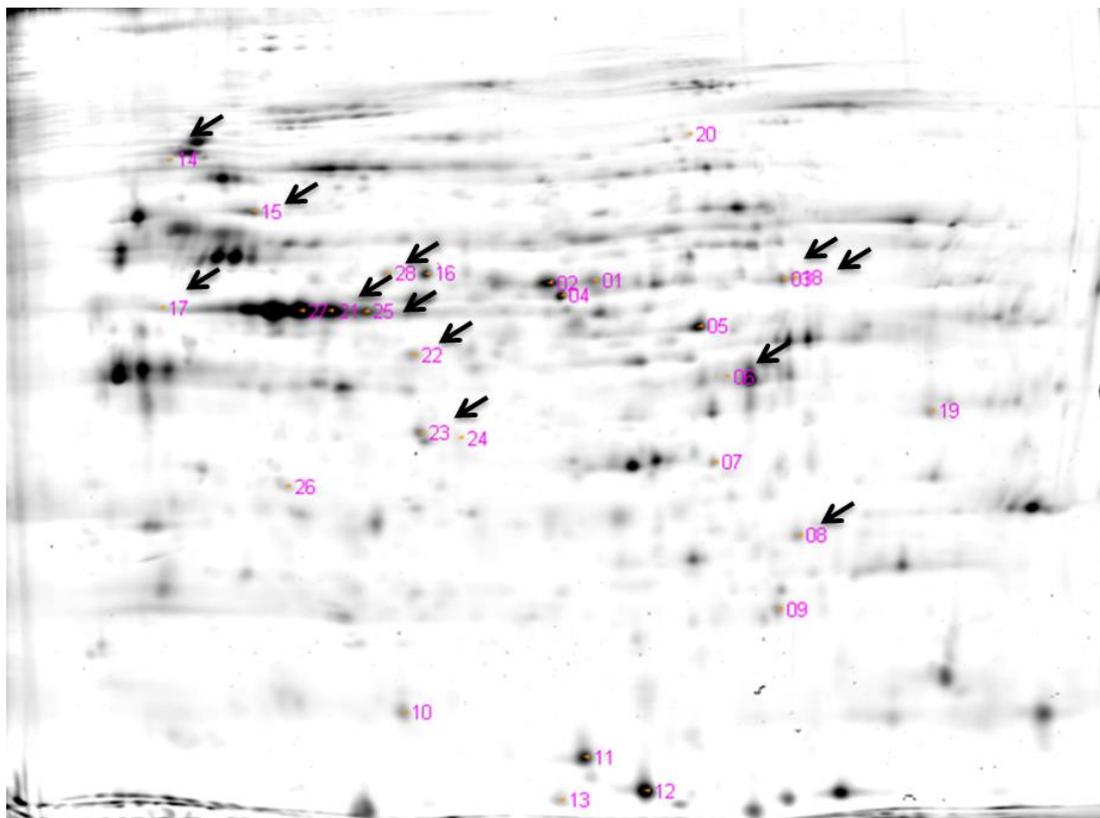


Figure 39 : Gel d'électrophorèse 2D-DIGE. Illustration des 12 spots d'intérêt (annotés en rose avec une flèche), sélectionnés pour l'analyse par spectrométrie de masse.

Les ratios des intensités de spots différent entre 0,5Gy et les témoins, 1Gy et les témoins, et, 3,3Gy et les témoins sont présentés dans le Tableau 15 avec la *p. value* associée.

Tableau 15 : Comparaison de l'intensité de chacun des spots entre les différentes doses et le témoin. Les résultats sont présentés comme le ratio de la moyenne du volume du spot : n=3 (pool de 3000 nématodes). L'analyse a été réalisée avec le logiciel Delta2D. Un ratio inférieur à 0,75 signifie que le spot de protéine est moins exprimé chez le groupe exposé que chez le groupe témoin ; à l'inverse un ratio supérieur à 1.5 signifie que le spot de protéines est plus exprimé chez le groupe exposé que chez le groupe témoin. (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, test de Student).

Spot n°	0,5Gy vs témoins		1Gy vs témoins		3,3Gy vs témoins	
	Ratio de l'intensité fluorescente du spot (volume)	<i>p. value</i>	Ratio de l'intensité fluorescente du spot (volume)	<i>p. value</i>	Ratio de l'intensité fluorescente du spot (volume)	<i>p. value</i>
3	0,72	0,003**	0,59	0,012*		
6					2,22	0,047*
8			0,65	0,039*		
14			2,50	0,003**		
15	0,70	0,046*			0,66	0,026*
17	2,08	0,006**	2,16	0,035*		
18	0,66	0,001**				
21					1,56	0,001**
22			1,55	0,049*		
23	2,77	0,017*	8,83	0,015*	11,37	0,010**
25					1,66	0,001**
28	0,71	0,009**			0,72	0,015*

L'analyse des spots différemment exprimés entre les différents groupes montre que les nématodes exposés à 0,5Gy d'irradiation gamma aiguë présentent deux spots de protéines surexprimées par rapport aux témoins (spot n°17 et 23) et quatre spots de protéines réprimées par rapport aux témoins (spots n° 3, 15, 18 et 28). En ce qui concerne les nématodes exposés à 1Gy d'irradiation gamma, ceux-ci présentent quatre spots de protéines surexprimées (spot n° 14, 17, 22 et 23) et deux spots de protéines réprimées par rapport aux témoins (spots n° 3 et 8). Enfin, les nématodes exposés à 3,3Gy d'irradiation gamma aiguë présentent quatre spots de protéines surexprimées (spots n° 6, 21, 23 et 25) et deux spots de protéines réprimées par rapport aux témoins (spots n° 15 et 28). Ce résultat est concordant avec celui obtenu lors de l'analyse de la nature des protéines carbonylées (plus de surexpression par rapport aux répressions). De plus, ces résultats montrent qu'entre les différentes doses étudiées, le nombre de protéines différemment exprimées n'augmente pas avec la dose, en revanche la nature de ces protéines semble varier avec la dose.

Après l'analyse des protéines différemment exprimées entre les différents groupes, les spots contenant les protéines ont été prélevés, puis caractérisés par spectrométrie de masse (le Maldi TOF/TOF a été utilisé pour une première identification, affinée par l'utilisation de l'Orbitrap) et les protéines identifiées par interrogation des bases de données NCBI/nr/*C.elegans* et Uniprot/UPP_*C.elegans*. Ainsi, sur 12 spots de protéines variantes, 14

protéines ont pu être identifiées, dont trois sous un même spot. En revanche, les spots 8 et 23 n'ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Les résultats d'identification de l'analyse 2D-DIGE après irradiation aiguë sont donnés dans le Tableau 16 ainsi que la masse moléculaire des protéines identifiées et leur fonction. Dans un premier temps, on peut noter que les masses moléculaires des protéines correspondent bien à leur position sur le gel, ce qui renforce la validité de l'identification. Cependant, la protéine Elongation factor 2 dont la masse moléculaire théorique est de 95kDa est positionnée assez bas sur le gel (Figure 39). Ceci peut signifier qu'il ne s'agit pas en réalité de cette protéine mais plutôt d'un de ses produits de dégradation, mais aucune donnée dans la littérature ne permet d'étayer cette hypothèse. De la même manière, la protéine Heat Shock 70KDa protein A est positionnée très haut sur le gel alors que sa masse moléculaire théorique est plutôt faible. Ceci peut signifier qu'il s'agit en réalité d'un dimère de HSP-70 [225]. De plus, il peut également exister *in vivo* une forme complexée entre HSP-70 et p53 (CEP-1 chez *C. elegans*), dont la masse moléculaire correspondrait à ce qui est observé sur le gel (144kDa) [226]. En effet, il a été montré que dans les cellules humaines cancéreuses, lorsque p53 est mutée elle peut s'associer à HSP-70. Cette complexation serait à l'origine de la présentation antigénique de p53, favorisant ainsi la réponse immunitaire lors de cancers du sein, afin de dégrader les protéines pro-apoptiques anormales [227].

Tableau 16 : Liste des protéines différemment exprimées après irradiation aiguë chez *C. elegans* de 0,5 à 3,3Gy par rapport aux témoins et identifiées après spectrométrie de masse (Maldi-TOF/TOF et Orbitrap). La modulation de l'expression de chacune des protéines par rapport aux témoins est représentée. « -- » signifie que le ratio de l'intensité du spot de protéine est inférieur à 0,5 et « ++ » signifie que le ratio de l'intensité du spot de protéine est supérieur à 2.

Modulation	N° spot	Nom de la protéine	Nom du gène	Accession sur uniprot	Score	Recouvrement de séquence (%)	Poids moléculaire (Da)	Fonction
-	3	Probable fumarate hydratase, mitochondrial	fum-1	O17214	1789	49	53784	Impliquée dans le cycle acide tricarboxylique
-	3	Probable citrate synthase, mitochondrial	cts-1	P34575	964	33	51793	Impliquée dans le cycle acide tricarboxylique
++	6	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	rack-1	Q21215	841	40	36150	requis pour l'expression de nlp-29 (peptide anti-microbien) en réponse à une infection
++	14	Heat shock 70 kDa protein A	hsp-1	P09446	1662	46	69965	impliquée dans la réponse au stress
-	15	Chaperonin homolog Hsp-60, mitochondrial	hsp-60	P50140	2585	45	60235	impliquée dans l'importation de protéines mitochondriales et dans l'assemblage macromoléculaire
++	17	Actin-1	act-1	P0DM41	1176	40	42111	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes
-	18	Probable fumarate hydratase, mitochondrial	fum-1	O17214	384	22	53784	Impliquée dans le cycle acide tricarboxylique
+	21	Actin-1	act-1	P0DM41	5934	52	42111	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes
+	21	Actin-5	act-5	O45815	3239	58	42131	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes
+	22	40S ribosomal protein SA	rps-0	P46769	871	55	30798	nécessaire à l'assemblage et/ou à la stabilité de la sous-unité ribosomale 40S
+	22	Elongation factor 2	eef-2	P26691	538	16	95477	essentielle pour la phase d'élongation lors de la synthèse protéique
+	25	Actin-1	act-1	P0DM41	1121	52	42111	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes
+	25	Actin-5	act-5	O45815	1068	58	42131	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes
-	28	Enolase	enol-1	Q27527	396	28	46759	impliquée dans la glycolyse et dans la synthèse du pyruvate à partir du D-glyceraldéhyde 3-phosphate

Afin de réaliser une analyse globale, les protéines identifiées ont été regroupées selon les processus biologiques qu'elles régissent (GOTERM) à l'aide de l'outil d'interaction DAVID gene [193]. Il est important de noter qu'en raison du faible nombre de protéines identifiées, la *p. value*, égale à 0,1 par défaut dans l'outil DAVID gene, a été relaxée à 0,5 afin de pouvoir identifier les différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines variantes. Le classement des processus biologiques en pourcentage correspond au nombre de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques et est présenté en Figure 40. Ainsi une valeur égale à 100% signifie que toutes les protéines variantes sont impliquées dans le processus biologique associé.

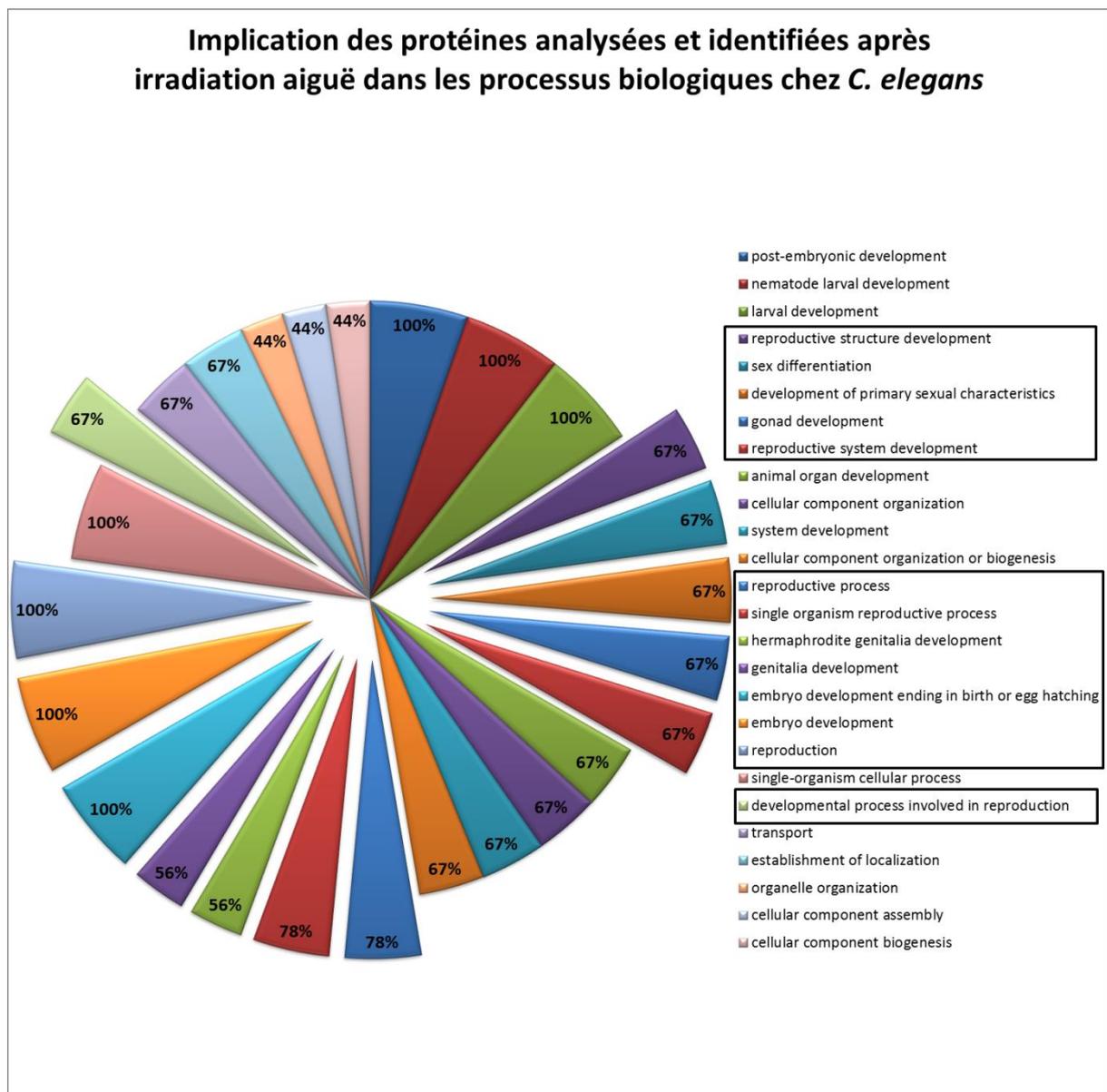


Figure 40 : Analyse des processus biologiques *via* l'outil DAVID gene dans lesquels sont impliquées les protéines identifiées après irradiation aiguë. Les processus biologiques relatifs à la reproduction de *C. elegans* sont représentés excentrés, les GOTERM associés sont encadrés. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

L'analyse des GOTERM montre qu'une grande partie des protéines identifiées sont impliquées dans la reproduction de *C. elegans*. En effet les protéines identifiées sont impliquées dans: le succès d'éclosion (100%; *p. value*=0,3), le développement embryonnaire (100%, *p. value*=0,3), la reproduction de manière générale (100%, *p. value*=0,3), les processus liés à la reproduction (77%, *p. value*=0,2), la différenciation sexuelle (67%, *p. value*=0,1), le développement des caractéristiques sexuelles primaires (67%, *p. value*=0,1), le développement de la gonade (67%, *p. value*=0,1), les processus développementaux impliqués dans la reproduction (67%, *p. value*=0,1), et le développement de la vulve (56%, *p. value*=0,3).

Afin de pouvoir affiner cette étude, et déterminer quels processus biologiques sont susceptibles d'être réprimés ou surexprimés, l'analyse des GOTERM a été réalisée pour les protéines sur-exprimées d'une part et réprimées d'autre part après irradiation par rapport aux témoins.

L'analyse des processus biologiques susceptibles d'être réprimés après irradiation aiguë est donnée dans la Figure 41.

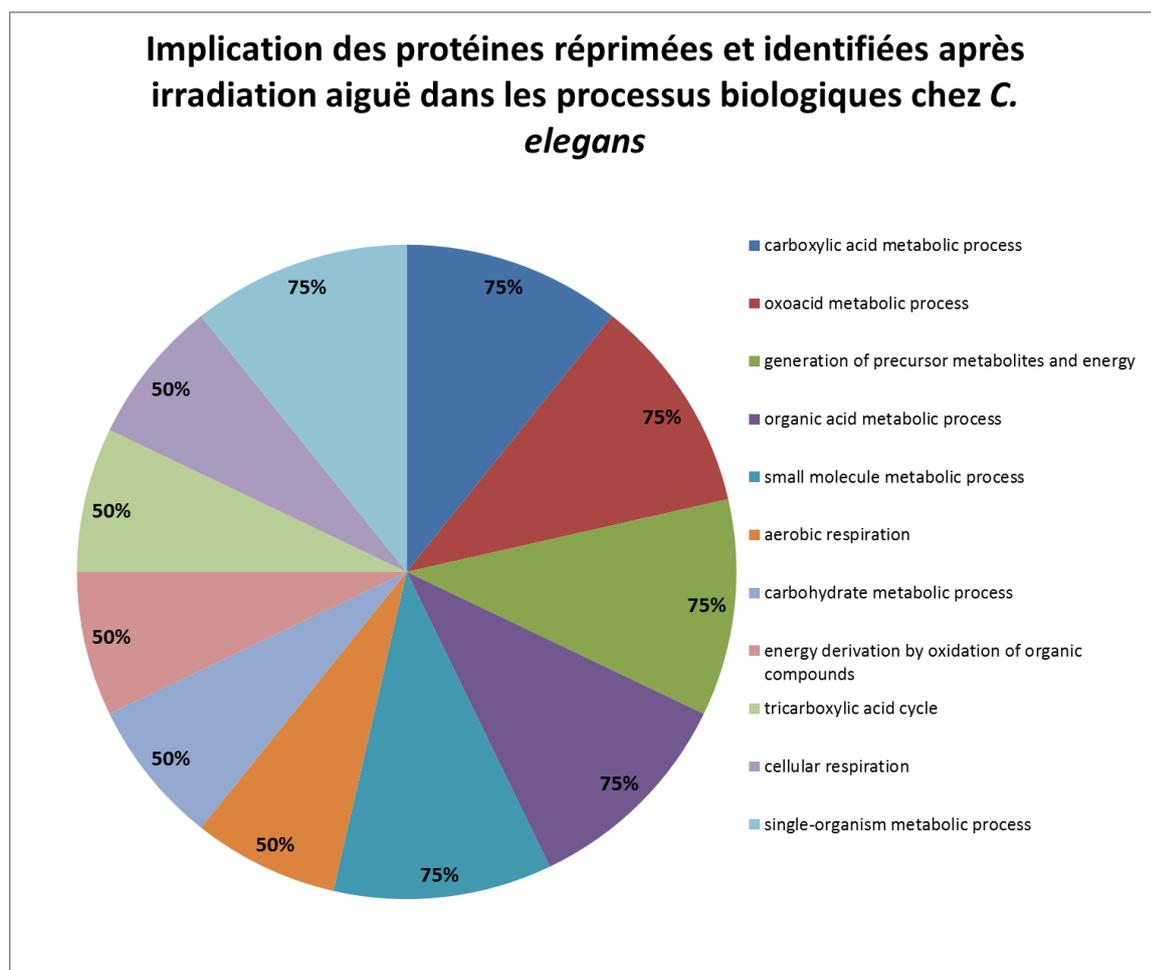


Figure 41 : Analyse des processus biologiques *via* l'outil DAVID gene dans lesquels sont impliquées les protéines réprimées et identifiées après irradiation aiguë. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

Les résultats présentés en Figure 41 montrent qu'aucune protéine analysée comme réprimée après irradiation aiguë n'est impliquée dans les processus de reproduction du nématode. Cependant les protéines analysées comme réprimées semblent être impliquées dans le métabolisme énergétique. Ceci peut signifier que l'irradiation aiguë implique une dérégulation du métabolisme énergétique chez *C. elegans* et ce, dès 0.5Gy. De plus, la même analyse a été réalisée mais cette fois pour les protéines surexprimées. Les résultats de cette analyse sont donnés dans la Figure 42.

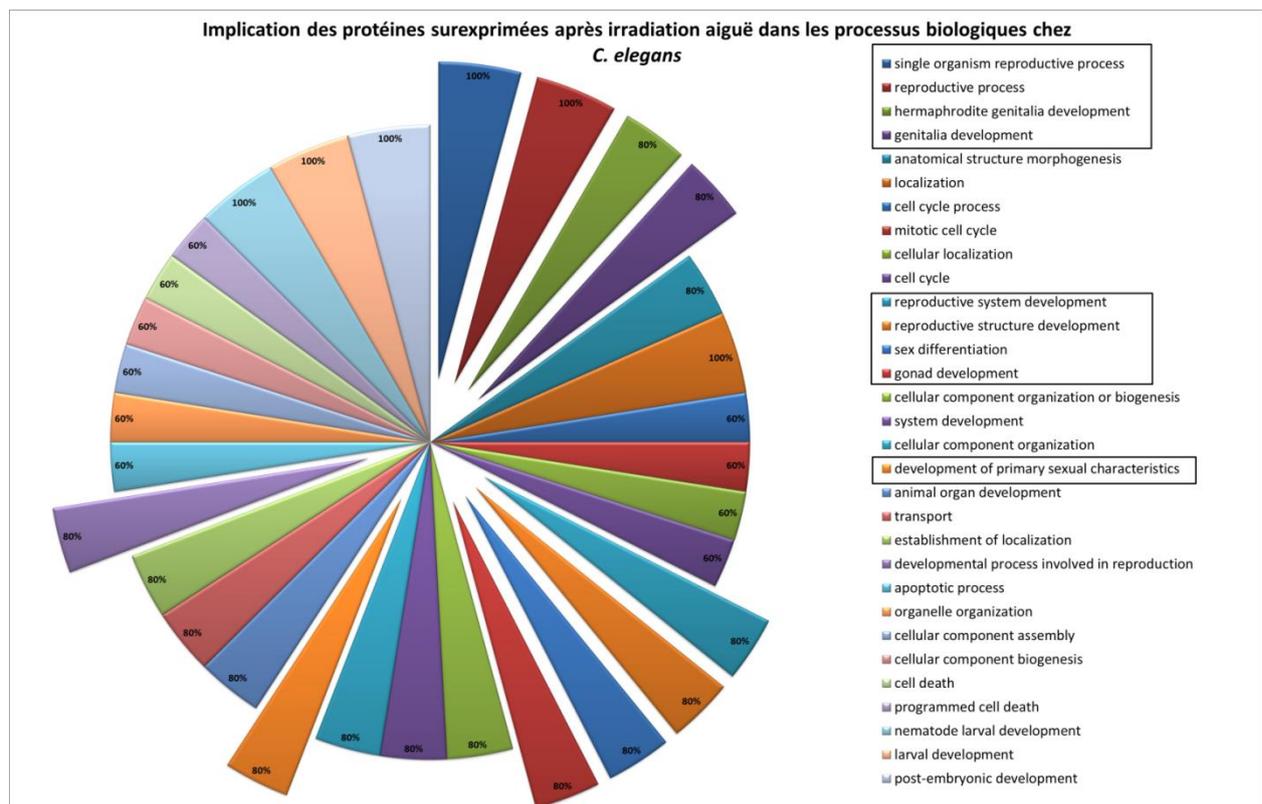


Figure 42 : Analyse des processus biologiques via l'outil DAVID gene dans lesquels sont impliquées les protéines analysées comme sur-exprimées et identifiées après irradiation aiguë. Les processus biologiques relatifs à la reproduction de *C. elegans* sont représentés excentrés, les GOTERM associés sont encadrés. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

Les résultats présentés en Figure 42 montrent que toutes les protéines qui sont impliquées dans la reproduction du nématode sont sur-exprimées après irradiation aiguë par rapport aux témoins. Ces protéines sont RACK-1, ACT-1, ACT-5, HSP-1 et RPS-0.

En particulier, il a déjà été montré que la protéine RACK-1 est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire chez *C. elegans*. En effet, RACK-1 est requise durant la phase de cytokinèse (division du cytoplasme dans les dernières phases de la mitose) ainsi que durant l'organisation des membranes des cellules de la lignée germinale [228].

Etant donné qu'un déclin de la reproduction du nématode apparaît dès 30Gy d'irradiation aiguë, la modulation de ces 5 protéines dès 0,5Gy et en particulier la modulation de RACK-1

dès 3,3Gy pourrait être une affection précoce des voies de régulation impliquées dans la reproduction chez *C. elegans*.

Outre la reproduction, la Figure 42 donne d'autres informations intéressantes. En effet, l'analyse des GOTERM montre que des protéines analysées comme surexprimées après irradiation aiguë sont impliquées dans la mort cellulaire. Ces protéines sont ACT-5, HSP-1 et RPS-0. Ces protéines ne sont pas spécifiques de l'apoptose mais découleraient d'une augmentation de l'activité apoptotique. En effet comme évoqué dans le chapitre précédent, une diminution de l'activité du protéasome pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'apoptose *via* l'accumulation de protéines pro-apoptotiques telles que p53 (CEP-1 chez *C. elegans*). Or, comme précédemment montré par Bailly *et al*, une augmentation de l'apoptose pourrait être liée à une baisse du succès d'éclosion après irradiation aiguë [182]. Ces résultats de protéomique obtenus *via* la méthodologie 2D-DIGE pourraient supporter l'hypothèse selon laquelle une baisse de l'activité du protéasome entraînerait une augmentation de l'apoptose, afin d'éliminer les embryons endommagés par l'irradiation gamma.

En conclusion, les protéines RACK-1, HSP-1, RPS-0 et ACT-1 ; ACT-5 sont des marqueurs d'exposition plus sensibles que la reproduction après irradiation aiguë car elles sont différemment exprimées à des doses pour lesquelles aucun effet à l'échelle de l'individu n'est observé.

L'analyse menée par l'approche DIGE a donné des résultats prometteurs suggérant un lien possible entre les effets moléculaires et les effets sur la reproduction observés après irradiation aiguë. Cependant le faible nombre de protéines variantes a été limitant pour l'analyse des enrichissements des voies moléculaires après irradiation aiguë (*p. values* non significatives). Une analyse label free a donc été menée sur les trois mêmes doses que pour la 2D-DIGE : 0,5Gy, 1Gy et 3,3Gy, afin de rendre accessibles des protéines, exclues par l'électrophorèse bidimensionnelle, qui pourraient être d'intérêt au niveau biologique.

1.2. Label free

Parmi les 2677 protéines identifiées, 481 ont été considérées comme différemment exprimées après irradiation aiguë par rapport aux témoins. La Figure 43 représente l'ensemble des protéines analysées comme variantes et identifiées après irradiation aiguë. La liste exhaustive des protéines identifiées et caractérisées dans les banques de données après irradiation aiguë est donnée en annexe 1.

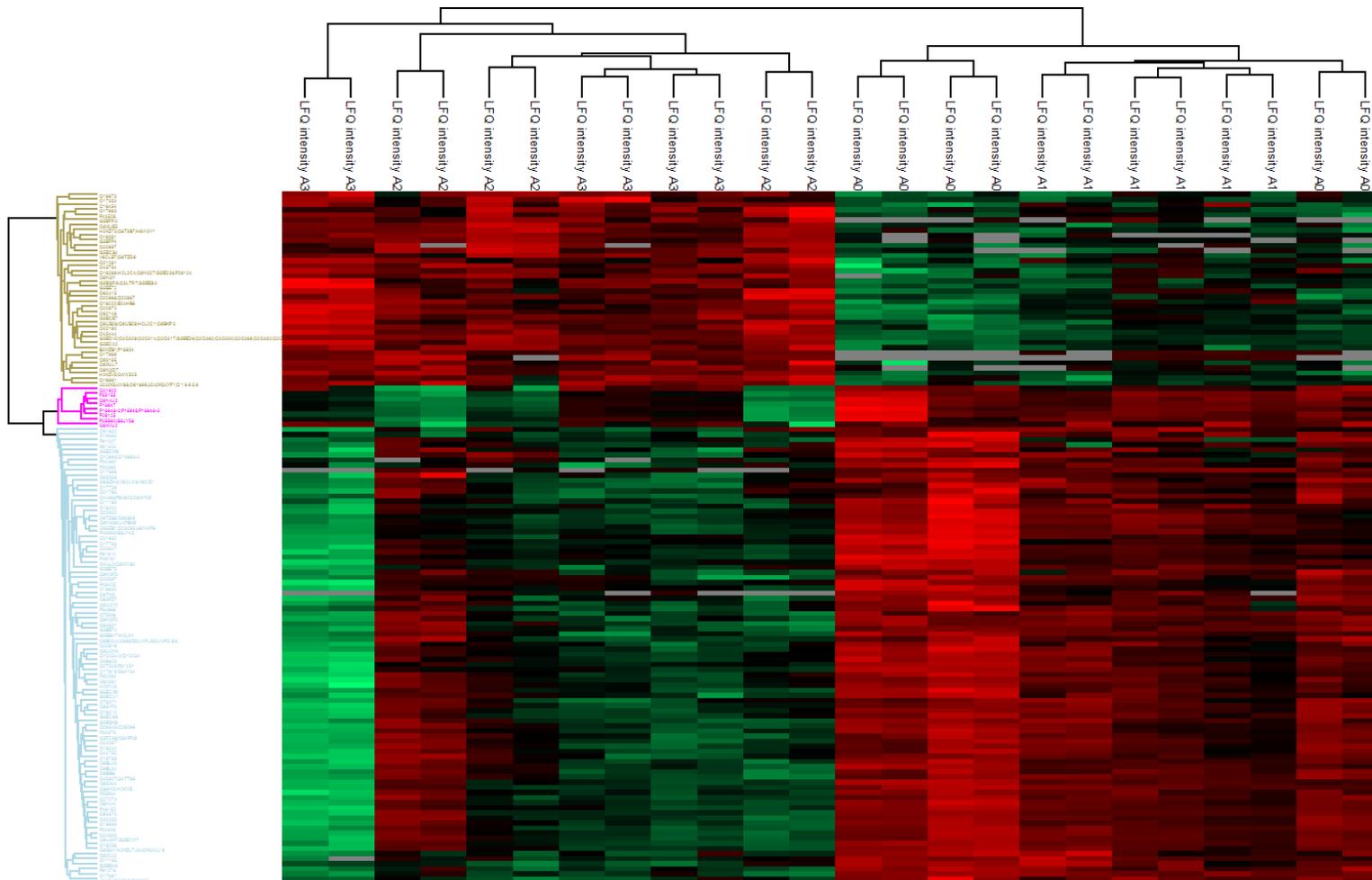


Figure 43 : Heat map représentant les LFIQ (label free intensity normalisée par intensité totale chromatogramme) pour chacune des protéines variée et identifiée par spectrométrie de masse. Le dendrogramme du haut représente les différentes conditions ainsi que les différents réplicats biologiques et analytiques. A0 correspond aux conditions contrôles, A1 correspond aux conditions 0,5Gy, A2 correspond aux conditions 1Gy et A3 correspond aux conditions 3,3Gy. Le dendrogramme de gauche représente les différentes protéines en fonction de leur numéro d'accèsion sur Uniprot. Les couleurs correspondent aux intensités de protéines en LFIQ transformées en log2 (vert = positif, rouge = négatif).

Cette représentation graphique des données permet d'identifier deux groupes parmi les différentes conditions : les groupes contrôles et exposés à 0,5Gy vs les groupes exposés à 1Gy et exposés à 3,3Gy.

La modulation des différentes protéines en fonction des doses d'exposition est donnée ci-après (*p. value* inférieure à 0,01):

Pour les nématodes exposés à 0,5Gy, 2 protéines sont réprimées par rapport aux témoins.

Pour les nématodes exposés à 1Gy, 32 protéines sont variantes, dont 20 sont surexprimées par rapport aux témoins et 12 réprimées par rapport aux témoins.

Pour les nématodes exposés à 3,3Gy, 335 protéines sont variantes, dont 103 sont surexprimées par rapport aux témoins et 232 réprimées par rapport aux témoins.

Ces résultats montrent que la modulation du protéome après irradiation aiguë est dose-dépendante entre 0,5 et 3,3 Gy, et qu'il existe plus de protéines réprimées que de protéines surexprimées, contrairement à l'analyse menée précédemment en 2D-DIGE où la modulation de l'expression des protéines n'était pas dose-dépendante entre 0,5 et 3,3Gy et où une majorité de protéines étaient surexprimées. Cependant, il est possible que l'exclusion de certaines protéines de l'analyse bidimensionnelle 2D-DIGE ait limité la détection de protéines variantes après irradiation par rapport aux témoins, expliquant alors cette divergence entre les deux méthodes.

Au vu de nos résultats précédents et de la littérature, certains processus moléculaires semblent être particulièrement impliqués dans les mécanismes de défense du nématode à l'irradiation. En particulier, comme décrit dans la partie A de ce manuscrit, l'augmentation de dommages à l'ADN radio-induits induirait une augmentation de l'apoptose dans la lignée germinale chez *C. elegans* ce qui entrainerait une baisse de son succès d'éclosion [182]. Par conséquent, les protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN et dans la cascade apoptotique chez *C. elegans* ont été recherchées dans cette analyse protéomique. De plus, au vu des résultats précédents, qui ont montré que l'activité du protéasome était modulée après irradiation aiguë, les protéines constituant le protéasome ont également été recherchées. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17: Résultats de la recherche avec *a priori* : 9 des protéines analysées comme variantes et identifiées après analyse label free qui sont impliquées dans les processus d'apoptose et dans l'activité du protéasome.

ID protéine	ID gene	Voie moléculaire associée	Modulation de l'expression des protéines		
			0,5Gy vs contrôles	1Gy vs contrôles	3,3Gy vs contrôles
Proteasome subunit beta type	<i>pbs-5</i>	Sous-unité du protéasome 20S			+
Probable 26S proteasome regulatory subunit	<i>rpt-4</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	<i>rpn-3</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	<i>rpn-1</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
Proteasome Regulatory Particle, ATPase-like	<i>rpt-5</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
Proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like	<i>rpn-9</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
Proteasome Regulatory Particle, Non-ATPase-like	<i>rpn-8</i>	Sous-unité du complexe régulateur du protéasome 19S			-
Skp1-related	<i>skr-1</i>	Apoptose			-

protein					
60S acidic ribosomal protein P0	<i>rpa-0</i>	Apoptose			--

Comme le montre le Tableau 19, les résultats de cette analyse label-free n'ont pas permis d'identifier des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou dans la cascade apoptotique telles que CEP-1, EGL-1, CED-13, CED-9, CED-4 ou CED-3. En revanche, la protéine RPA-0 qui fait partie des protéines qui sont impliquées dans la reconnaissance des cassures à l'ADN chez *C. elegans* et qui est requise pour la réparation et la recombinaison de l'ADN après dommage est réprimée à 3,3Gy par rapport aux témoins. Ceci pourrait suggérer qu'il existe après exposition aiguë, un défaut de reconnaissance des cassures de l'ADN. De plus, il a récemment été montré que la protéine SKR-1, réprimée à 3,3Gy dans notre étude, est d'une part impliquée dans l'ubiquitinylation des protéines afin de permettre leur dégradation par le protéasome [91], et d'autre part réprime la protéine pro-apoptotique CEP-1 chez *C. elegans* [184]. La répression de SKR-1 par rapport aux témoins, suggère une inhibition du rétrocontrôle négatif sur CEP-1 et donc une réponse apoptotique accrue après irradiation aiguë de *C. elegans*. Ces résultats sont en accord avec la littérature [182].

De plus, l'analyse label-free a permis d'identifier que certaines protéines constituant le protéasome étaient réprimées. En particulier, les protéines RPN-9, RPT-4, RPT-5, RPN-1, RPN-8 et RPN-3 qui font partie des sous unités constituant le complexe régulateur 19S du protéasome sont réprimées après irradiation aiguë à 3,3Gy par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec une étude de 2001 qui décrit que le complexe 19S pourrait être la cible préférentielle des dommages de l'irradiation aiguë [229]. Le complexe 19S est un des constituants des formes 30 et 26S du protéasome, cependant, étant donné que les niveaux d'expression des 30S et 26S ont été mesurés *via* la mesure de l'expression du 20S dans notre étude, l'impact sur le 19S libre n'était pas visible. Il serait donc intéressant de mesurer les niveaux d'expression du complexe 19S libre afin de confirmer qu'il existe un impact sur celui-ci après irradiation aiguë. De plus, une protéine faisant partie des sous-unités de type β du protéasome 20S est sur-exprimée après irradiation aiguë à 3,3Gy par rapport aux témoins (PBS-5). Ceci est particulièrement intéressant étant donné que nos précédents résultats ont montré qu'il n'y avait aucune diminution des niveaux d'expression du protéasome 20S malgré les doses croissantes d'irradiation aiguë. Ainsi la surexpression de PBS-5 pourrait correspondre à un mécanisme de compensation afin de maintenir un niveau d'activité du protéasome 20S stable.

Afin d'analyser de manière plus globale les processus biologiques auxquels appartiennent les protéines impactées par l'irradiation, et déterminer quels processus biologiques seraient susceptibles d'être perturbés, l'analyse des GOTERM a été réalisée pour les protéines sur-

exprimées d'une part et réprimées d'autre part après irradiation par rapport aux témoins. Ainsi, une analyse des fonctions biologiques pour les protéines identifiées a été réalisée *via* l'outil d'interaction DAVID gene. Contrairement à la DIGE, un nombre conséquent de protéines a pu être identifié lors de cette analyse label-free. Par conséquent, la valeur de *p. value* par défaut dans l'outil DAVID gene (égale à 0,1) a été conservée. Le classement des processus biologiques en pourcentage correspond au nombre de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologique et est présenté en Figure 44. Afin de faciliter l'analyse et de simplifier la visualisation des résultats, seuls les processus biologiques identifiés présentant une *p. value* inférieure à 0,05 sont représentés dans la figure 44.

Implication des protéines analysées surexprimées et identifiées après irradiation aiguë dans les processus biologiques chez *C. elegans*

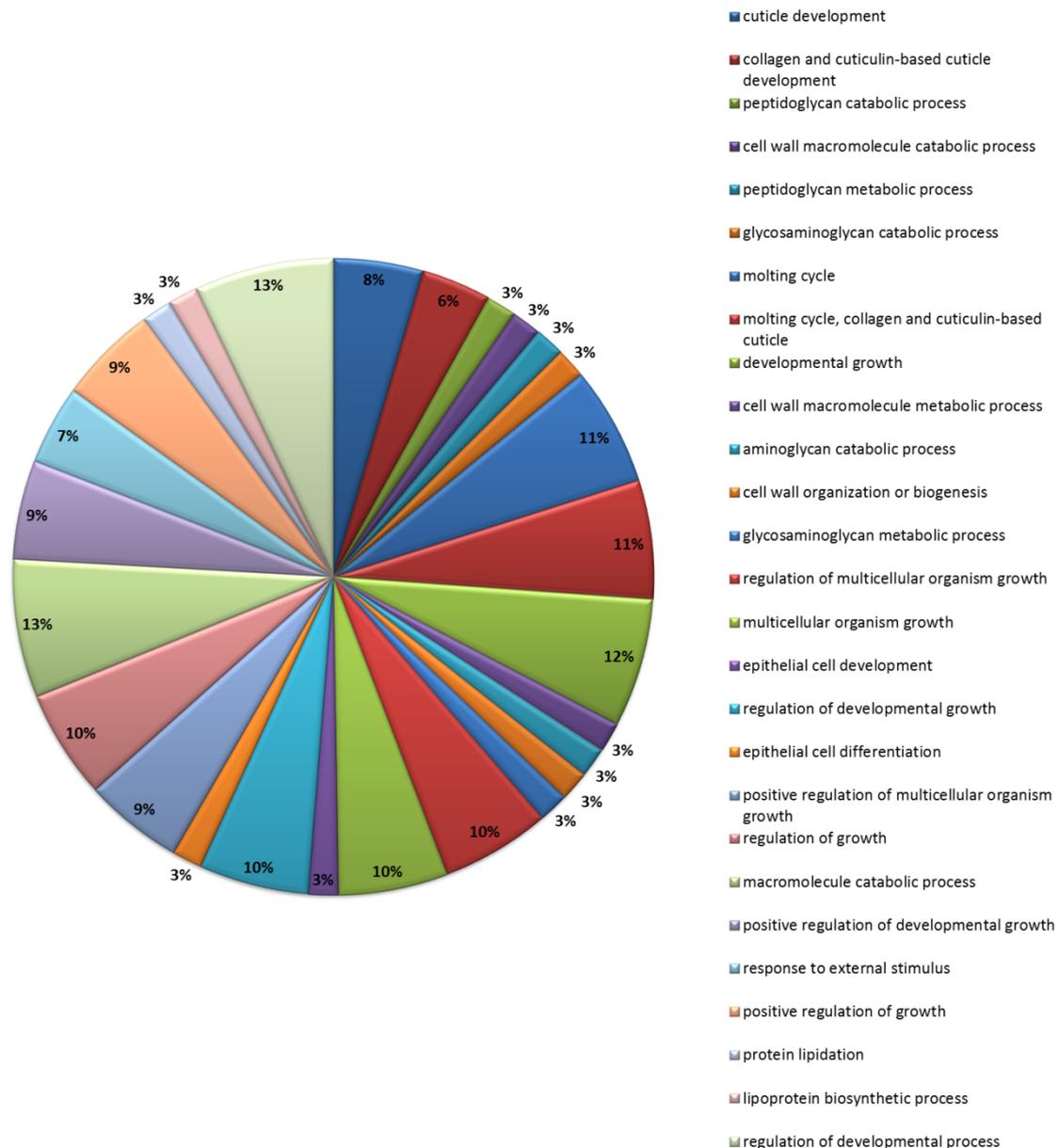


Figure 44 : Analyse *via* l'outil DAVID gene des processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines analysées comme surexprimées et identifiées après irradiation aiguë. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

Ce diagramme montre que globalement les protéines identifiées et analysées comme surexprimées après irradiation par rapport aux témoins sont impliquées dans une multitude de processus biologiques. Les processus biologiques dans lesquels les protéines analysées comme surexprimées semblent être les plus impliquées (*p. values* les plus faibles) sont : le développement de la cuticule (8% de protéines, *p. value* = 1×10^{-4}), les processus métaboliques (3% de protéines, *p. value* = 3×10^{-3}) et la croissance (12%, *p. value* = 5×10^{-3}).

En revanche, l'analyse des GOTERM après irradiation aiguë ne montre aucune surexpression des protéines directement impliquées dans la reproduction de *C. elegans*. L'analyse DIGE associée à l'enrichissement de processus biologique *via* DAVID gene montrait que des protéines impliquées dans le processus reproduction étaient surexprimées après irradiation aiguë. Après analyse plus approfondie, ces protéines ne sont pas impliquées spécifiquement dans la reproduction de *C. elegans* (HSP-1, RPS-0 ACT-1, ACT-5), mis à part la protéine RACK-1 qui est-elle impliquée dans le développement de la lignée germinale et dans le développement embryonnaire [230].

L'analyse des GOTERM a été réalisée pour les protéines réprimées par rapport aux témoins. Le résultat de cette analyse est donné dans la Figure 45.

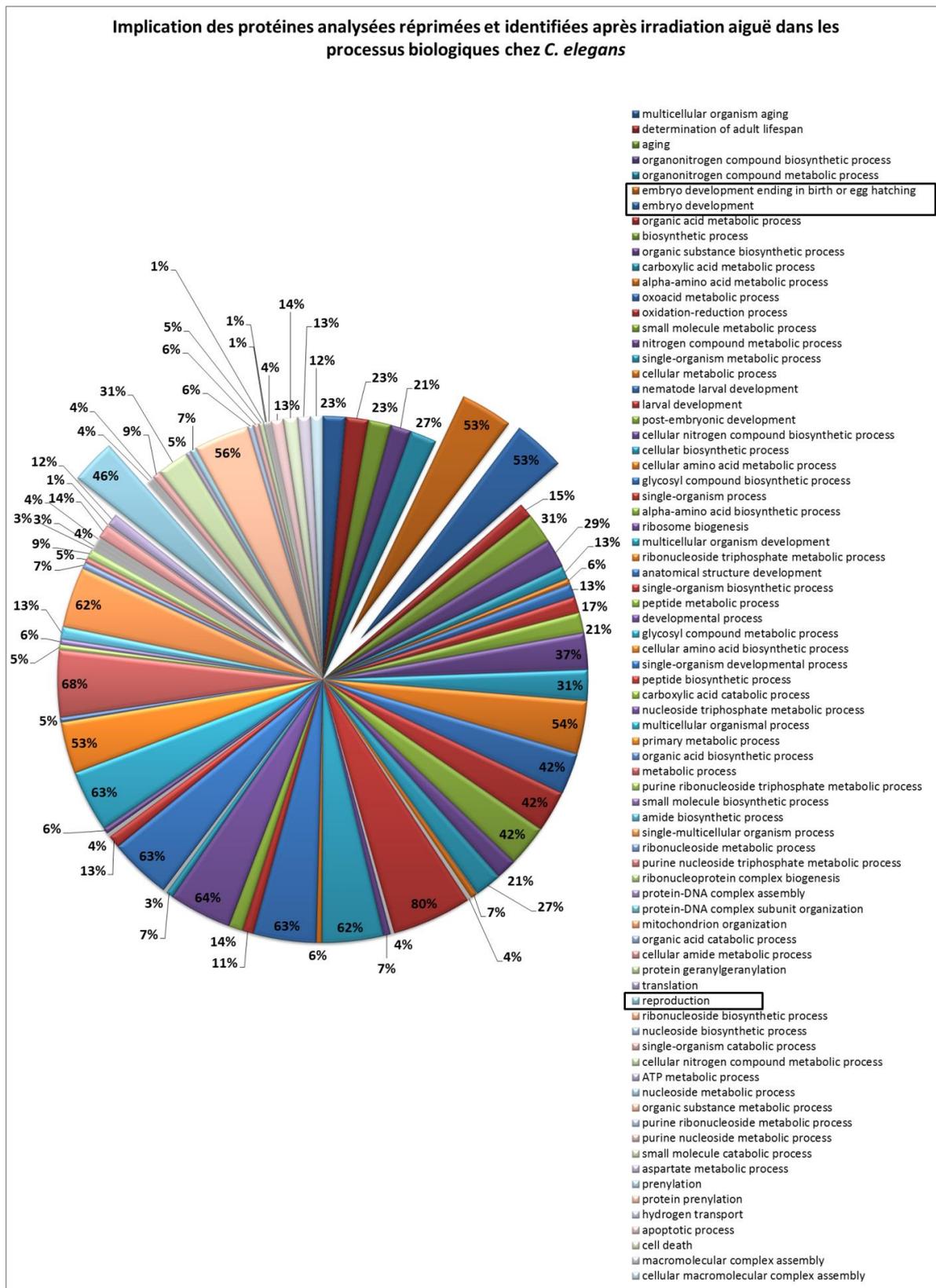


Figure 45: Analyse *via* l'outil DAVID gene des processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines analysées comme réprimées et identifiées après irradiation aiguë. Les processus biologiques relatifs à la reproduction de *C. elegans* sont représentés excentrés, les GOTERM associés sont encadrés. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

Ce diagramme montre que les processus biologiques dans lesquels les protéines analysées comme réprimées semblent être les plus impliquées (*p. values* les plus faibles) sont : les processus impliqués dans la longévité (23% de protéines, *p. value* = 3×10^{-5}), les processus métaboliques (21% de protéines, *p. value* = 5×10^{-5}), le succès d'éclosion (53% de protéines, *p. value* = 1×10^{-4}) et le développement embryonnaire (53% de protéines, *p. value* = 3×10^{-4}).

Alors que l'apoptose est connue pour être induite après irradiation aiguë dès 7,5Gy la figure 45 montre que l'apoptose, *i.e.* mort cellulaire programmée, fait partie des processus biologiques dans lesquels les protéines réprimées font partie après irradiation aiguë (*p. value* = 0,04). Cependant, c'est la protéine SKR-1 qui inhibe la réponse apoptotique qui est retrouvée dans cette analyse, appuyant ainsi les données de la littérature [182].

Afin de déterminer si des protéines sont communes au sein des différentes conditions d'expositions, et ainsi déterminer des marqueurs protéiques pertinents de l'irradiation aiguë, un diagramme de Venn a été réalisé grâce à l'outil Venny 2.1. Ce diagramme est présenté Figure 46. Le cercle bleu représente la condition 0,5Gy, le cercle jaune représente la condition 1Gy et le cercle vert représente la condition 3,3Gy. Les chiffres associés aux pourcentages au sein d'un seul cercle correspondent au nombre de protéines qui sont exclusivement identifiées dans la condition associée au cercle. Enfin, le chiffre associé au pourcentage situé à l'intersection des trois cercles correspond au nombre de protéines qui sont communes entre les trois conditions d'exposition.

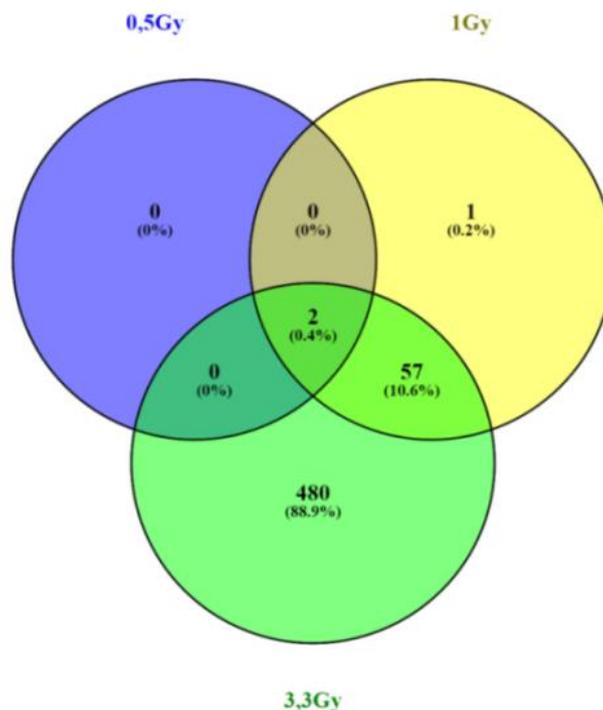


Figure 46: Diagramme de Venn après exposition aiguë.

Ainsi, au vu de ce diagramme, il est notable que seules deux protéines sont communes aux trois conditions d'exposition. Ces deux protéines sont RPS-19 et HAT-1, une protéine ribosomale et une histone acétyltransférase respectivement. Ces deux protéines sont réprimées à 0,5 ; 1 et 3,3Gy par rapport aux témoins. Ceci est intéressant puisque les histones acétyltransférases permettent la décompaction de la chromatine, favorisant ainsi la transcription des gènes [231], mais également la réparation de l'ADN [232]. Il est donc possible que la répression de HAT-1 dès 0,5Gy se traduise par une diminution de l'activité de réparation de l'ADN. Ceci pourrait constituer un début d'explication à la diminution de la reproduction observée après exposition aiguë. De plus, 57 protéines sont communes entre les conditions 1Gy et 3,3Gy, et sont modulées de la même façon entre ces conditions. Ainsi, 47 protéines sont surexprimées et 10 sont réprimées à 1 et 3,3Gy par rapport aux témoins. Le Tableau 18 récapitule les différentes protéines communes (connues et annotées dans les bases de données) entre les différentes doses, leur fonction, et la modulation de leur expression associée pour chacune des doses.

Tableau 18: Liste des 22 protéines parmi les 57 communes entre 1 et 3,3Gy qui sont annotées dans les bases de données de protéomique, ainsi que la modulation de leur expression associée pour chacune des conditions. «--» ou « ++ » signifie que le ratio d'intensité de la protéine entre les conditions d'expositions et les contrôles est inférieur ou supérieur à 2 respectivement.

Id protéine	Fonctions	ID gene	Modulation de l'expression des protéines		
			0,5Gy vs contrôle	1Gy vs contrôle	3,3Gy vs contrôle
Leucine-rich Repeats (LRR) and Calponin Homology (CH) domain homolog		<i>lrch-1</i>		++	++
Inactive angiotensin-converting enzyme-related protein	Nécessaire à la mue du nématode	<i>acn-1</i>		++	++
no mechanoreceptor potential A	Nécessaire à la mue du nématode	<i>noah-2</i>		++	++
SYM-1 protein	Nécessaire à l'axogénèse et à la viabilité des embryons	<i>sym-1</i>		++	++
No mechanoreceptor potential A	Nécessaire à la mue du nématode	<i>noah-1</i>		++	++

GaLactoFuranose synthesis 1	Activité d'oxydo-réduction	<i>glf-1</i>		++	+
Cuticle collagen 14	Nécessaire à la mue du nématode	<i>col-14</i>		++	+
ASpartyl Protease	Activité endopeptidase (orthologue de la cathepsine E chez l'humain)	<i>asp-10</i>		+	+
Transmembrane matrix receptor MUP-4	Nécessaire à l'embryogénèse	<i>mup-4</i>		+	+
TransThyretin-Related family domain	Impliquée dans la migration cellulaire, le développement de la gonade et le développement larvaire	<i>ttr-14</i>		+	+
Lysozyme-like protein 6	Impliquée dans la réponse au stress (infection)	<i>lys-6</i>		+	+
Lysozyme-like protein 5	Impliquée dans la réponse au stress (infection)	<i>lys-5</i>		+	+
C-type LECTin	Impliquée dans le transport	<i>clec-63</i>		+	+
Calponin Homology Domain containing Protein		<i>chdp-1</i>		-	-
GTP cyclohydrolase 1	Impliqué dans la biosynthèse de la sérotonine et de la dopamine qui affecte le mouvement, le comportement d'accouplement, le comportement	<i>cat-4</i>		-	-

	alimentaire et la migration cellulaire.				
Vitellogenine 5	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-5</i>		-	-
Vitellogenine 4	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-4</i>		-	-
Vitellogenine 1	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-1</i>		--	-
Fatty-acid and retinol-binding protein 1	Impliquée dans la liaison aux lipides	<i>far-1</i>		--	--
Vitellogenine 3	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-3</i>		--	-
40S ribosomal protein S19	Protéine structurale du ribosome	<i>rps-19</i>	-	-	--
Histone acetyl transferase 1	Liaison aux histones	<i>hat-1</i>	-	--	--

Il est intéressant de noter ici que les protéines SYM-1 et MUP-4 essentielles au développement embryonnaire sont surexprimées à 1 et 3,3Gy. La baisse du succès d'éclosion observée à partir de 30Gy ne semble pas pouvoir être directement expliquée par la modulation de ces protéines. En revanche, les vitellogénines 1, 3, 4 et 5 font partie des protéines réprimées et communes à 1Gy et 3,3Gy. Chez les nématodes, les vitellogénines sont des protéines qui sont exprimées dans l'intestin et qui sont sécrétées dans l'espace pseudo-cœlomique avant d'être internalisées par les ovocytes en maturation [233]. Ces protéines constituent un stock de réserves nutritives pour les ovocytes, en permettant le transport du cholestérol favorisant ainsi leur maturation [234]. Cependant, ces protéines sont également impliquées dans la longévité de *C. elegans* [235]. En effet, plusieurs études ont montré que la maintenance des processus de reproduction des organismes était liée à une diminution de leur durée de vie en épuisant les ressources nécessaires aux processus favorisant la maintenance somatique. Ainsi, la vitellogénèse, représenterait un coût maternel important pour la reproduction et serait supprimée dans des conditions

environnementales favorisant la prolongation de la durée de vie [235] . Malheureusement les mesures de longévité durant cette thèse n'ont pas pu être menées correctement, des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer le lien entre la modulation de l'expression des vitellogénines et la longévité chez le nématode après irradiation.

Chez le poisson zèbre la vitellogénine est synthétisée dans le foie puis incorporée dans l'ovocyte pour être ensuite clivée en lipovitelline lourde, lipovitelline légère et phosvitine par des enzymes de type cathepsines [236]. Après maturation des cellules germinales, la vitellogénine constitue notamment les réserves énergétiques et métaboliques pour la croissance de l'embryon [237], [238]. Des travaux récents ont démontré que 20 jours de contamination de femelles adultes à des concentrations environnementales d'uranium appauvri entraînaient une diminution de la lyse enzymatique visant à dégrader la vitellogénine au niveau des gonades chez les femelles contaminées. Les auteurs de cette étude suggèrent que cette perturbation liée à une contamination à l'uranium pourrait résulter en une maturation incomplète de l'ovocyte, entraînant *in fine* un potentiel défaut de reproduction chez le poisson zèbre (thèse Eb Levadoux *et al.*, 2017).

Une étude a montré qu'une diminution de l'activité des cathepsines chez *C. elegans* entraînait des défauts de maturation et/ou des changements conformationnels de la vitellogénine [239]. Notre étude a révélé que la protéine CPR-5 (une cathepsine) est surexprimée à 3,3Gy par rapport aux témoins (Annexe 1). Le rôle des cathepsines sur le clivage des vitellogénines chez *C. elegans* est peu documenté, en revanche, la surexpression de CPR-5 pourrait éventuellement constituer un mécanisme de compensation afin de favoriser le clivage des vitellogénines.

La répression des vitellogénines après irradiation aiguë pourrait permettre d'expliquer la baisse de la ponte totale observée dès 30Gy *via* un possible défaut de maturation des ovocytes. De plus, au niveau des mécanismes, et au vu des marqueurs protéiques retrouvés lors de nos analyses, il semblerait qu'il y ait une perturbation de la gamétogénèse. En effet, la répression des vitellogénines pourraient correspondre à une affection précoce des voies de régulation impliquées dans la reproduction de *C. elegans*.

3. Synthèse et discussion : lien entre effets à l'échelle moléculaire et la baisse de reproduction après irradiation aiguë.

L'analyse protéomique ainsi que l'analyse des dommages et de la dégradation des protéines ont permis d'identifier de potentiels mécanismes pouvant expliquer le déclin de la reproduction observé à partir de 30Gy.

Le niveau global de protéines carbonylées ne semble pas être lié directement au déclin de la reproduction observé. Cependant, comme détaillé dans la partie résultats de ce chapitre, il existe un lien entre l'apoptose et l'activité du protéasome. L'inhibition de l'activité du protéasome entraînerait une augmentation de l'apoptose *via* l'accumulation de protéines pro-apoptotiques. Dans notre étude, l'activité du protéasome est inhibée dès 0,5Gy, et

certaines protéines impliquées dans le rétrocontrôle négatif de l'apoptose de la lignée germinale chez *C. elegans* sont réprimées après irradiation aiguë, ceci dès 0,5Gy pour certaines, comme précédemment montré à partir de 7,5Gy d'irradiation aiguë [182]. Finalement, la baisse de l'activité du protéasome pourrait donc être corrélée avec une augmentation de l'apoptose. Il est également possible que le blocage du protéasome constitue un mécanisme de défense cellulaire pour éviter la dégradation de protéines impliquées dans l'apoptose. De plus, la répression de la protéine HAT-1, impliquée entre autre dans la réparation de l'ADN, pourrait permettre d'émouvoir des hypothèses sur la baisse du succès d'éclosion observée. En effet, il est possible que les dommages localisés dans la lignée germinale de *C. elegans* suite à l'irradiation ne soient pas totalement réparés et transmis aux embryons, expliquant alors possiblement la baisse du succès d'éclosion. Ainsi, la modulation de l'activité du protéasome, l'expression de SKR-1 impliquée dans l'apoptose à partir de 0,5Gy, et la répression de HAT-1 pourraient constituer des marqueurs précoces des effets de l'irradiation chez *C. elegans*.

De plus, l'analyse protéomique a permis d'identifier une modulation après irradiation de protéines impliquées dans la reproduction et la longévité de *C. elegans*, en particulier les vitellogénines, qui sont réprimées après irradiation aiguë dès 1Gy. Comme précédemment discuté dans ce chapitre, la répression des vitellogénines, pourrait être à l'origine d'un défaut de maturation des ovocytes, entraînant *in fine* une baisse de reproduction de *C. elegans* après exposition aiguë.

II. Résultats et discussion sur l'irradiation chronique

Comme présenté dans la partie A de ce manuscrit, de précédents travaux de thèse ont montré que la reproduction de *C. elegans* était impactée à partir de 3,3Gy (débit de dose de 51mGy.h⁻¹) [143]. De plus, il a été montré dans la littérature, qu'il existait une augmentation de radiosensibilité (baisse du nombre de progéniture par individu) chez le nématode au fil des générations exposées à 2,5Gy d'irradiation chronique (dose cumulée reçue par génération ; débit de dose de 37mGy.h⁻¹) [240]. Ce résultat a été confirmé par une autre étude réalisée au laboratoire pour un débit de dose plus fort (51mGy.h⁻¹). En effet, il existe une augmentation de la radiosensibilité (diminution significative du nombre de descendants par individus) au fil des générations exposées mais celle-ci est plus importante chez les générations placées en environnement contrôle (I. Nosel ; communication personnelle).

Ainsi, tout comme pour l'irradiation aiguë, afin d'élucider les mécanismes moléculaires associés aux effets induits à l'échelle de l'individu, des expérimentations d'irradiation chronique du stade œuf jusqu'au stade L4-JA ont été réalisées sur une large gamme de dose, incluant des doses pour lesquelles aucun impact sur la reproduction du nématode n'a été détecté. La reproduction du nématode a été mesurée après irradiation chronique de 3 à 6,5Gy.

Les dommages aux protéines (*ie.* carbonylation), leur localisation, leur dégradation (*via* le protéasome) et leur expression ont été mesurés. La sensibilité de chacun de ces marqueurs a ensuite été évaluée *vis-à-vis* de la reproduction, qui est pour rappel le paramètre individuel le plus radiosensible. De plus le niveau global de protéines carbonylées a été mesuré pour les individus issus de l'exposition multigénérationnelle réalisée précédemment au laboratoire (I. Nosel).

1. Effets à l'échelle individuelle

a. Ponte totale par individus

Comme présenté en Figure 47 la ponte totale par individu est significativement impactée à partir de 3,3Gy (dose cumulée) et ce jusqu'à 6,5Gy par rapport aux nématodes non exposés.

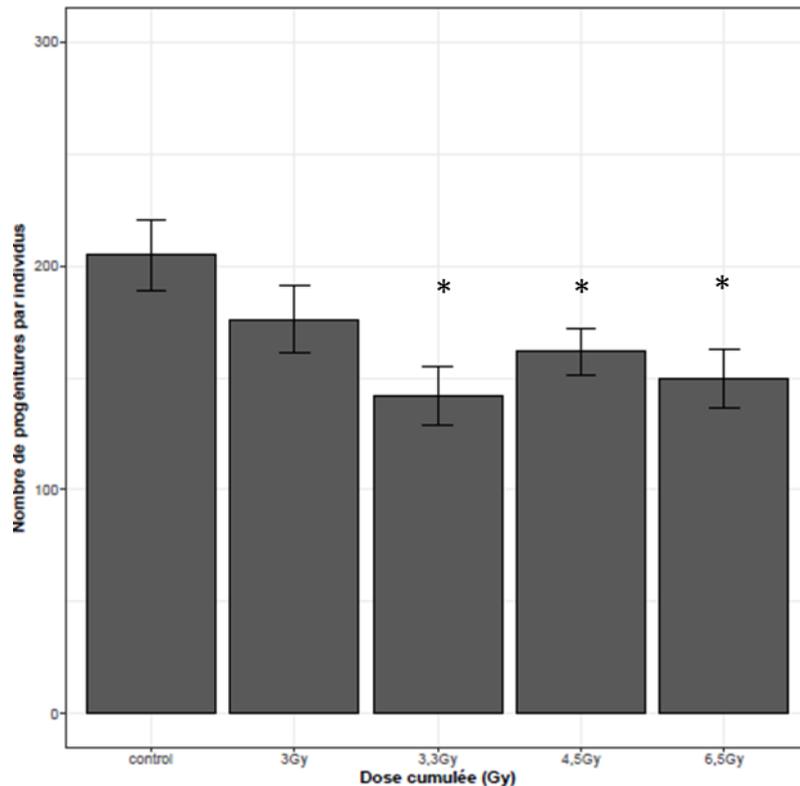


Figure 47 : Ponte totale par individu en fonction de la dose reçue d'exposition chronique (des doses cumulées de 3 à 6,5Gy ; débits de doses de 45 à 100mGy.h⁻¹) chez *C. elegans* exposé du stade œuf au stade L4-JA (65h d'exposition). N=20. Les données sont exprimées comme la moyenne du nombre de progénitures par individu (n) ± écartype de la moyenne. Les différences statistiques significatives sont représentées (test de Dunnet) : *P<0.05, **P<0.01, ***P<0,001.

Ces résultats concordent avec une étude antérieure qui a démontré qu'il existait une diminution du nombre de descendants par individus à partir de 4Gy d'irradiation gamma chronique, et que cet effet perdurait et s'aggravait jusqu'à la troisième génération exposée (dès 2,5Gy) [143].

Les hypothèses associées à ces résultats seraient que des défauts de la lignée germinale (par exemple dommages à l'ADN) peuvent entraîner une augmentation de l'apoptose [182], [240], induisant alors une baisse de la ponte totale chez les nématodes exposés. Ces données suggèrent que la gamétogénèse est impactée après irradiation chronique. Afin de tester si l'embryogénèse est également impactée, le succès d'éclosion a également été évalué après irradiation.

b. Taux d'éclosion

Quelles que soient les doses cumulées testées, le succès d'éclosion des œufs pondus par les nématodes exposés de façon chronique aux rayonnements gamma n'est pas significativement impacté (données non montrées).

Ceci est pertinent avec une précédente étude qui a montré que le succès d'éclosion n'était pas impacté après irradiation chronique du stade œuf jusqu'au stade L4-JA de 2,5Gy à 22Gy (doses cumulées) [143].

c. Discussion

D'autres études ont mis en évidence une reprotoxicité d'une exposition chronique aux rayonnements gamma chez d'autres organismes que *C. elegans*. Ces études ont révélé une diminution de la ponte totale par individus ainsi qu'une diminution du succès d'éclosion chez *Ophryotrocha diadema*, *Neanthes arenaceodentata*, *Daphnia magna* et *Eisenia fetida* exposées à $0.19\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, $13.7\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, $31\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ et $43\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement [125], [134], [135]. Ces études suggèrent que dans le cas d'expositions chroniques, il existe une accumulation des dommages à l'ADN dans les cellules qui n'ont pas encore commencé leur division, et que ces dommages sont transmis lors des divisions cellulaires après la fertilisation [134]. Néanmoins, les organismes cités précédemment ont des modes de reproduction et des périodes de gamétogénèse différents de ceux de *C. elegans*. Dans ces travaux de thèse, l'effet sur la ponte totale par individu dès 3,3Gy et l'absence d'effet sur le succès d'éclosion peuvent être expliqués par un phénomène d'apoptose accru pour les gamètes endommagés, induisant leur diminution et une baisse de la ponte totale. En revanche les gamètes non endommagés quant à eux peuvent continuer leur maturation jusqu'à leur fertilisation pour former des embryons viables.

2. Effets sur le protéome

a. Dommages aux protéines-Etude de la carbonylation

Etant donné qu'aucune étude n'existe sur la sensibilité du marqueur carbonylation des protéines après irradiation chronique, le niveau de protéines carbonylées a été mesuré après irradiation chronique multidose (de 0,5 jusqu'à 6,5Gy ; débits de dose de 7 jusqu'à $100\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$). Le but de cette étude était de déterminer si ce marqueur est sensible et/ou précoce par rapport aux paramètres de reproduction mesurés après irradiation chronique. De plus, afin de déterminer la localisation préférentielle des carbonyles après irradiation chronique, l'imagerie des carbonyles sur organisme entier, a été réalisée. Cependant, le groupe carbonyle est un motif chimique susceptible d'être présent dans plusieurs biomolécules de l'organisme, e.g. ADN, lipides, protéines, une colocalisation avec ces biomolécules discriminées a donc dû être effectuée pour extraire le seul signal protéique.

i. Etude du niveau global de protéines carbonylées

1.1. Sur une génération

Le niveau de protéines carbonylées a été mesuré après irradiation chronique multidose. Comme le montre la Figure 48 aucune différence significative n'a été observée sur le niveau de protéines carbonylées après irradiation chronique de 0,5 à 6,5Gy par rapport aux témoins.

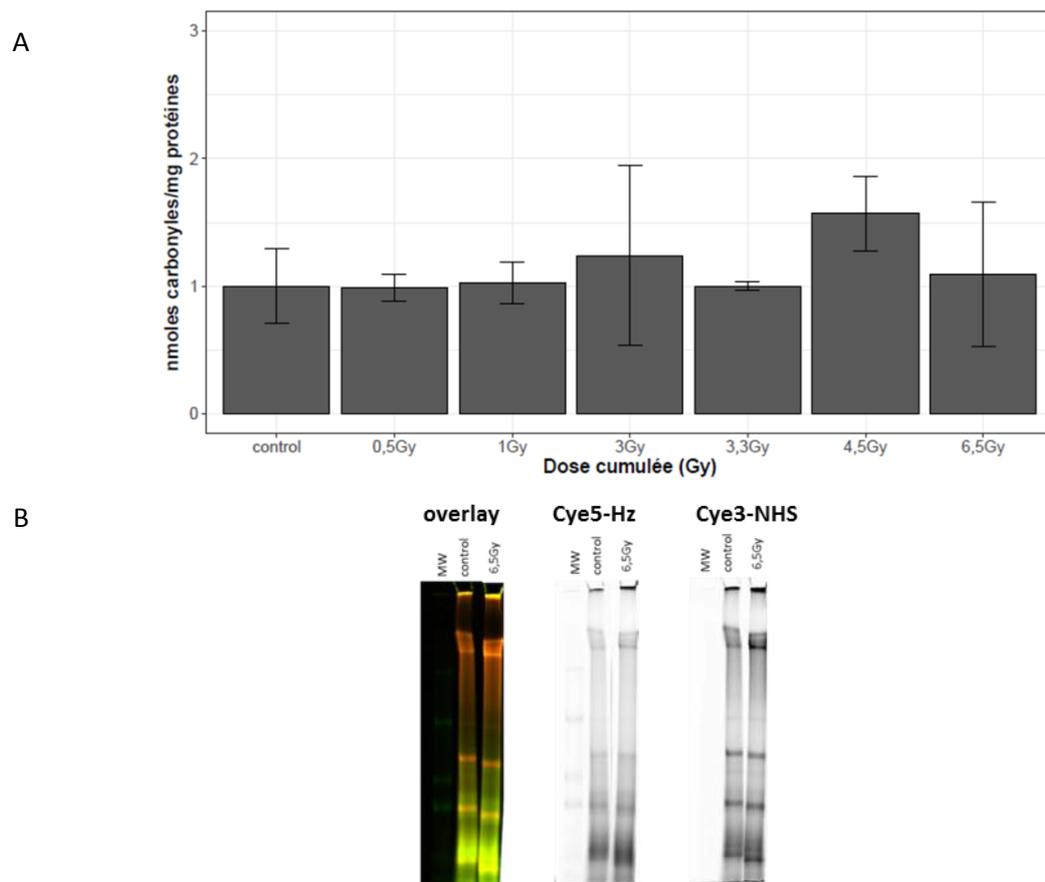


Figure 48 : A/Courbe dose-réponse du niveau de protéines carbonylées après irradiation gamma chronique de 0,5Gy à 6,5Gy (doses cumulées). Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 6,5Gy pendant 65heures puis collectés. N=3 (pool de 1000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau de protéines carbonylées relatif aux contrôles (nmoles de carbonyles/mg de protéines) \pm écartype standard. B/Signal obtenu sur gel après analyse sur un scanner laser (Typhoon FLA9500). « Overlay » correspond à la superposition des deux canaux : cye5-Hz et cye3-NHS ; « cye5-Hz » correspond au signal carbonyles et « cye3-NHS » correspond au signal protéines totales. Pour chacune des images, le signal du marqueur de poids moléculaire est situé à gauche, le signal issu des nématodes contrôles est situé au milieu ; et le signal issu des nématodes exposés à 6,5Gy d'irradiation chronique est situé à droite.

Cette absence d'effets sur le niveau de protéines carbonylées après irradiation chronique peut signifier qu'il existe des mécanismes de protéolyse qui se mettent en place pendant le cycle de vie du nématode, en réponse à l'exposition aux rayonnements gamma. De plus, il a été vu précédemment que le stade de vie qui présente le niveau basal de protéines carbonylées le plus faible est le stade L4-JA, or c'est à ce stade de vie que les nématodes ont été collectés puis analysés post-irradiation. Comme présenté précédemment dans ce chapitre, il est possible qu'au stade L4-JA, les systèmes de protéolyse soient optimums afin de dégrader les protéines endommagées.

1.2. Sur plusieurs générations

Nous avons eu l'opportunité de mesurer le taux de protéines carbonylées sur les différents groupes de nématodes issus d'une exposition multigénérationnelle à 3,3Gy (dose cumulée

reçue par génération, débit de dose de $51\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$) (F0 (génération parentale), F1 (2^{ème} génération), F2 (3^{ème} génération) et F3 (4^{ème} génération)). Pour des raisons d'effectif, le niveau de protéines carbonylées a été mesuré *in situ* en utilisant la méthode développée par Kuzmic *et al* [201]. Les résultats de cette analyse sont présentés en Figure 49.

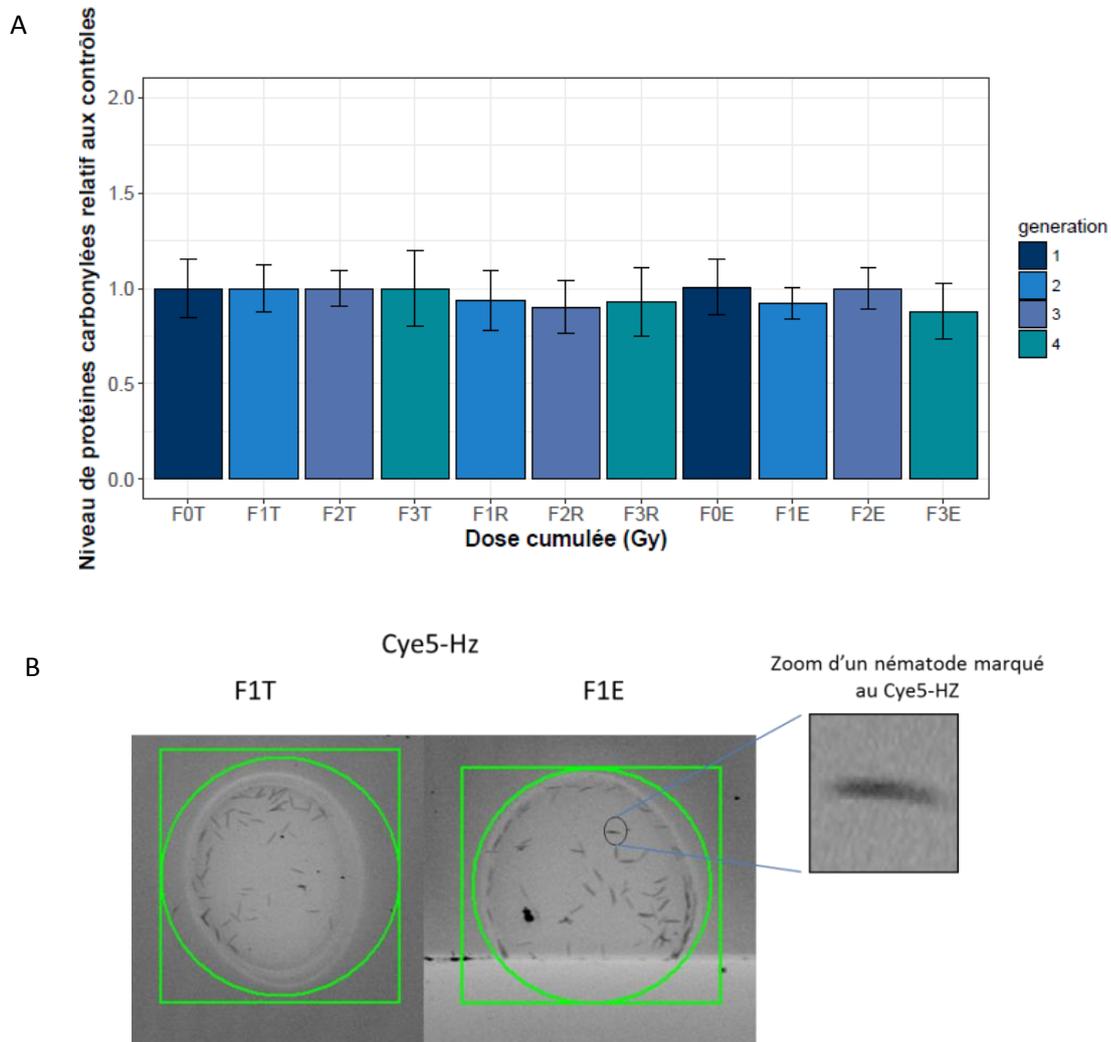


Figure 49 : A/Niveau de protéines carbonylées chez les *C. elegans* irradiés relatif aux contrôles respectifs, après exposition multigénérationnelle. Les histogrammes bleus foncés représentent la génération parentale (F0), les bleus ciel représentent la deuxième génération (F1E : continuellement exposée ; et F1R : placée en environnement contrôle issu de F0 exposée), les bleus clairs représentent la troisième génération (F2E : continuellement exposée ; et F2R : placée en environnement contrôle issus de F0 exposée) et les verts représentent la quatrième génération (F3E : continuellement exposée ; et F3R : placée en environnement contrôle issus de F0 exposée). Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 15heures, irradiés à $3,3\text{Gy}$ ($51\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$). $N=300$ (100 nématodes par réplicat). Les données sont exprimées comme la moyenne des ratio entre l'intensité de fluorescence en cye5 (carbonyles) exposé / l'intensité de fluorescence en cye5 (carbonyles) contrôles \pm écartype standard. B/ Exemple de signal obtenu sur lame après scan sur le canal en cye5, utilisé pour l'analyse. Sur le panel de gauche : signal cye5-Hz correspondant aux carbonyles des nématodes contrôles issus de la 2^{nde} génération et sur le panel de droite : signal cye5-Hz correspondant aux carbonyles des nématodes issus de la 2^{nde} génération continuellement exposée. Le zoom est un exemple de nématode marqué au cye5-Hz.

Tout d'abord, il n'existe pas de différences significatives au sein des différents groupes contrôle sur l'ensemble des générations, ce qui montre qu'il n'y a pas eu d'évolution de la souche de nématodes au fil des générations. Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes, ce qui indique que l'augmentation de radiosensibilité observée au fil des générations décrite dans la littérature ne peut pas être corrélée à une augmentation de production de protéines carbonylées chez les générations continuellement exposées, mais plutôt à une augmentation de l'apoptose, une baisse du nombre de spermatozoïdes et un arrêt du cycle cellulaire [143]. Dans le cas des protéines carbonylées, une récente étude a démontré qu'il existait une réinitialisation du niveau de protéines carbonylées dans la lignée germinale de *C. elegans* et particulièrement durant la phase de maturation des ovocytes [32]. Par conséquent, les auteurs de cette étude soulignent que les dommages aux protéines ne sont pas transmis aux générations futures. Une des explications à la baisse du nombre de progénitures observée au fil des générations exposées et placées en environnement contrôle est que les nématodes continuellement exposés continuent à accumuler des dommages au fil des générations, tandis que les nématodes placés en environnement contrôle, n'ont que les effets correspondant aux lésions issues de l'exposition parentale.

1.3. Bilan

En conclusion sur le niveau global de protéines carbonylées, toutes expériences confondues, les résultats n'ont montré aucune corrélation dose-dépendante entre les niveaux de protéines carbonylées et le déclin de la reproduction du nématode après irradiation chronique. En effet, la ponte totale par individu est impacté dès 3,3Gy et de manière dose-dépendante. Le niveau de protéines carbonylées en revanche n'est absolument pas modulé par l'irradiation. Par conséquent, le niveau de protéines carbonylées ne semble être directement lié au déclin de la ponte totale observé après irradiation chronique.

ii. Localisation des carbonyles in situ

L'étude de la colocalisation des carbonyles avec les biomolécules de l'organisme *via* l'évaluation du coefficient de Pearson [201], a montré que ceux-ci était préférentiellement présents au niveau des protéines après irradiation gamma chronique (données non montrées). Cependant, la Figure 50 représente les images acquises au microscope confocal (LSM 780 Carl Zeiss, France) pour chacune des molécules fluorescentes correspondant aux carbonyles, protéines, ADN et lipides, ainsi que l'intensité du signal associé. Seules les images acquises pour les conditions contrôles et 6,5Gy sont présentées ici, car aucune différence de signal n'a été observée entre les témoins et 3Gy et 4,5Gy.

Objectif X10	Cye5 : signal carbonyles	Cye3 : signal protéines	Dapi : signal ADN	Bodipy : signal lipides
Contrôle 1	 541 ± 164	 667 ± 345	 164 ± 57	 236 ± 40
Contrôle 2	 507 ± 102	 594 ± 220	 267 ± 187	 166 ± 48
Contrôle 3	 422 ± 68	 692 ± 293	 213 ± 77	 228 ± 51
6,3Gy (1)	 443 ± 35	 638 ± 269	 108 ± 32	 222 ± 34
6,3Gy (2)	 385 ± 57	 359 ± 39	 165 ± 23	 213 ± 25
6,8Gy (3)	 505 ± 61	 580 ± 65	 122 ± 30	 44 ± 8

Figure 50 : Images acquises au microscope confocal pour chacune des molécules fluorescentes associées à la détection des carbonyles (Cy5), protéines (Cy3), ADN (DAPI) et lipides (BODIPY). Les images ont été acquises avec un objectif X10. N= 45 (15 nématodes par réplicat). Dans la 1^{ère} colonne, figurent les doses ; les chiffres entre parenthèses correspondent au réplicat biologique utilisé. Les encadrés correspondent à la moyenne des intensités du signal pour chacune des biomolécules ± écartype standard.

Aucune différence significative entre les contrôles et les exposés n'a été montrée en ce qui concerne les signaux carbonyles, ADN et protéines. En revanche, une baisse du signal pour les lipides est observée pour le troisième réplicat de la condition 6,5Gy. Les résultats de dosimétrie présentés dans la partie C de ce manuscrit, ont permis de déterminer que ce troisième réplicat avait reçu une dose cumulée plus importante que les deux autres réplicats biologiques. En effet, la dose cumulée moyenne des deux premiers réplicats était de 6,3 Gy ($\pm 0,2$), tandis que la dose cumulée moyenne au troisième réplicat était de 6,8 ($\pm 0,1$). Ceci, pourrait expliquer pourquoi une baisse des lipides est observée à 6,8Gy.

Plusieurs études font le constat d'une diminution du niveau de lipides après irradiation gamma sur différentes espèces [241], [242]. Particulièrement il a été montré sur cellules lymphoïdes humaines que l'exposition aiguë aux rayonnements ionisants entraînait une augmentation de la synthèse du cholestérol jusqu'à 4Gy puis entraînait une diminution de sa synthèse de 4 jusqu'à 10Gy [241]. De plus, une diminution des niveaux triglycérides est observée chez la noix de muscade exposée à de très fortes doses d'irradiation aiguë (5000Gy) [242]. Il est possible que la peroxydation des lipides après irradiation aiguë soit à l'origine de cette baisse des niveaux de lipides [61]. Cependant, aucune étude à notre connaissance ne traite de la modulation des niveaux de lipides après irradiation chronique et l'étude de colocalisation et d'imagerie des lipides n'a pas pu être réalisée après irradiation aiguë durant cette thèse, il est donc difficile de comparer ces résultats entre les deux modes d'exposition.

Cependant, dans la littérature, le phénomène contraire, accumulation des lipides au niveau du corps entier, est observé chez des nématodes dépourvus de cellules souches germinales [243]. En effet, les lipides chez *C. elegans* sont transportés de l'intestin par des protéines (de type vitellogénine) puis internalisés par les ovocytes en cours de maturation [243]. Au vu de cette étude, l'accumulation de lipides dans les protéines les transportant serait notamment responsable de l'activation d'un facteur de transcription, SKN-1, pour dégrader les lipides transportés [243]. Les mécanismes spécifiques d'activation et de régulation de SKN-1 sont à ce jour peu connus, mais SKN-1 est également impliquée dans la réponse à différents stress (stress oxydatif et stress xénobiotique) et régule, en conditions normales, l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus incluant la détoxification, la résistance au stress, les fonctions lysosomale et protéasomale et le métabolisme [244].

Notre étude, bien qu'à prendre avec beaucoup de précaution, suggère qu'il existe une baisse du niveau de lipides à 6,8Gy d'irradiation chronique. Afin de valider ces résultats une étude par microscopie électronique à transmission est en cours afin de comparer les niveaux de lipides entre des individus issus d'exposition chronique et des individus témoins. Il est donc possible que la voie de régulation SKN-1 soit impliquée dans la réponse à l'irradiation chronique à partir de 6,8Gy pour dégrader les lipides, afin d'éviter leur accumulation dans les tissus somatiques. En revanche, des études complémentaires seront nécessaires afin d'évaluer le rôle précis de SKN-1 dans la réponse à l'irradiation chronique.

iii. Nature des protéines carbonylées après irradiation chronique sur une génération de nématodes

De la même manière que pour l'irradiation aiguë, afin de déterminer si certaines protéines sont plus ou moins carbonylées pour *in fine* déterminer en fonction de leur nature, l'impact possible sur la reproduction du nématode, une expérience de 2D-OxyDIGE a été réalisée sur une dose pour laquelle aucun impact sur la reproduction n'est détecté en chronique, à savoir 2,5Gy. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Medils (MEDiterranean Institute for Life Science-Split-Croatie). Les résultats issus de cette expérience sont toujours en cours d'analyse.

iv. Bilan

Aucun effet sur le taux de protéines carbonylées n'a été observé après irradiation chronique de 0,5 à 6,5Gy (dose cumulée). Ceci laisserait penser que les systèmes de dégradation des protéines endommagées fonctionnent de façon optimale. Pour la dégradation des dommages aux protéines, c'est la protéolyse cellulaire qui est concernée, notamment par l'activité du protéasome.

b. Activité du protéasome

Pour évaluer l'activité globale du protéasome [245] et examiner l'impact d'une irradiation chronique tout en préservant les échantillons pour l'étude des différentes formes du protéasome, seuls les extraits présentant les plus fortes concentrations protéiques ont pu être mesurés, à savoir les conditions contrôles, 3Gy, 4,5Gy et 6,5Gy. Cette activité est mesurée en analysant la cinétique de dégradation d'un peptide fluorescent, avec et sans inhibiteur du protéasome. Les courbes de cinétique de dégradation de ce peptide sont présentées Figure 51.

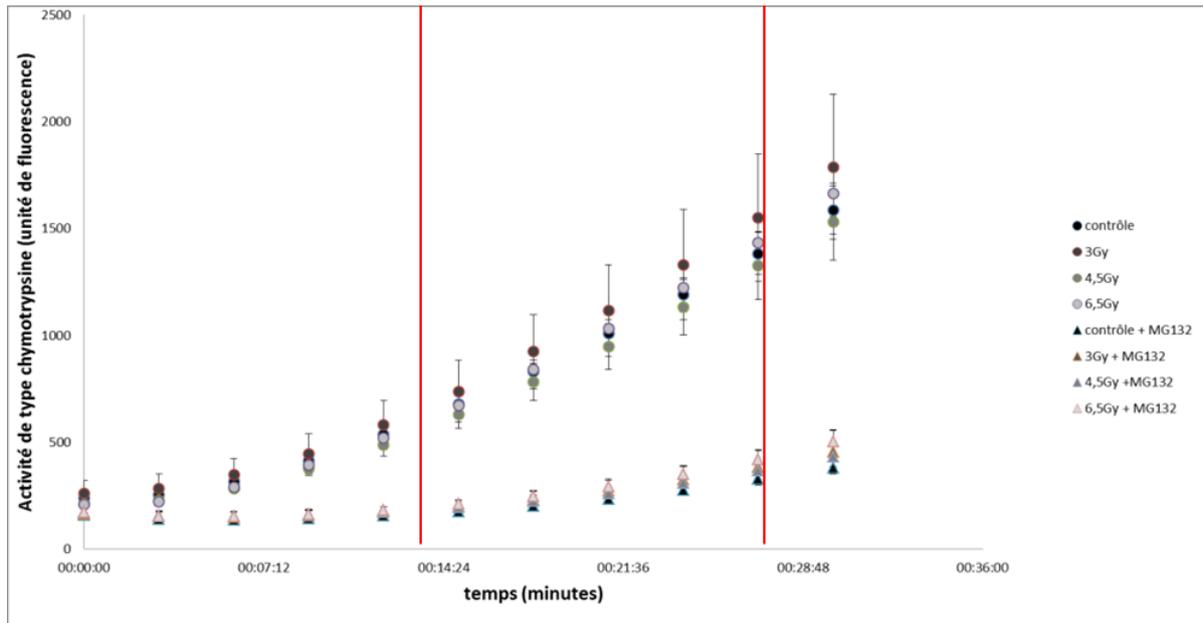


Figure 51: Activité globale du protéasome mesurée en microplaque. Hydrolyse du peptide LLVY-AMC pendant 30 minutes à 37°C. Les points représentent l'activité totale dans les extraits protéiques (LLVY-AMC) et les triangles représentent l'activité résiduelle en présence de 20µM de MG132. Les données sont exprimées comme la moyenne de l'activité globale du protéasome (unité de fluorescence/minute) \pm écart type moyen de la moyenne. Les traits rouges correspondent aux bornes fixées pour la partie linéaire des courbes (entre 14min et 28min).

La Figure 51 montre que les courbes de cinétiques de dégradation du peptide en présence d'inhibiteur du protéasome présentent des pentes inférieures dans la partie linéaire des courbes c'est-à-dire entre 14 minutes et 28 minutes (pentes entre 18240 et 23568) à celles des courbes de dégradation du peptide sans inhibiteur du protéasome (pentes entre 83680 et 94560). Les résultats de cette mesure avec et sans inhibiteur du protéasome montrent une inhibition de 75% (± 3) de l'activité du protéasome dans les extraits protéiques de nématodes traités avec inhibiteur, ce qui atteste de la spécificité du substrat.

Afin de déterminer l'activité globale du protéasome dans les extraits protéiques, la différence entre l'activité mesurée dans les extraits dépourvus d'inhibiteur du protéasome et l'activité résiduelle en présence d'inhibiteur a été calculée.

L'activité globale du protéasome est présentée Figure 52.

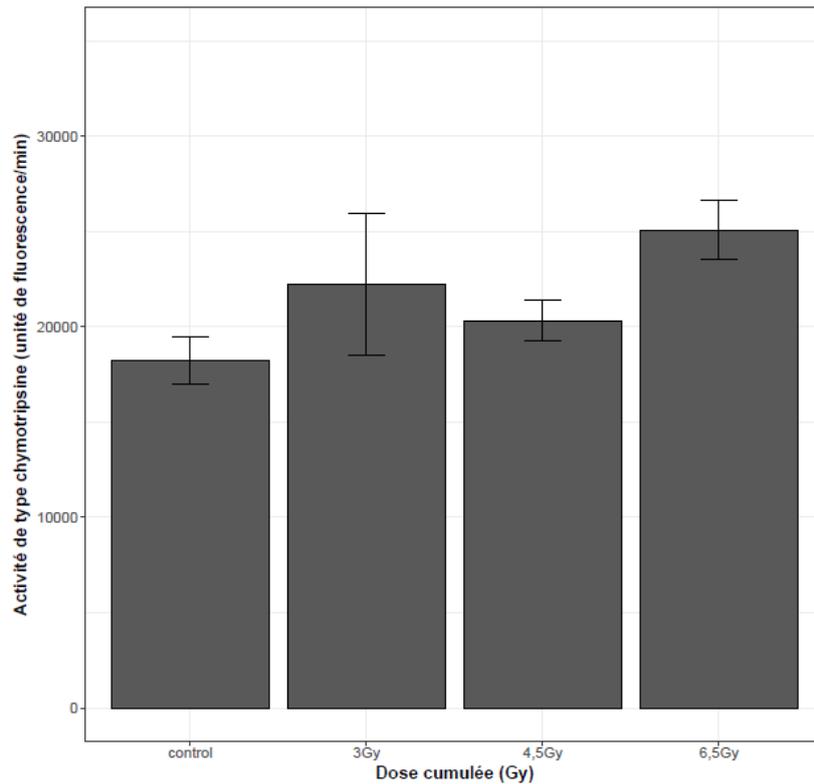


Figure 52 : Activité globale du protéasome mesurée en microplaque. Hydrolyse du peptide LLVY-AMC pendant 30minutes à 37°C. L'activité spécifique du protéasome a été déterminée comme la différence entre l'activité totale dans les extraits protéiques et l'activité résiduelle en présence de 20µM de MG132. Les données sont exprimées comme la moyenne de l'activité globale du protéasome (unité de fluorescence/minute) ± écartype moyen de la moyenne.

Les résultats présentés Figure 52 ne montrent pas d'impact significatif de l'irradiation chronique sur l'activité globale du protéasome par rapport aux nématodes non irradiés. Cependant, une légère augmentation est observée en particulier pour les conditions d'exposition 3Gy et 6,5Gy (*p. values* respectives 0,8 et 0,2).

Afin de raffiner l'analyse sur l'activité du protéasome après irradiation chronique, les trois formes du protéasome ont été séparées sur gel natif et leur activité a été mesurée. Les résultats de la quantification des activités des trois formes du protéasome (30S, 26S et 20S) mesurées sur gel natif sont présentées en Figure 53A. La Figure 53B représente le signal d'activité de ces trois formes obtenu sur gel natif pour les nématodes témoins et pour les nématodes exposés à 1Gy d'irradiation chronique.

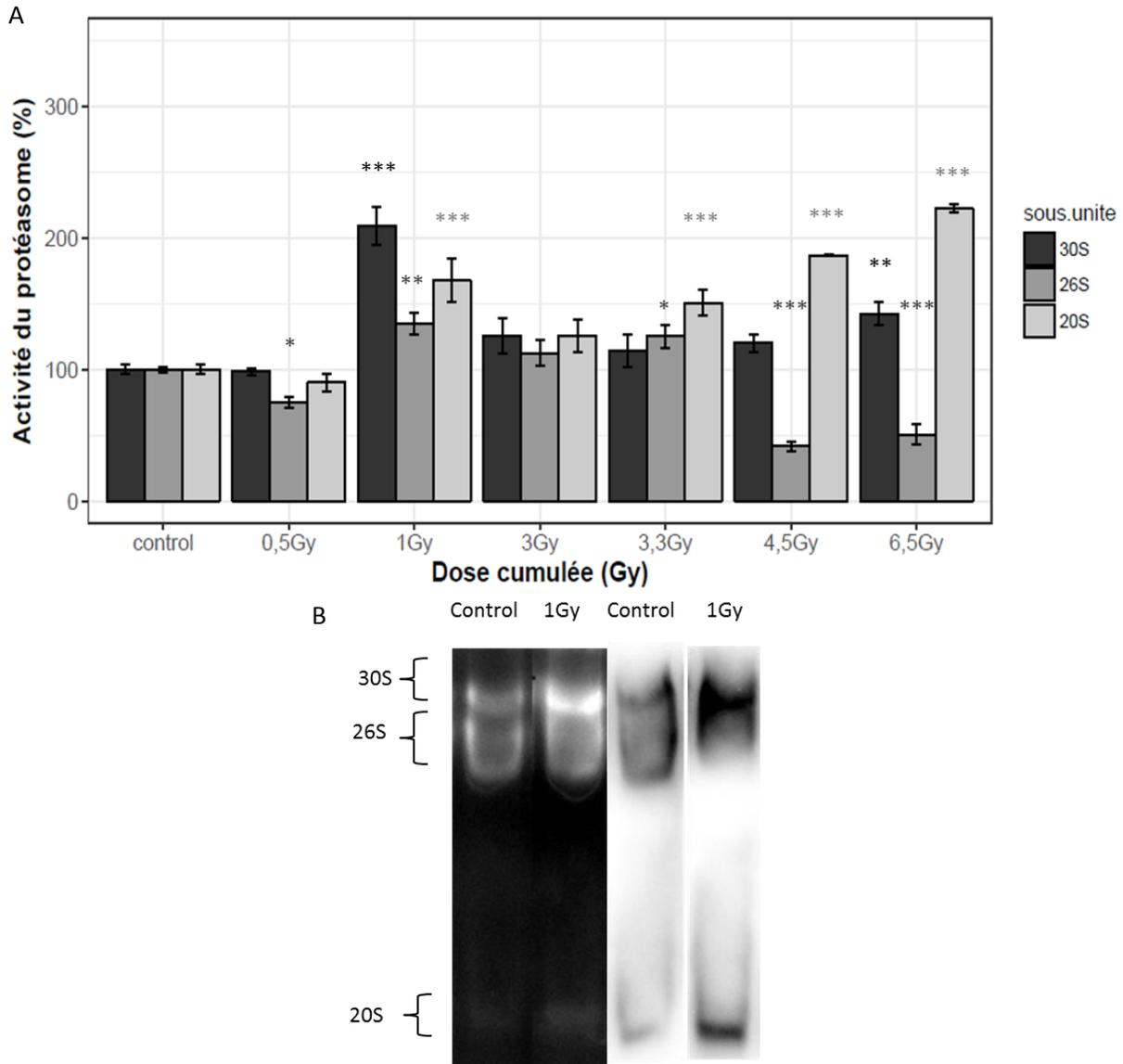


Figure 53 : A/Courbe dose-réponse de l'activité de la sous-unité 30S (histogramme noir), 26S (histogramme gris foncé) et 20S (histogramme gris clair) après irradiation gamma chronique de 0,5Gy à 6,5Gy. Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 6,5Gy (doses cumulées). N=3 (pool de 3000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne de l'activité du protéasome relatif aux témoins (% d'activité) \pm erreur type de la moyenne. Les différences statistiques significatives sont représentées (test de Dunnet) : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0,001$. B/Electrophorèse sur gel natif, suivi par la mesure sur gel de l'activité des protéasomes 30S, 26S et 20S (panel de droite) et niveaux d'expression des protéasomes 30S 26S et 20S par Westernblot (panel de droite). Pour chaque image, sur le panel de gauche : Signal issu des nématodes témoins (définis comme 100% d'activité) et sur le panel de gauche : signal issus des nématodes exposés à 1Gy d'irradiation chronique.

Comme présenté dans la Figure 53A, il est observé une augmentation significative par rapport aux témoins de l'activité du protéasome 30S à 1Gy et à 6,5Gy (p . values respectives = 1.2×10^{-7} , 8×10^{-3}), et de l'activité du 26S à 1Gy et 3,3Gy (p . values respectives = 1×10^{-3} ; 0,1). De plus, une diminution significative du 26S est observée à 0,5Gy, 4,5Gy et 6,5Gy (p . values respectives = 0.01, 3×10^{-6} , 2×10^{-5}). L'activité du protéasome 20S quant à elle

augmente de manière dose-dépendante à partir de 1Gy par rapport aux vers non exposés (*p. values* respectives = 1×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-2} , 2×10^{-7} , 5×10^{-9}).

En complément de la mesure de l'activité du protéasome sur gel natif, une analyse des niveaux d'expression du protéasome a été réalisée par Western Blot. En raison d'une mauvaise révélation des membranes par chimiluminescence pour la deuxième série de contrôles (correspondant aux conditions 3, 4,5 et 6,5Gy) sur les formes 30S et 26S, seuls les niveaux d'expression du 20S ont pu être normalisés par rapport aux témoins sur l'ensemble de la gamme d'irradiation de 0,5 à 6,5Gy. En revanche, les niveaux d'expression des 30S et 26S après irradiation de 0,5 à 1Gy n'ont pu être analysés et normalisés par rapport aux témoins respectifs que pour la première série d'irradiation (correspondant aux conditions contrôle, 0,5 et 1Gy). Les résultats issus de cette analyse sont présentés Figure 54.

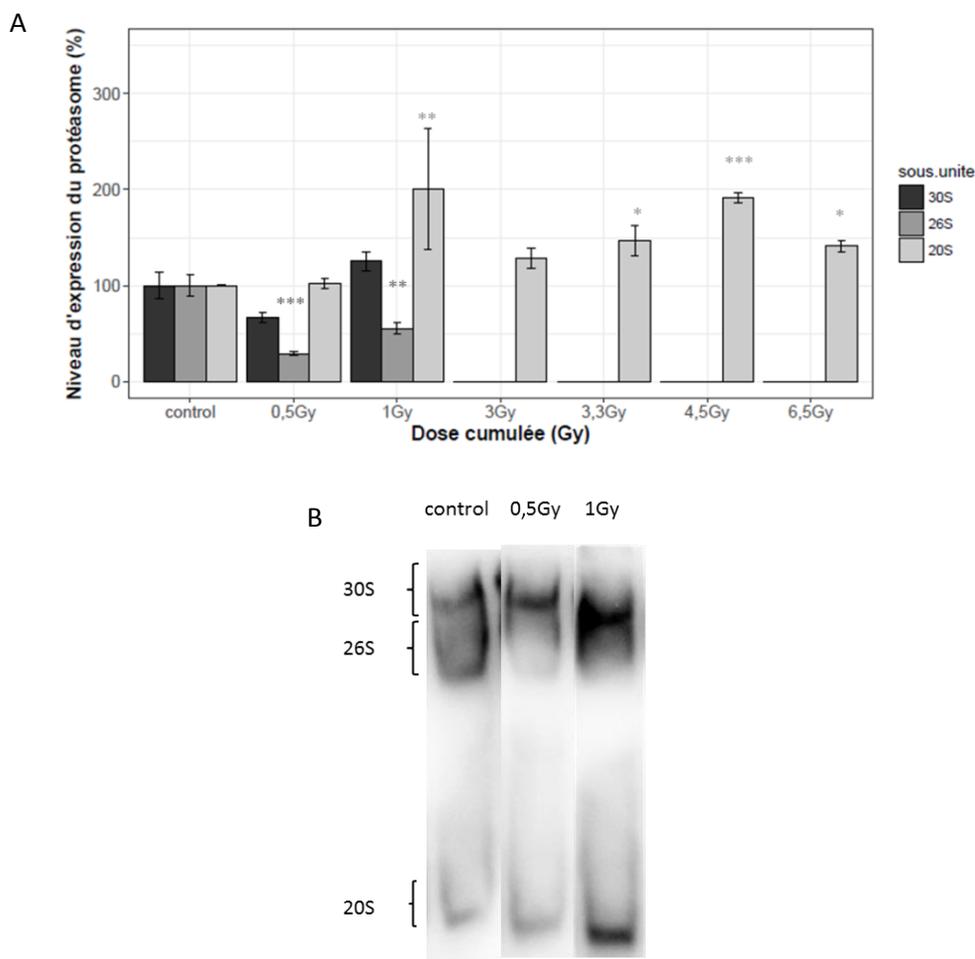


Figure 54 : A/ Courbe dose-réponse des niveaux d'expression des trois formes du protéasome après irradiation gamma chronique de 0,5Gy à 6,5Gy(20S) et de 0,5 à 1Gy (30S et 26S). Les nématodes utilisés dans cette expérience ont été synchronisés sur 3heures, irradiés de 0,5Gy à 6,5Gy (doses cumulées). N=3 (pool de 3000 nématodes). Les données sont exprimées comme la moyenne du niveau d'expression de la sous-unité 20S relatif aux témoins (% de niveau d'expression) \pm erreur type de la moyenne. B/ Niveaux d'expression des protéasomes 30S 26S et 20S par Westernblot Pour chaque image, sur le panel de gauche : Signal issu des nématodes témoins (définis comme 100% d'activité), panel du milieu : Signal issu des nématodes exposés à 0,5Gy et sur le panel de gauche : signal issus des nématodes exposés à 1Gy d'irradiation chronique.

L'analyse du signal des différentes conditions sur la membrane de Western Blot (Figure 54) a montré que le niveau d'expression du protéasome 20S augmentait à 1 ; 3,3 ; 4,5 et 6,5Gy (*p. values* respectives = 1×10^{-3} ; 3×10^{-2} ; 5×10^{-4} ; 3×10^{-2}). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité du protéasome 20S pourrait être en partie corrélée à une augmentation de son niveau d'expression de 1 à 6,5Gy.

De plus, la quantification des niveaux d'expression des formes 30S/26S pour les conditions contrôle, 0,5Gy et 1Gy, a montré que, le niveau d'expression du 30S n'est pas modulé, tandis que celui du 26S diminue significativement à 0,5 et 1Gy par rapport aux témoins (*p. values* respectives = 9×10^{-4} ; 1×10^{-3}). Le fait, qu'à 1Gy l'activité du 26S augmente malgré la baisse de son niveau d'expression peut être dû au recrutement de protéines régulatrices du système ubiquitine protéasome (ubiquitine ligases par exemple) [91], permettant une augmentation de l'activité ubiquitine dépendante du protéasome sans moduler son niveau d'expression.

Nos résultats démontrent que l'irradiation chronique a un impact sur l'activité mais également sur les niveaux d'expression du protéasome, en particulier sur la forme 20S. Les résultats de mesure de l'activité des trois formes du protéasome par électrophorèse sur gel natif ne sont pas incohérents avec les résultats de mesure de l'activité globale du protéasome. En effet, la mesure d'activité du protéasome sur gel natif montre que l'irradiation chronique, n'entraîne pas de changement au niveau de l'activité globale du protéasome, en revanche elle entraîne un profond remaniement de la distribution de l'activité des 3 formes du protéasome, en particulier sur les plus fortes doses cumulées. Équivalent à 38%, 55% et 6% de l'activité pour 30S, 26S et 20S au niveau basal, respectivement, la distribution de l'activité du protéasome pour la dose cumulée la plus élevée (6,5 Gy) est de 58%, 29% et 13% d'activité pour 30S, 26S et 20S, respectivement. Ceci suggère une compensation de ces trois formes du protéasome afin de maintenir un niveau global basal d'activité. De plus, ces résultats suggèrent que l'activité du protéasome 26S est plus sensible à l'irradiation chronique que le 20S, puisqu'il est modulé dès 0,5Gy. D'autres études ont démontré que de faibles concentrations d'oxydant, induisaient une baisse de l'activité des sous-unités 26S [216]. L'irradiation chronique induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène, nos résultats semblent donc être en accord avec la littérature.

En outre, l'augmentation de l'activité de la sous-unité 20S après irradiation chronique pourrait être due à deux phénomènes. Le premier de ces phénomènes est la dissociation des formes 30S et 26S afin d'augmenter le niveau d'expression de la sous-unité 20S [98], [246], [247]. En effet, comme décrit précédemment, le stress oxydant est capable d'induire la dissociation du 30S et du 26S afin d'augmenter le niveau d'expression du protéasome 20S, permettant alors aux cellules d'éliminer de manière efficace les protéines oxydées et ainsi d'atténuer les effets cytotoxiques de leur accumulation [248], [249]. Il semblerait que ce phénomène soit prépondérant dans notre étude pour les conditions testées, étant donné que l'expression du 26S diminue à 1Gy alors que l'expression du 20S augmente pour cette même dose.

Le second phénomène pouvant expliquer une augmentation de l'activité de la sous-unité 20S, est sa liaison avec des protéines régulatrices afin de former le « protéasome actif 20S ». Jusqu'à présent, trois de ces activateurs ont été identifiés chez les mammifères, à savoir : PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ et PA200 [96], [97], et seulement deux d'entre eux sont connus chez *C. elegans* (PA28 γ et PA200) [250]. Ces activateurs du protéasome ont un rôle dans la modulation de la structure du cœur catalytique 20S car ils permettent l'ouverture du canal formé par les anneaux α , facilitant ainsi l'entrée des protéines endommagées à l'intérieur de celui-ci [246].

Concernant les résultats sur le niveau d'expression du protéasome, il semblerait que l'irradiation chronique induit une régulation positive de l'expression du protéasome 20S, et ce à partir de 1Gy de manière dose-dépendante, avec une augmentation de son activité. La protéine SKN-1 est connue pour être impliquée dans la réponse au stress oxydant en régulant de manière positive les gènes impliqués dans la détoxification et la défense contre les espèces réactives de l'oxygène. En effet, SKN-1 régule l'expression et l'activité du protéasome, et coordonne les réponses spécifiques de défense contre les perturbations oxydatives *via* la dégradation et la synthèse de protéines par le protéasome [243], [251]. Il est donc également possible que la voie de régulation SKN-1 soit impliquée dans l'augmentation des niveaux d'expression du protéasome 20S après irradiation chronique.

Notre étude permet d'apporter des hypothèses mais ne permet pas de conclure sur la raison pour laquelle l'expression de la forme 20S augmente après irradiation chronique. Afin d'aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de quantifier les niveaux d'expression des complexes régulateurs 19S, PA28 γ et PA200, afin de déterminer si l'augmentation des niveaux d'expression du protéasome 20S est due à la dissociation du 30S et 26S et/ou au recrutement de protéines activatrices. De plus le rôle potentiel de la voie de régulation SKN-1 dans l'augmentation de l'activité des 3 formes du protéasome observée après irradiation chronique serait également à prendre en compte, par exemple en utilisant des mutants qui n'expriment pas le gène codant pour la protéine SKN-1.

En conclusion, après irradiation chronique, il semblerait que le protéasome et particulièrement la forme 20S soit stimulée afin de dégrader les protéines oxydées. Etant donné que les protéines oxydées sont préférentiellement dégradées par le 20S, l'augmentation de son activité dès 1Gy pourrait potentiellement expliquer l'absence d'induction de protéines carbonylées après irradiation chronique. Ceci paraît cohérent avec une étude précédemment réalisée qui a démontré que l'exposition de fibroblastes murins à de faibles concentrations d'H₂O₂ durant 24h, induisait une augmentation de l'activité de la forme 20S du protéasome corrélée à une dégradation préférentielle des protéines oxydées [215]. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'un effet hormesis pourrait être à l'origine de cette activation du 20S en réponse à de faibles concentrations d'oxydant. Il est bien renseigné dans la littérature que l'irradiation chronique est capable de générer des mécanismes de défense cellulaire. En effet, plusieurs études ont démontré qu'une

irradiation chronique à des doses inférieures à 65mGy était à l'origine d'une extension de la longévité chez la souris [252], d'une stimulation de leur système immunitaire [253], et d'une augmentation de la résistance aux mutations chez les plantes, les bactéries, les insectes et les mammifères [254]. Il est donc possible, que la stimulation de l'activité du protéasome 20S après irradiation chronique fasse partie d'un mécanisme de défense afin de protéger la cellule des dommages que pourraient causer les protéines carbonylées.

Enfin, sur le plan technique, notre étude souligne l'intérêt d'utiliser les deux méthodes de mesure d'activité du protéasome. En effet, la mesure de l'activité globale du protéasome est une méthode quantitative car elle permet de d'évaluer la cinétique de dégradation d'un peptide. De plus, cette technique permet de déterminer l'activité spécifique du protéasome grâce à l'utilisation d'un inhibiteur. En revanche, l'analyse de l'activité globale du protéasome ne permet pas d'évaluer l'activité spécifique du protéasome 20S (minoritaire par rapport aux deux autres formes 30S et 26S), pourtant essentielle dans la dégradation des protéines oxydées.

c. Expression différentielle et nature des protéines variantes

Les résultats acquis sur les niveaux de protéines carbonylées démontrent que ceux-ci ne sont pas impactés après irradiation chronique. Par conséquent, le marqueur carbonylation des protéines ne semble pas être un marqueur sensible et/ou précoce des effets de l'irradiation chronique sur la reproduction de *C. elegans*. En revanche les voies protéasomales semblent activées. Pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et la recherche de marqueurs sensible de l'exposition, deux expériences de protéomique, équivalentes à celles menées pour l'aigu ont été réalisées.

L'expression différentielle et la nature des protéines variantes après irradiation chronique ont été mesurées à 0,5, 1 et 3,3Gy (doses cumulées) par les méthodes 2D-DIGE et label free. Le but de cette étude était de caractériser l'expression et la nature des protéines variantes après irradiation chronique *vis-à-vis* de la reproduction, afin d'établir un possible lien entre la modulation du protéome et le déclin de la reproduction observé chez *C. elegans* après irradiation chronique.

Les résultats issus de deux analyses sont présentés ci-après.

i. DiGE

L'analyse de l'expression différentielle des protéines après irradiation chronique chez *C. elegans* par la méthodologie 2D-DIGE sur trois doses a montré que parmi les 937 spots détectés, un seul a été considéré comme différemment exprimé par rapport aux témoins. La position du spot sur gel d'électrophorèse 2D différemment exprimé entre les différents groupes est présentée Figure 55.

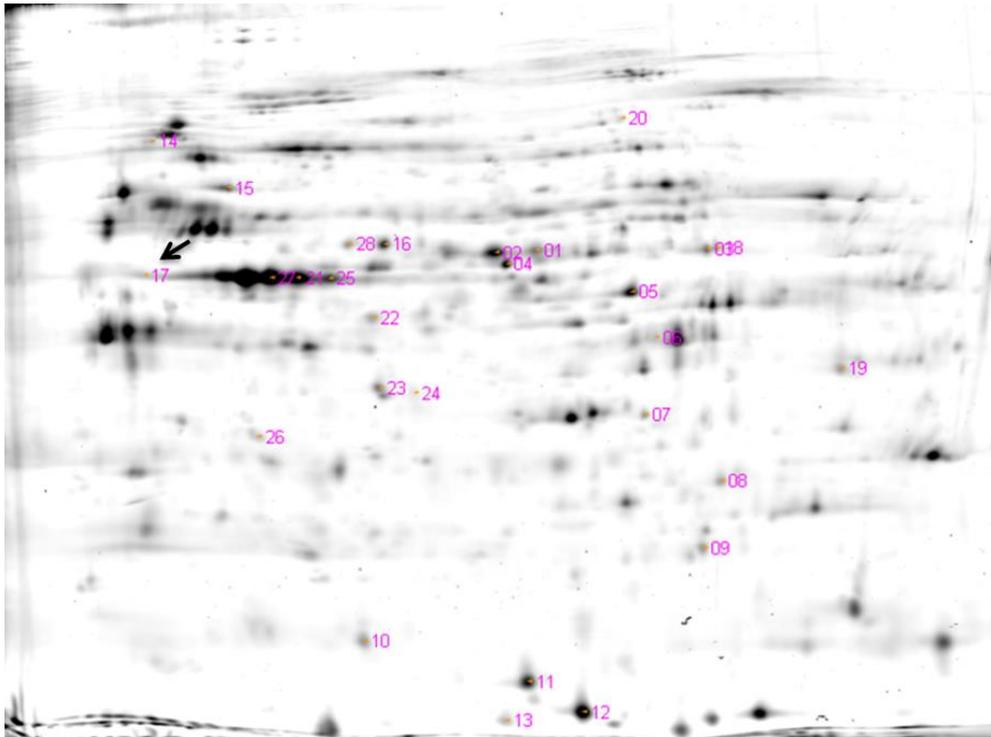


Figure 55 : Gel d'électrophorèse 2D-DIGE. Illustration de l'unique spot d'intérêt (annoté en rose avec une flèche), sélectionné pour l'analyse par spectrométrie de masse.

Les ratios des intensités de fluorescence du spot entre les différentes doses cumulées et les témoins sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Comparaison de l'intensité de chacun des spots entre les différentes doses cumulées et le témoin. Les résultats sont présentés comme le ratio de la moyenne du volume du spot : n=3 (pool de 3000 nématodes). L'analyse a été réalisée avec le logiciel Delta2D. Un ratio inférieur à 0,75 signifie que le spot de protéines est moins exprimé chez le groupe exposé que chez le groupe témoin ; à l'inverse un ratio supérieur à 0,75 signifie que le spot de protéines est plus exprimé chez le groupe exposé que chez le groupe témoin. (*P<0.05; test de Student).

Spot n°	0,5Gy vs témoins		1Gy vs témoins		3,3Gy vs témoins	
	Ratio de l'intensité du spot (volume)	<i>p. value</i>	Ratio de l'intensité du spot (volume)	<i>p. value</i>	Ratio de l'intensité du spot (volume)	<i>p. value</i>
17	0.72	0.053	0.67	0.032*		

Les résultats de l'analyse montrent que le spot de protéines n°17 est significativement sous-exprimé après irradiation chronique à 1Gy. Cependant, il est intéressant de noter que ce même spot est aussi réprimé à 0,5Gy (dose cumulée), avec un ratio de 0,72 mais une *p. value* égale à 0,053, juste au-dessus de la significativité. Ces résultats suggèrent que la modulation du spot n°17 intervient dès 0,5Gy d'irradiation chronique par rapport aux témoins.

Malgré le fait qu'une seule protéine ait été considérée comme variante après irradiation chronique, le spot a tout de même été piqué, puis identifié en spectrométrie de masse (Maldi-TOF/TOF et Orbitrap) par interrogation des bases de données NCBI nr/*C.elegans* et Uniprot/UPP_*C.elegans*. Tout comme l'irradiation aiguë, le Maldi TOF/TOF a été utilisé pour une première identification, raffinée par l'utilisation de l'Orbitrap. Ainsi, sur ce spot de protéines variant, une protéine a pu être identifiée, l'actin-1. Le résultat d'identification de l'analyse 2D-DIGE après irradiation chronique est donné dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Protéine différenciellement exprimée après irradiation chronique chez *C. elegans* de 0,5 à 3,3Gy par rapport aux témoins et identifiées après spectrométrie de masse (Maldi-TOF/TOF et Orbitrap).

N° spot	Nom de la protéine	Nom du gène	Accession sur uniprot	Score	Recouvrement de séquence(%)	Poids moléculaire (Da)	Fonction
17	Actin-1	Act-1	P0DM41	1176	40	42111	impliquée dans divers types de motilité cellulaire et s'exprime de façon omniprésente dans toutes les cellules eucaryotes

Suite à l'identification de cette unique protéine, aucune analyse des fonctions biologiques n'a pu être réalisée *via* l'outil d'interaction DAVID gene. En effet, une seule protéine ne permet en aucun cas de réaliser une analyse d'enrichissement des processus biologiques et encore moins d'enrichissement de processus moléculaires.

ii. Label free

Etant donné qu'une seule protéine a pu être considérée comme variante après irradiation chronique par rapport aux témoins par la méthodologie 2D-DIGE, une approche label-free a été utilisée. Cette fois, parmi les 2647 protéines identifiées, 60 ont été considérées comme différemment exprimées après irradiation chronique par rapport aux témoins. La Figure 56 représente sous forme de heat-map l'ensemble des protéines analysées comme variantes et identifiées après irradiation chronique. La liste des protéines identifiées et caractérisées dans les banques de données après irradiation chronique est donnée en annexe 2.

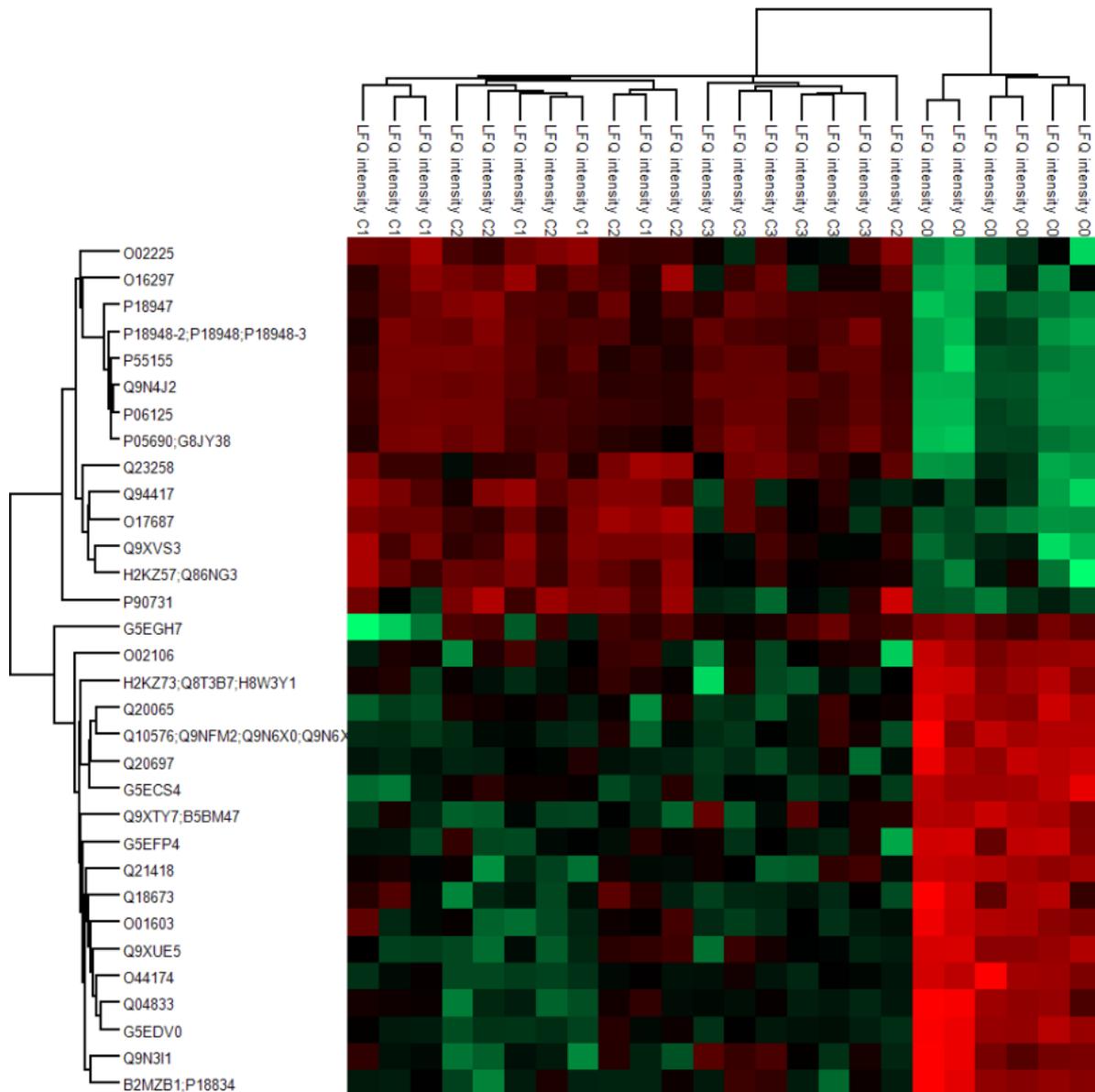


Figure 56 : Heat map représentant les LFI (label free intensity normalisée par intensité totale chromatographique) pour chacune des protéines variantes et identifiées par spectrométrie de masse. Analyse non supervisée. Le dendrogramme du haut représente les différentes conditions ainsi que les différents réplicats biologiques et analytiques. C0 correspond aux conditions contrôles, C1 correspond aux conditions 0,5Gy, C2 correspond aux conditions 1Gy et C3 correspond aux conditions 3,3Gy. Le dendrogramme de gauche représente les différentes protéines en fonction de leur numéro d'accèsion sur Uniprot. Les couleurs correspondent aux intensités de protéines en LFI transformées en log2 (vert =positif, rouge= négatif).

Cette représentation graphique des données permet d'identifier que les groupes contrôles et les groupes exposés sont bien distincts.

La modulation des différentes protéines en fonction des doses d'exposition est donnée ci-après (*p. value* inférieure à 0,01) :

Pour les nématodes exposés à 0,5Gy, l'expression de 42 protéines varie ; 23 sont surexprimées par rapport aux témoins et 19 réprimées par rapport aux témoins.

Pour les nématodes exposés à 1Gy, 52 protéines sont variantes, dont 24 sont surexprimées par rapport aux témoins et 28 réprimées par rapport aux témoins.

Pour les nématodes exposés à 3,3Gy, 39 protéines sont variantes, dont 14 sont surexprimées par rapport aux témoins et 25 réprimées par rapport aux témoins.

Au vu de nos résultats précédents et de la littérature, certains processus moléculaires semblent être particulièrement impliqués dans les mécanismes de défense du nématode à l'irradiation chronique. Ainsi, tout comme pour l'irradiation aiguë les protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN et dans la cascade apoptotique chez *C. elegans* ont été recherchées dans cette analyse protéomique. De plus, au vu des résultats sur l'activité et l'expression du protéasome (en particulier le 20S), les protéines le constituant ou impliquées dans sa régulation ont également été recherchées. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Résultats de recherche avec *a priori* : 9 des protéines analysées comme variantes et identifiées après analyse label free

ID protéine	ID gene	Voie moléculaire associée	Modulation de l'expression des protéines		
			0,5Gy vs contrôles	1Gy vs contrôles	3,3Gy vs contrôles
DNA hélicase	<i>mcm-6</i>	Réplication de l'ADN	+		
DNA hélicase	<i>mcm-2</i>	Réplication de l'ADN	+		
DNA hélicase	<i>mcm-3</i>	Réplication de l'ADN	+		
DNA hélicase	<i>mcm-7</i>	Réplication de l'ADN		+	
C-type LECTin	<i>Clec-67</i>	Voie de régulation SKN-1		-	-
C-type LECTin	<i>Clec-72</i>	Voie de régulation SKN-1		-	-

Comme le montre le Tableau 21 les résultats de cette analyse label-free n'ont pas permis d'identifier de modulation spécifique des protéines constituant les sous-unités du protéasome ni des protéines impliquées dans la cascade apoptotique. Cette approche permet d'identifier un grand nombre de protéines, en revanche elle ne permet pas d'identifier tout le protéome de *C. elegans* puisque seuls 10% du protéome de *C. elegans* (constitué de 26778 protéines) a pu être caractérisé ; ceci peut expliquer que certaines protéines d'intérêt biologique ne soient pas ressorties de cette analyse.

Cependant, de nombreux résultats sont observés. En effet, les protéines du complexe MCM, qui sont des hélicases impliquées dans la réplication de l'ADN sont surexprimées après irradiation à 0,5 et 1Gy. Une étude souligne que le complexe MCM est exprimé dans toutes les cellules en division durant les phases de développement embryonnaire et post-embryonnaire, et qu'il est associé à la chromatine [255]. Cette même étude a montré que le blocage de l'activité hélicase des protéines du complexe MCM induisait un arrêt de la synthèse et de la réplication de l'ADN, mais que les cellules germinales continuaient à se diviser entraînant alors l'apparition d'un génome fragmenté. Ces résultats suggèrent donc qu'il pourrait exister une augmentation de l'activité de réplication de l'ADN dans la lignée germinale de *C. elegans*. Des travaux antérieurs ont démontré qu'après irradiation chronique, il existait un arrêt du cycle cellulaire dans la lignée germinale de *C. elegans* (plus particulièrement un blocage en mitose des futurs ovocytes), constituant une des hypothèses de diminution de la ponte totale par individu [143]. De plus, il a été établi qu'il existait des points de contrôle cellulaires, en réponse aux dommages à l'ADN afin de permettre justement un arrêt du cycle cellulaire et la transcription de gènes codants pour des enzymes de réparation des dommages [256]. Par conséquent, la surexpression des protéines du complexe MCM pourrait constituer une réponse face aux dommages à l'ADN et à ses mécanismes de réparation afin de permettre la réplication de l'ADN réparé [257].

De plus, comme précédemment évoqué dans ce manuscrit (Partie D), des travaux antérieurs ont démontré que l'induction d'espèces réactives de l'oxygène entraînait des cascades de signalisation, et notamment l'activation d'une voie de protection cellulaire nommée SKN-1 [258], [259]. Décrites dans la littérature, il a été montré que les protéines CLEC, étaient requises pour la protection cellulaire (infection, stress oxydant), et que les gènes codants pour ces protéines étaient activés soit par SKN-1 soit par la protéine ELT-2 [260]. Ce qui est intéressant ici, c'est que les protéines CLEC-72 et CLEC-67 sont réprimées à partir de 1Gy. Ces résultats, associés à l'absence de réponse SKN-1 dans l'analyse protéomique, ne permettent pas d'appuyer l'hypothèse évoquée dans le chapitre b (activité du protéasome) selon laquelle après irradiation chronique, il pourrait y avoir une implication de la voie SKN-1 afin de protéger les cellules des effets radiotoxiques. En revanche, il semblerait que d'autres mécanismes de défense cellulaires soient mis en place après exposition chronique (et notamment la surexpression des protéines constituant le complexe MCM).

Afin d'analyser de manière plus globale les processus biologiques impactés par l'irradiation, et déterminer quels processus biologiques sont susceptibles d'être réprimés ou sur-exprimés, l'analyse des GOTERM a été réalisée pour les protéines sur-exprimées d'une part et réprimées d'autre part après irradiation par rapport aux témoins. L'analyse des processus biologiques susceptibles d'être sur-exprimés après irradiation chronique est donnée dans la Figure 57.

Ce diagramme montre que les processus biologiques dans lesquels les protéines analysées comme surexprimées semblent être les plus impliquées (*p. values* les plus faibles) sont : le transport lipidique (16% de protéines, *p. value* = 1×10^{-6}), La réplication de l'ADN (11% de protéines, *p. value* = 1×10^{-5}) et la reproduction (23%, *p. value* = 6×10^{-4}).

Par conséquent, contrairement à l'irradiation aiguë, l'analyse des GOTERM montre que les protéines impliquées dans la reproduction de *C. elegans* sont surexprimées après irradiation chronique.

La même analyse a été réalisée pour les protéines qui sont analysées comme réprimées après irradiation chronique. L'analyse des processus biologiques dans lesquels les protéines réprimées sont impliquées après exposition aux rayonnements ionisants est donnée dans la Figure 58.

Implication des protéines identifiées et analysées comme réprimées après irradiation chronique dans les processus biologiques chez *C. elegans*

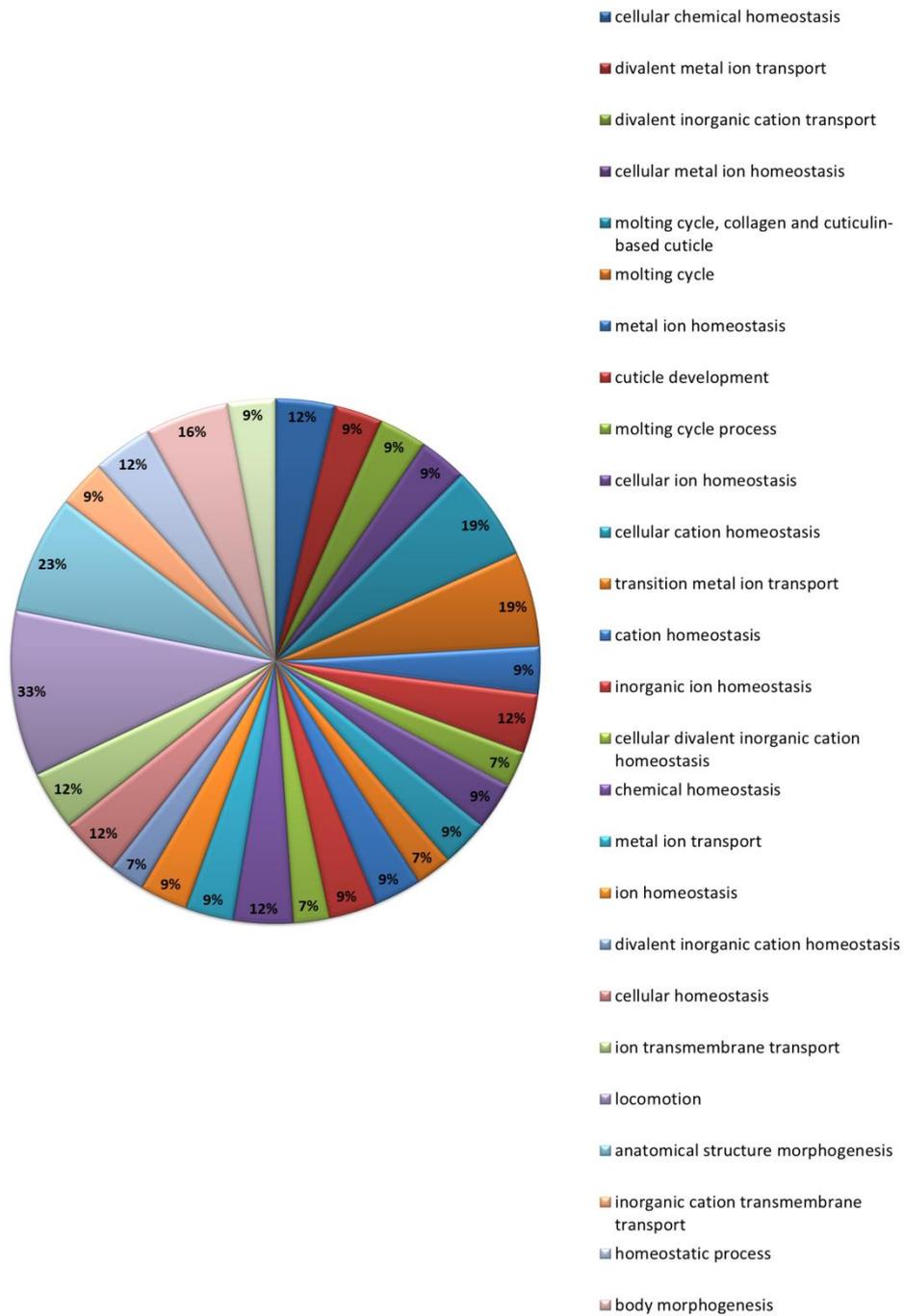


Figure 58: Analyse des processus biologiques *via* l'outil DAVID gene dans lesquels sont impliquées les protéines analysées comme réprimées et identifiées après irradiation chronique. Les % indiquent la proportion de protéines identifiées impliquées dans chacun des processus biologiques.

Ce diagramme montre que les processus biologiques dans lesquels les protéines analysées comme réprimées semblent être les plus impliquées (*p. values* les plus faibles) sont : les processus impliqués dans l'homéostasie cellulaire (12% de protéines, *p.value* = 6×10^{-4}) et le développement de la cuticule (19% de protéines, *p.value* = 1×10^{-3}). En revanche, aucune protéine réprimée ne semble impliquée dans les processus de reproduction chez *C. elegans*.

Afin de déterminer si des protéines sont communes au sein des différentes conditions d'expositions, et ainsi déterminer des marqueurs protéiques pertinents de l'irradiation chronique, un diagramme de Venn a été réalisé grâce à l'outil Venny 2.1. Ce diagramme est présenté Figure 59.

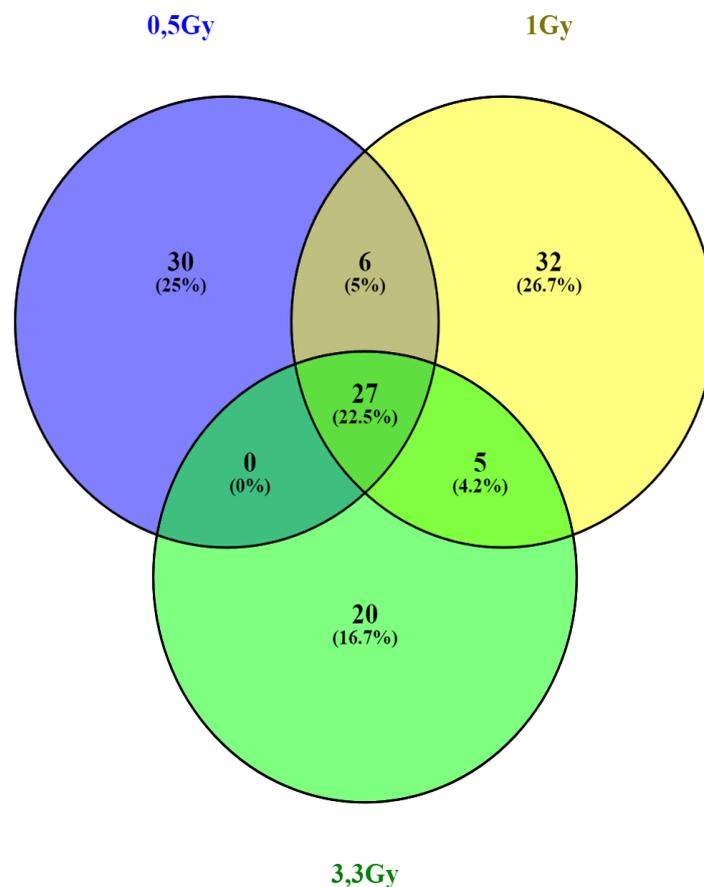


Figure 59: Diagramme de Venn après exposition chronique.

Ainsi, au vu de ce diagramme, il est notable que 27 protéines sont communes aux trois conditions d'exposition. La nature de ces protéines (qui sont connues et annotées dans les bases de données) ainsi que leur modulation après irradiation sont présentés Tableau 22.

Tableau 22: Liste des 15 protéines parmi les 27 communes entre 0,5 ; 1 et 3,3Gy qui sont annotées dans les bases de données de protéomique, ainsi que la modulation de leur expression associée pour chacune des conditions. «--» ou « ++ » signifie que le ratio d'intensité de la protéine entre les conditions d'expositions et les contrôles est inférieur ou supérieur à 2 respectivement.

Id protéine	Fonction	ID gene	Modulation de l'expression des protéines		
			0,5Gy vs contrôle	1Gy vs contrôle	3,3Gy vs contrôle
Vitellogénine 3	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-3</i>	+	+	++
Vitellogénine 1	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-1</i>	+	+	+
Vitellogénine 5	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-5</i>	+	+	+
Vitellogénine 4	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-4</i>	+	+	+
Vitellogénine 2	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-2</i>	+	+	+
Vitellogénine 6	Impliquée dans la maturation des ovocytes	<i>vit-6</i>	+	+	+
collagen	Développement de la cuticule	<i>col-104</i>	--	--	--
SYM-1 protein	Nécessaire à l'axogénèse et à la viabilité embryonnaire	<i>sym-1</i>	--	--	--
Collagen	Développement de la cuticule	<i>col-14</i>	--	--	--
no mechanoreceptor potential A	Développement de la cuticule	<i>noah-1</i>	--	--	--
Collagen	Développement de la cuticule	<i>col-48</i>	--	-	--
« Nouvelle protéine »		<i>mlt-8</i>	--	--	--
no mechanoreceptor potential A	Développement de la cuticule	<i>noah-2</i>	--	--	--
Inactive angiotensin-converting enzyme-related protein	Développement de la cuticule	<i>acn-1</i>	--	--	--
UDP-galactopyranose mutase	Développement de la cuticule	<i>glf-1</i>	--	--	--

Le Tableau 22 montre que toutes ces protéines sont modulées de la même manière entre les différentes conditions d'exposition. De plus, les protéines COL-104 ; COL-14 ; NOAH-1 ; COL-48 ; NOAH-2 et ACN-1 sont impliquées principalement dans la mue du nématode et dans le développement de la cuticule [193].

En revanche, il est intéressant de noter ici que les vitellogénines 1, 2, 3, 4, 5 et 6 font partie des protéines surexprimées et communes aux trois conditions d'exposition. De plus, la protéine SYM-1 nécessaire à l'axogénèse et à la viabilité embryonnaire est réprimée pour les trois conditions d'exposition.

Comme détaillé dans la partie sur l'irradiation aiguë, chez les nématodes, les vitellogénines permettent le transport du cholestérol au sein des ovocytes favorisant leur maturation [234]. De plus, chez le poisson zèbre, le clivage des vitellogénines en lipovitelline lourde, légère et en phosvitine se fait par les cathepsines, afin de permettre aux ovocytes de devenir matures. Dans notre étude, contrairement à l'irradiation aiguë, aucune protéine de type cathepsine n'a été identifiée, suggérant qu'il n'y a pas de perturbation de la lyse enzymatique des vitellogénines chez *C. elegans* après irradiation chronique (si cette fonction est conservée chez le nématode).

3. Synthèse et discussion : lien entre effets à l'échelle moléculaire et la baisse de reproduction après irradiation chronique.

Tout comme pour l'irradiation aiguë, l'analyse protéomique ainsi que l'analyse des dommages et de la dégradation des protéines ont permis d'identifier des mécanismes potentiels pouvant expliquer le déclin de la reproduction observé à partir de 3,3Gy.

En effet, les résultats de protéomique ont permis de déterminer que les protéines du complexe MCM, impliquées dans la réplication de l'ADN étaient surexprimées et ce dès 0,5Gy. Cet effet pourrait être lié à l'arrêt de la division des cellules germinales (précurseurs des ovocytes) en mitose comme précédemment montré [143]. Parmi les protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, les histones sont des protéines jouant un rôle critique dans le remodelage de la chromatine, la régulation épigénétique de l'expression des gènes [261], et elles sont prises en charge par le protéasome pour leur dégradation. En effet, une étude antérieure a montré que le protéasome 20S était responsable de l'élimination des histones endommagées après l'application de faibles concentrations d'oxydants [216] et que cette dégradation des histones oxydées favorisait leur renouvellement, ce qui permettait indirectement une réparation efficace des dommages à l'ADN [261]. De plus, nos résultats montrent que l'irradiation chronique induit une stimulation de l'activité du protéasome associée à une augmentation des niveaux d'expression du protéasome 20S à partir de 1Gy. Cette augmentation des niveaux d'expression du 20S pourrait être liée à une implication de la voie de régulation SKN-1. Or, les seules modulations constatées sont celles de protéines impliquées soit en amont soit en

parallèle de cette voie de régulation, cela ne permet donc pas d'appuyer l'hypothèse de l'implication de SKN-1 dans l'augmentation de la protéolyse observée. De plus, SKN-1 est connue comme étant impliquée dans la régulation de l'expression des sous-unités du protéasome mais pas uniquement. En effet, comme déjà évoqué, une étude a précédemment montré qu'en conditions normales, la voie SKN-1 régule l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus incluant la détoxification, la résistance au stress, les fonctions lysosomale et protéasomale et le métabolisme [244]. Ce qui est intéressant, c'est que d'autres études ont montré que la voie de régulation SKN-1 était impliquée dans la lipolyse chez *C. elegans* [243]. En particulier ces études ont montré que les nématodes dépourvus de cellules souches germinales, présentaient une accumulation de lipides au niveau du corps entier, et que le facteur de transcription SKN-1 était justement activé par cette accumulation de lipides afin de les dégrader. Or, nous avons vu que le niveau de lipides était significativement diminué à la plus forte dose cumulée d'irradiation chronique (6,8 Gy). Par conséquent, il est possible que SKN-1 soit impliquée dans la lipolyse observée après exposition chronique.

En outre, l'absence d'effet sur le succès d'éclosion après irradiation chronique pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité du protéasome 20S à partir de 1Gy, impliquant possiblement une réparation des cassures double brin, constituant ainsi un mécanisme de défense cellulaire. Ces résultats pourraient permettre de confirmer l'hypothèse selon laquelle *C. elegans* est moins sensible aux effets cumulatifs d'une exposition chronique que d'autres invertébrés en raison de la capacité de réparation des gamètes en développement.

En complément, l'analyse protéomique menée a permis d'identifier un groupe de protéines qui étaient surexprimées après irradiation chronique dès 0,5Gy par rapport aux témoins. Ces protéines sont entre autre des vitellogénines, des protéines impliquées dans le transport du cholestérol. Comme décrit dans le chapitre précédent, l'accumulation de cholestérol dans les gonades est nécessaire à la capacité de ponte du nématode en permettant la progression du cycle cellulaire et la sortie des cellules en maturation de la phase de pachytène [262]. Par conséquent, une des hypothèses à ce stade de l'étude serait une baisse du niveau de lipides par l'irradiation chronique, générant *in fine* un besoin accru de lipides pour permettre la maturation des ovocytes. Ainsi la surexpression des vitellogénines dès 0,5Gy pourrait correspondre à une compensation du nématode afin de favoriser la maturation de ses ovocytes.

Ainsi la baisse de la ponte totale par individu pourrait être due à plusieurs phénomènes cumulés, et notamment à un arrêt du cycle cellulaire dans les gamètes en développement mais également à un défaut de maturation des ovocytes.

III. Synthèse et discussion sur la comparaison aiguë vs chronique

L'évaluation du risque environnemental lié à une exposition chronique aux rayonnements ionisants repose la plupart du temps sur l'extrapolation de données obtenues lors d'une exposition aiguë [120], [263].

Or dans notre étude, nous montrons que lors d'une irradiation aiguë, le nombre de descendants par individus ainsi que le succès d'éclosion sont impactés. Tandis que lors d'une irradiation chronique seul le nombre de descendants par individus est significativement diminué par rapport aux individus non exposés. Ainsi, même si un impact sur la reproduction est observé dans les deux cas, la qualité et l'intensité de l'effet observé sont différentes entre exposition aiguë et exposition chronique, ce qui peut indiquer que les mécanismes moléculaires de radiotoxicité sont différents.

De plus, les doses pour lesquelles ces effets sur la reproduction apparaissent sont plus faibles lors d'une irradiation chronique que lors d'une irradiation aiguë. En effet, dans le cadre de ce travail de thèse, un impact sur la reproduction a été observé après irradiation aiguë dès 30Gy et après 3,3Gy d'irradiation chronique. Nos résultats montrent que *C. elegans* est plus sensible à l'irradiation chronique qu'à l'irradiation aiguë en ce qui concerne la ponte totale par individus. En revanche, le nématode est plus sensible à l'irradiation aiguë qu'à l'irradiation chronique en ce qui concerne le succès d'éclosion.

Afin de comprendre si les mécanismes moléculaires sous-jacents diffèrent également, une analyse au niveau du protéome a été réalisée. Ainsi, l'expression, l'oxydation et la dégradation des protéines a été mesurée après irradiation aiguë et chronique pour des mêmes doses cumulées. Ces études mécanistes ont révélé que les mécanismes moléculaires sous-jacents diffèrent également en termes de qualité et d'intensité.

Ainsi, concernant l'oxydation des protéines, nous avons pu déterminer que la carbonylation des protéines semble être modulée différemment en fonction du mode d'irradiation. En effet, le niveau global de protéines carbonylées varie de façon non linéaire après irradiation aiguë mais n'est pas modulé après irradiation chronique. De la même manière, l'activité du protéasome, et en particulier celle du protéasome 20S est modulée différemment entre les deux modes d'exposition. En effet, l'activité du 20S diminue de manière non dose dépendante à partir de 0,5Gy d'irradiation aiguë alors qu'elle augmente de manière dose-dépendante à partir de 1Gy d'irradiation chronique. Ces résultats montrent que les protéines carbonylées semblent être éliminées par le protéasome après irradiation chronique mais pas après irradiation aiguë.

Par rapport à d'autres marqueurs moléculaires bien décrits dans la littérature, comme l'apoptose qui est corrélée à une baisse de la reproduction après irradiation aiguë et chronique [12], [182], [240], le niveau de protéines carbonylées ne semble pas être un marqueur sensible et précoce des effets de l'irradiation chez *C. elegans*.

Cependant, les analyses protéomiques dans chaque condition ont pu mettre en évidence des variations différentielles de l'expression de certaines protéines entre les organismes témoins et les organismes exposés à une irradiation aiguë ou chronique à ces 3 doses. La plupart des protéines identifiées sont impliquées dans la reproduction de *C. elegans* i.e. développement de la lignée germinale, des spermatozoïdes, et ces protéines sont réprimées après irradiation aiguë et surexprimées après irradiation chronique. De plus, au travers de ces résultats, il est important de préciser que 12 protéines sont communes aux deux modes d'irradiation. Au sein de ces 12 protéines, 10 sont connues et annotées. Ces protéines sont ACN-1 ; NOAH-2, SYM-1 ; NOAH-1, GLF-1 ; COL-14 ; et VIT-1 ; VIT-3 ; VIT-4 ; VIT-5. La plupart d'entre elles sont impliquées dans la mue du nématode. En revanche, ce qui est intéressant ici c'est que ces protéines sont différemment exprimées en fonction du mode d'irradiation. En particulier les vitellogénines sont surexprimées après irradiation chronique et réprimées après irradiation aiguë.

Dans notre étude, ces modulations de l'expression du cluster « vitellogénine » pourraient constituer des marqueurs d'exposition aux rayonnements gamma. Ces résultats, obtenus à des doses pour lesquelles divergeaient les effets individuels entre les deux modes d'irradiation (3,3Gy), sont particulièrement intéressants puisque des marqueurs moléculaires tendent à confirmer les différences observées au niveau individuel, notamment sur la capacité de ponte du nématode. En effet, il semblerait que contrairement à l'irradiation aiguë, après irradiation chronique, l'animal, irradié en permanence, modifie son métabolisme pour réagir à un stress pérenne.

Nos travaux ont permis d'apporter des connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant les différences phénotypiques observées entre une exposition aiguë et une exposition chronique aux rayonnements ionisants. De plus nos résultats confirment que les effets induits par une irradiation chronique diffèrent en qualité et en intensité de ceux induits par une irradiation aiguë. Ces travaux de thèse mettent par conséquent en évidence les limites de l'extrapolation des données obtenues après exposition aiguë afin de prédire les effets d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants.

La Figure 60 ci-dessous synthétise les effets d'une exposition aiguë vs chronique aux rayonnements ionisants au niveau cellulaire, moléculaire et individuel chez le nématode.

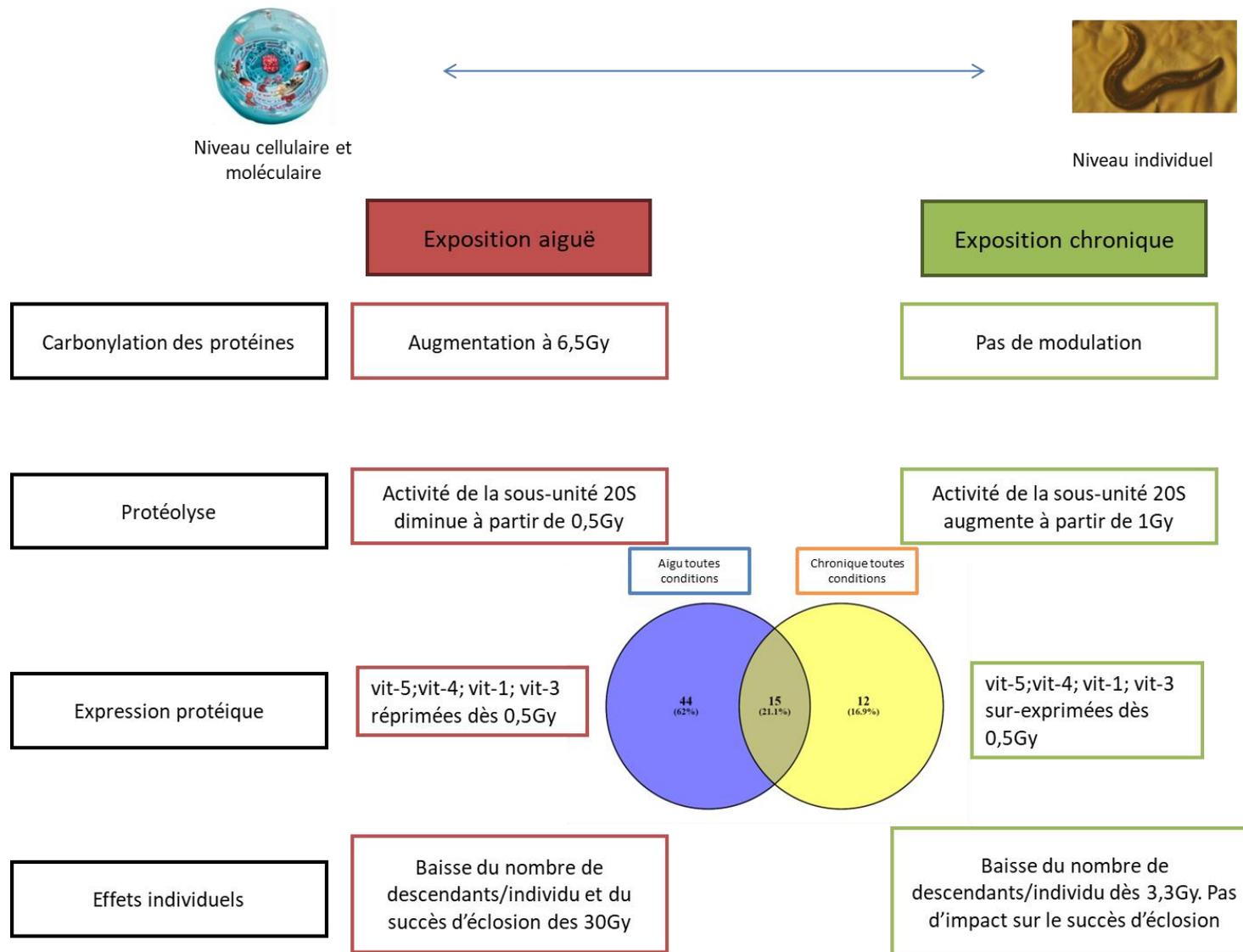


Figure 60 : Schéma de synthèse des effets d'une exposition aiguë vs chronique aux rayonnements ionisants au niveau cellulaire, moléculaire et individuel.

Partie E : Conclusions générales et perspectives

I. Conclusions générales

L'objectif principal de ces travaux de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de radiotoxicité (aigu vs chronique) et particulièrement en étudiant la contribution du protéome.

1. Pertinence et sensibilité des marqueurs étudiés

Le premier axe de ce projet visait à déterminer la sensibilité du marqueur carbonylation des protéines vis-à-vis d'autres marqueurs moléculaires et individuels après irradiation. Ce projet de thèse a permis de mettre en évidence que le marqueur carbonylation des protéines n'était ni un marqueur sensible ni un marqueur précoce des effets des rayonnements sur la reproduction du nématode, car le niveau global de protéines carbonylées n'est que peu impacté par l'irradiation contrairement à la reproduction. En effet, notre étude suggère que les protéines carbonylées seraient éliminées par les systèmes de protéolyse cellulaire au fur et à mesure de leur production.

Le protéasome est impliqué dans la dégradation des protéines carbonylées après irradiation chronique à partir de 1Gy. En revanche, le protéasome et en particulier la forme 20S semble dépassée dès 0,5Gy d'irradiation aiguë, suggérant une possible implication de l'autophagie afin de dégrader les protéines carbonylées. Cependant cette hypothèse n'a pu être testée durant cette thèse.

L'analyse globale de l'expression des protéines a permis de mettre en évidence l'implication de certaines voies de régulation impliquées dans la reproduction, l'apoptose et la réplication de l'ADN. La modulation des protéines impliquées dans les processus cités ci-dessus a été constatée à des doses plus faibles que celles pour lesquelles des effets ont été observés sur la reproduction. Ainsi, ces marqueurs protéiques pourraient constituer des marqueurs précoces et sensibles des effets de l'irradiation sur la reproduction. Enfin, la répression de l'histone acétyltransférase HAT-1 et de la protéine ribosomale RPS-19 après irradiation aiguë, ainsi que la surexpression dose dépendante de la vitellogénine 3 après irradiation chronique suggèrent que ces protéines pourraient également être des candidats potentiels comme indicateurs de l'exposition aux rayonnements gamma ou d'un effet générique sur la reproduction. Cependant, cette observation sera à confirmer en comparant la sensibilité de ces marqueurs protéiques à d'autres marqueurs moléculaires comme par exemple les dommages à l'ADN et en déterminant si ces marqueurs sont spécifiques d'une irradiation gamma.

2. Explorer le lien entre les réponses moléculaires et physiologiques

Le deuxième axe de ce projet de thèse était de comprendre le lien après exposition aiguë ou chronique entre les processus moléculaires et un critère individuel susceptible d'avoir un impact sur les populations : la reproduction, critère individuel le plus radiosensible.

Concernant l'irradiation aiguë, nous avons pu mettre en évidence que l'impact sur la reproduction du nématode était une perturbation de la gamétogénèse et de l'embryogénèse. En effet, des protéines impliquées dans la reproduction de manière générale, et en particulier dans la gamétogénèse sont réprimées à partir de 1Gy et notamment, les vitellogénines. En revanche, les protéines SYM-1 et MUP-4 nécessaires au développement de l'embryon sont surexprimées à ces mêmes doses. Cet effet ne permet donc pas d'expliquer la baisse du succès d'éclosion observée dès 30Gy. Les vitellogénines jouent d'une part le rôle de transporteur de lipides, et d'autre part, sont nécessaires à la maturation des ovocytes de par leurs réserves énergétiques (en libérant leur contenu lipidique dans les ovocytes). De plus les activités des protéasomes 20S et 26S sont diminuées à partir de 0,5Gy et 50Gy respectivement, et comme détaillé dans la partie résultats, une diminution de l'activité du protéasome pourrait être en partie responsable d'une augmentation de l'apoptose. Dans la littérature, nous avons vu qu'il existait une augmentation de l'apoptose à partir de 7,5Gy jusqu'à 120Gy post-irradiation aiguë chez *C. elegans* [182]. Ainsi, la diminution de l'activité du protéasome dans notre étude pourrait possiblement entraîner une augmentation de l'apoptose dans les gamètes en développement, mais également une baisse du renouvellement protéique, et notamment d'enzymes impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. Ainsi, une hypothèse possible sur les mécanismes moléculaires de radiotoxicité après irradiation aiguë, serait qu'une augmentation de l'apoptose et une répression de protéines essentielles à la maturation des ovocytes puisse avoir pour conséquence une diminution de la ponte totale par individu. De plus, à ce stade, la répression de la protéine HAT-1 pourrait contribuer à la baisse du succès d'éclosion observée après exposition aiguë.

A l'inverse, après irradiation chronique, aucun effet sur l'embryogénèse n'a été mis en évidence, seul un impact sur la ponte totale l'a été. En revanche, les protéines du complexe MCM essentielles à la réplication de l'ADN sont surexprimées après 0,5Gy, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de défense qui pourrait être lié à l'arrêt du cycle cellulaire observé, lors d'une étude précédente, chez les gamètes en cours de développement après 3,3Gy d'irradiation chronique [143]. De plus, il a été vu que l'irradiation chronique entraînait un profond remaniement de l'activité et de l'expression des trois formes du protéasome (augmentation de l'activité des trois formes à 1Gy, qui perdure jusqu'à 6,5Gy pour le protéasome 20S). Au vu de la littérature existante, il semblerait que les protéines impliquées dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour « DNA Damage Response ») soient ubiquitinylées afin de permettre leur renouvellement (*via* les protéasomes 30S et 26S) et que le protéasome 20S soit responsable de la dégradation des protéines oxydées, y compris les histones [264]. Par conséquent, il est possible que l'activité du protéasome

(permettant la dégradation et le renouvellement de protéines nécessaires à la réparation des dommages à l'ADN dans la lignée germinale) soit augmentée en réponse à la production et à la réparation des dommages radio-induits. Enfin, nous avons vu qu'il existait une diminution des lipides pour la plus forte dose cumulée d'irradiation chronique. Bien que ce résultat reste à confirmer, les résultats d'analyse protéomique montrent que contrairement à l'irradiation aiguë, les vitellogénines (transporteurs de lipides notamment) sont surexprimées après irradiation chronique et ce à partir de 0,5Gy. Cette surexpression pourrait également être une conséquence d'une perturbation du métabolisme lipidique après irradiation. Les vitellogénines permettraient d'accroître le transport des lipides vers les ovocytes afin de répondre au besoin énergétique nécessaire pour maintenir la reproduction.

Enfin, cette approche expérimentale souligne une corrélation entre la reprotoxicité et la protéotoxicité des rayonnements ionisants.

3. Conséquences pour l'évaluation des risques radiologiques

Comme présenté dans ce manuscrit, l'évaluation du risque associé à une exposition chronique repose encore sur des données d'effet acquises après exposition aiguë (car mieux documentée) (FEDERICA Database).

Cependant, ce projet de thèse met en évidence que les effets induits par l'irradiation aiguë et l'irradiation chronique diffèrent en terme d'intensité et de qualité, et ceci autant au niveau moléculaire qu'individuel. En effet, contrairement à une irradiation aiguë, lors d'une irradiation chronique, les organismes semblent modifier leur métabolisme pour réagir à un stress appliqué de façon continu, et semblent développer des mécanismes de défense, telle l'augmentation de la protéolyse cellulaire, pour enrayer les dommages à l'ADN et favoriser leur réparation. Par conséquent, l'extrapolation des données acquises après exposition aiguë afin de prédire les conséquences d'une exposition chronique, n'est pas forcément très pertinente pour permettre une évaluation du risque radiologique fiable.

Ainsi, nos résultats montrent que l'évaluation des risques radiologiques doit désormais s'appuyer sur des données propres aux expositions chroniques, c'est à dire sur des temps d'exposition représentatifs des conditions environnementales.

II. Perspectives générales de recherches

Dans le cadre de ce projet de recherche, l'utilisation d'une approche intégrée pour évaluer les effets d'une exposition aiguë et chronique aux rayonnements ionisants a été utilisée. Afin de poursuivre le travail initié dans cette thèse, il serait judicieux de mesurer i) la longévité des nématodes exposés à une irradiation aiguë et chronique et de comparer ces résultats avec la modulation de l'expression des vitellogénines, afin de déterminer si ces protéines peuvent être des marqueurs de longévité post-irradiation et ii) les mécanismes d'autophagie après irradiation aiguë afin de déterminer si cette voie protéolytique est impliquée dans la dégradation des protéines endommagées.

Il serait également intéressant, au vu des résultats obtenus sur les protéasomes 30S et 26S d'étudier d'autres modifications post-traductionnelles, comme par exemple l'ubiquitinylation. En effet, l'ubiquitinylation est un signal d'adressage de dégradation des protéines qui arrivent en fin de période biologique pour les protéasomes 30S et 26S. Or, il a été vu que l'irradiation chronique entraînait un profond remaniement de l'activité et de l'expression des trois formes du protéasome, et que notamment l'activité du protéasome 26S était stimulée. De plus, comme évoqué dans le chapitre précédent, il semblerait que les protéasomes 30S et 26S soient responsables de l'élimination de protéines impliquées dans la voie de réponses aux dommages à l'ADN [264]. Ainsi, l'ubiquitinylation pourrait être mesurée afin de déterminer si c'est par la modulation de ces signaux d'adressage ubiquitine-dépendants, que l'irradiation chronique engendre une modulation de la dégradation des protéines impliquées dans la signalisation (RPA-0), la réparation de l'ADN (protéines du complexe MCM, RAD-51) et l'apoptose (SKR-1, CEP-1). De plus, étudier l'implication de la voie de régulation SKN-1 voire de ELT-2 (qui agit soit en parallèle soit en amont de SKN-1), dans les mécanismes de défense de la cellule aux rayonnements ionisants, pourrait apporter plus de précisions sur les mécanismes moléculaires de radio-toxicité après irradiation chronique, et notamment sur le rôle des lipides. En effet, les nématodes dépourvus de cellules germinales présentent une accumulation de lipides, la voie SKN-1 est connue pour être activée par les signaux lipidiques afin justement de limiter cette accumulation de graisse, en favorisant l'action des lipases [243]. Ainsi, afin de déterminer si la baisse des niveaux de lipides et la surexpression des vitellogénines après irradiation chronique est corrélée à une stimulation de la voie SKN-1, il serait intéressant de mesurer simplement les niveaux d'expression de ces protéines afin de déterminer si ceux-ci sont modulés après irradiation chronique.

Afin de comparer la sensibilité des marqueurs protéiques par rapport à d'autres marqueurs moléculaires, les dommages à l'ADN, et en particulier les cassures double-brin (dommages à l'ADN les plus délétères), pourraient être mesurés sur les échantillons prélevés durant cette thèse. Ces analyses permettraient d'établir une cartographie des dommages moléculaires, et de déterminer dans quelle mesure la modulation de l'expression des protéines telles que celles du complexe MCM et l'activité du protéasome pourraient potentialiser ou permettre la réparation des dommages à l'ADN.

Finalement, ce projet de thèse a permis d'apporter des précisions sur les mécanismes de radiotoxicité après irradiation aiguë et chronique. En revanche, les débits de doses testés dans cette étude sont relativement éloignés des débits de doses retrouvés dans l'environnement. En effet, le débit de dose minimal étudié ici était $7\text{mGy}\cdot\text{h}^{-1}$, pour lequel des effets au niveau moléculaire ont été observés. Cependant, à Tchernobyl ou Fukushima le débit de dose moyen est de l'ordre du $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$, soit un ordre de grandeur en dessous du débit de dose minimal testé durant cette thèse. Ainsi, afin de se rapprocher de la réalité environnementale, et *in fine* améliorer l'évaluation des risques, il sera nécessaire d'étendre cette étude à des débits de doses réalistes des conditions environnementales, comme par

exemple $10\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$ qui est considéré comme le débit de dose sans effet pour les écosystèmes [107].

Enfin, ce projet de thèse s'inscrit dans un projet bien plus général (le projet ISATIS) dont la finalité est d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires radio-induits après exposition chronique en adoptant une démarche comparée (multi-phylum) incluant des espèces représentatives de l'environnement qui sont plus ou moins radiosensibles. Lors de ces travaux de thèse nous avons utilisé l'organisme modèle *C. elegans*. Cependant, comme présenté dans la partie A de ce manuscrit, il existe une radiosensibilité différente en fonction des espèces. Ainsi, il serait intéressant d'étendre l'approche développée durant cette thèse à d'autres espèces, plus radiosensibles que *C. elegans* comme des vertébrés aquatiques (poisson zèbre) voire des mammifères (souris) afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les différences de radiosensibilité. Ces connaissances permettront de définir les conditions pour lesquelles les expositions chroniques peuvent présenter un danger pour l'ensemble des espèces de l'environnement, et définir des seuils adaptés pour la protection des populations à long terme.

Références bibliographiques

- [1] A. Aarkrog, « Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean », *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 50, n° 17-21, p. 2597-2606, 2003.
- [2] R. Clarke, F. Fry, J. Stather, et G. Webb, « 1990 recommendations of the International Commission on Radiological Protection », *Doc. NRPB*, vol. 4, n° 1, p. 1-5, 1993.
- [3] A. Sugier, J.-F. Lecomte, et J.-C. Nénot, « Les recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique », *Rev. Générale Nucl.*, n° 4, p. 90-95, 2007.
- [4] J. Garnier-Laplace *et al.*, « Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates », *J. Environ. Radioact.*, vol. 121, p. 12-21, 2013.
- [5] L. J. Dallas, M. Keith-Roach, B. P. Lyons, et A. N. Jha, « Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review », *Radiat. Res.*, vol. 177, n° 5, p. 693-716, 2012.
- [6] C. Adam-Guillermin, S. Pereira, C. Della-Vedova, T. Hinton, et J. Garnier-Laplace, « Genotoxic and reprotoxic effects of tritium and external gamma irradiation on aquatic animals », in *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Springer, p. 67-103, 2012.
- [7] J. D. Stark, J. E. Banks, et R. Vargas, « How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, n° 3, p. 732-736, 2004.
- [8] S. Pereira *et al.*, « Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development », *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 30, n° 12, p. 2831-2837, 2011.
- [9] M. A. Chaudhry, R. A. Omaruddin, B. Kreger, S. M. de Toledo, et E. I. Azzam, « Micro RNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation », *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, n° 7, p. 7549-7558, 2012.
- [10] A. Kryshev et T. Sazykina, « Modelling the effects of ionizing radiation on survival of animal population: acute versus chronic exposure », *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 54, n° 1, p. 103-109, 2015.
- [11] R. Roots et S. Okada, « Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells », *Radiat. Res.*, vol. 64, n° 2, p. 306-320, 1975.
- [12] A. Bailly et A. Gartner, « *Caenorhabditis elegans* Radiation Responses », in *Molecular Determinants of Radiation Response*, Springer, p. 101-123, 2011.
- [13] A. Gartner, S. Milstein, S. Ahmed, J. Hodgkin, et M. O. Hengartner, « A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans* », *Mol. Cell*, vol. 5, n° 3, p. 435-443, 2000.

- [14] J. F. Ward, « DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability », *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 35, p. 95- 125, 1988.
- [15] D. t Goodhead, « Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, n° 1, p. 7- 17, 1994.
- [16] M. J. Daly *et al.*, « Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans* », *PLoS One*, vol. 5, n° 9, p. e12570, 2010.
- [17] A. Krisko et M. Radman, « Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans* », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 32, p. 14373- 14377, 2010.
- [18] A. Krisko, M. Leroy, M. Radman, et M. Meselson, « Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, n° 7, p. 2354- 2357, 2012.
- [19] M. J. Daly *et al.*, « Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance », *PLoS Biol.*, vol. 5, n° 4, p. e92, 2007.
- [20] A. Krisko et M. Radman, « Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans* », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, n° 7, p. a012765, 2013.
- [21] J. R. Battista, A. M. Earl, et M.-J. Park, « Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? », *Trends Microbiol.*, vol. 7, n° 9, p. 362- 365, 1999.
- [22] K. W. Minton, « Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* », *Mutat. Res. Repair*, vol. 363, n° 1, p. 1- 7, 1996.
- [23] M. M. Cox et J. R. Battista, « *Deinococcus radiodurans*—the consummate survivor », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, n° 11, p. 882- 892, 2005.
- [24] O. Guipaud et M. Benderitter, « Protein biomarkers for radiation exposure: towards a proteomic approach as a new investigation tool. », *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità*, vol. 45, n° 3, p. 278- 286, 2008.
- [25] C. Ménard *et al.*, « Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 3, p. 1844- 1850, 2006.
- [26] F. Marchetti, M. A. Coleman, I. M. Jones, et A. J. Wyrobek, « Candidate protein biosimeters of human exposure to ionizing radiation », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 82, n° 9, p. 605- 639, 2006.
- [27] S. Horn et K. Rothkamm, « Candidate protein biomarkers as rapid indicators of radiation exposure », *Radiat. Meas.*, vol. 46, n° 9, p. 903- 906, 2011.
- [28] M. Sharma et J. E. Moulder, « The urine proteome as a radiation biosimeter », in *Radiation Proteomics*, Springer, p. 87- 100, 2013.
- [29] B. S. Berlett et E. R. Stadtman, « Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 33, p. 20313- 20316, 1997.

- [30] I. Dalle-Donne, D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, et A. Milzani, « Protein carbonylation in human diseases », *Trends Mol. Med.*, vol. 9, n° 4, p. 169- 176, 2003.
- [31] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, et R. Colombo, « Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress », *Clin. Chim. Acta*, vol. 329, n° 1, p. 23- 38, 2003.
- [32] J. Goudeau et H. Aguilaniu, « Carbonylated proteins are eliminated during reproduction in *C. elegans* », *Aging Cell*, vol. 9, n° 6, p. 991- 1003, 2010.
- [33] K. J. Davies, « Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome », *Biochimie*, vol. 83, n° 3, p. 301- 310, 2001.
- [34] T. Jung et T. Grune, « The proteasome and the degradation of oxidized proteins: part I— structure of proteasomes », *Redox Biol.*, vol. 1, n° 1, p. 178- 182, 2013.
- [35] T. Grune, T. Jung, K. Merker, et K. J. Davies, « Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, n° 12, p. 2519- 2530, 2004.
- [36] D. Delacroix, P. Leblanc, et J. Guerre, *Guide pratique radionucléides et radioprotection*. EDP sciences, 2006.
- [37] M.-T. Ménager, M. Goyffon, et J. Garnier-Laplace, « Toxicologie nucléaire environnementale et humaine », *BIOFUTUR*, vol. 295, p. 1, 2009.
- [38] L. Blus, W. Beyer, et J. Meador, *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting tissue concentrations*. CRC Press Boca Raton, FL, 2011.
- [39] D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr, et J. Cairns Jr, *Handbook of ecotoxicology*. CRC press, 2002.
- [40] J. Garnier-Laplace, K. Beaugelin-Seiller, et T. G. Hinton, *Fukushima wildlife dose reconstruction signals ecological consequences*. ACS Publications, 2011.
- [41] A. Favier, « Le stress oxydant », *L'actualité Chim.*, vol. 108, 2003.
- [42] W. A. Bernhard et D. M. Close, *DNA damage dictates the biological consequences of ionizing irradiation: the chemical pathways*, vol. 43. Marcel Dekker: New York, 2003.
- [43] B. Halliwell et J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Biosciences. Oxford, 2007.
- [44] S. Le Caër, « Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation », *Water*, vol. 3, n° 1, p. 235- 253, 2011.
- [45] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, et T. M. Hagen, « Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, n° 17, p. 7915- 7922, 1993.
- [46] J. A. LaVerne, « OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water », *Radiat. Res.*, vol. 153, n° 2, p. 196- 200, 2000.

- [47] I. Kurose *et al.*, « Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication », *Hepatology*, vol. 25, n° 2, p. 368- 378, 1997.
- [48] V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, et A. Lomri, « Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases », *Joint Bone Spine*, vol. 74, n° 4, p. 324- 329, 2007.
- [49] J. G. Scandalios, « Oxidative stress responses-what have genome-scale studies taught us? », *Genome Biol.*, vol. 3, n° 7, p. reviews1019. 1, 2002.
- [50] T. Douki, J.-L. Ravanat, J.-P. Pouget, I. Testard, et J. Cadet, « Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 82, n° 2, p. 119- 127, 2006.
- [51] S. A. Margolis, B. Coxon, E. Gajewski, et M. Dizdaroglu, « Structure of a hydroxyl radical induced cross-link of thymine and tyrosine », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 27, n° 17, p. 6353- 6359, 1988.
- [52] M. Tubiana *et al.*, « RADIOBIOLOGIE: Radiothérapie et radioprotection—bases fondamentales. Ed. Hermann, Paris. Collection Hermann », *Médecine*, p. 41- 70, 2008.
- [53] M. Tubiana, M. Dutreix, et A. Wambersie, « Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes », *Radiobiologie*, p. 33- 71, 1986.
- [54] G. C. Smith et S. P. Jackson, « The DNA-dependent protein kinase », *Genes Dev.*, vol. 13, n° 8, p. 916- 934, 1999.
- [55] S. C. West, « Molecular views of recombination proteins and their control », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, n° 6, p. 435- 445, 2003.
- [56] D. T. Goodhead, « Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations », *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, vol. 40, n° SUPPL, p. S1- S13, 1999.
- [57] C. Michiels, M. Raes, O. Toussaint, et J. Remacle, « Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 17, n° 3, p. 235- 248, 1994.
- [58] A. J. Hulbert, R. Pamplona, R. Buffenstein, et W. A. Buttemer, « Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals », *Physiol. Rev.*, vol. 87, n° 4, p. 1175- 1213, 2007.
- [59] J.-C. Amiard et C. Amiard-Triquet, « Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques », 2008.
- [60] H. Zhong et H. Yin, « Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria », *Redox Biol.*, vol. 4, p. 193- 199, 2015.
- [61] I. Corre, C. Niaudet, et F. Paris, « Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation », *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 704, n° 1, p. 61- 67, 2010.

- [62] J. Wong-Ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I.-M. Tang, D. P. Tieleman, et L. Monticelli, « Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study », *Biophys. J.*, vol. 93, n° 12, p. 4225- 4236, 2007.
- [63] A. Haimovitz-Friedman *et al.*, « Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. », *J. Exp. Med.*, vol. 180, n° 2, p. 525- 535, 1994.
- [64] I. Koturbash *et al.*, « Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo », *Oncogene*, vol. 25, n° 31, p. 4267- 4275, 2006.
- [65] J. Tamminga, P. Kathiria, I. Koturbash, et O. Kovalchuk, « DNA damage-induced upregulation of miR-709 in the germline downregulates BORIS to counteract aberrant DNA hypomethylation », *Cell Cycle*, vol. 7, n° 23, p. 3731- 3736, 2008.
- [66] A. J. Bernal, D. C. Dolinoy, D. Huang, D. A. Skaar, C. Weinhouse, et R. L. Jirtle, « Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants », *FASEB J.*, vol. 27, n° 2, p. 665- 671, 2013.
- [67] M. V. Iorio, C. Piovan, et C. M. Croce, « Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gene Regul. Mech.*, vol. 1799, n° 10, p. 694- 701, 2010.
- [68] F. Pluder *et al.*, « Low-dose irradiation causes rapid alterations to the proteome of the human endothelial cell line EA. hy926 », *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 50, n° 1, p. 155- 166, 2011.
- [69] A. Sriharshan *et al.*, « Proteomic analysis by SILAC and 2D-DIGE reveals radiation-induced endothelial response: four key pathways », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 8, p. 2319- 2330, 2012.
- [70] S. Nishad et A. Ghosh, « Dynamic changes in the proteome of human peripheral blood mononuclear cells with low dose ionizing radiation », *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 797, p. 9- 20, 2016.
- [71] O. Azimzadeh *et al.*, « Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation », *Proteomics*, vol. 11, n° 16, p. 3299- 3311, 2011.
- [72] D. L. Preston, Y. Shimizu, D. A. Pierce, A. Suyama, et K. Mabuchi, « Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997 », *Radiat. Res.*, vol. 160, n° 4, p. 381- 407, 2003.
- [73] M. Yamada, F. Lennie Wong, S. Fujiwara, M. Akahoshi, et G. Suzuki, « Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958–1998 », *Radiat. Res.*, vol. 161, n° 6, p. 622- 632, 2004.
- [74] H. M. Zbikowska, P. Nowak, et B. Wachowicz, « Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 40, n° 3, p. 536- 542, 2006.
- [75] N. Chondrogianni *et al.*, « Protein damage, repair and proteolysis », *Mol. Aspects Med.*, vol. 35, p. 1- 71, 2014.

- [76] F. Shanlin, R. STOCKER, et M. J. DAVIES, « Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation », *Biochem. J.*, vol. 324, n° 1, p. 1- 18, 1997.
- [77] D. Barford, « The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, n° 6, p. 679- 686, 2004.
- [78] M. Fedorova, R. C. Bollineni, et R. Hoffmann, « Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 33, n° 2, p. 79- 97, 2014.
- [79] S. Goto *et al.*, « Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches », *Mech. Ageing Dev.*, vol. 107, n° 3, p. 245- 253, 1999.
- [80] R. L. Levine et E. R. Stadtman, « Oxidative modification of proteins during aging », *Exp. Gerontol.*, vol. 36, n° 9, p. 1495- 1502, 2001.
- [81] E. Stadtman et B. Berlett, « Fenton chemistry. Amino acid oxidation. », *J. Biol. Chem.*, vol. 266, n° 26, p. 17201- 17211, 1991.
- [82] E. R. Stadtman et R. L. Levine, « Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins », *Amino Acids*, vol. 25, n° 3, p. 207- 218, 2003.
- [83] H. Esterbauer, R. J. Schaur, et H. Zollner, « Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 11, n° 1, p. 81- 128, 1991.
- [84] E. Niki, « Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 47, n° 5, p. 469- 484, 2009.
- [85] M. Orioli, G. Aldini, M. C. Benfatto, R. Maffei Facino, et M. Carini, « HNE Michael Adducts to Histidine and Histidine-Containing Peptides as Biomarkers of Lipid-Derived Carbonyl Stress in Urines: LC- MS/MS Profiling in Zucker Obese Rats », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 23, p. 9174- 9184, 2007.
- [86] E. Maisonneuve *et al.*, « Rules governing selective protein carbonylation », *PLoS One*, vol. 4, n° 10, p. e7269, 2009.
- [87] I. M. Møller, A. Rogowska-Wrzesinska, et R. S. P. Rao, « Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective », *J. Proteomics*, vol. 74, n° 11, p. 2228- 2242, 2011.
- [88] T. Jung et T. Grune, « The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins », *IUBMB Life*, vol. 60, n° 11, p. 743- 752, 2008.
- [89] M. Pervan, K. S. Iwamoto, et W. H. McBride, « Proteasome structures affected by ionizing radiation », *Mol. Cancer Res.*, vol. 3, n° 7, p. 381- 390, 2005.
- [90] Z. Xie et D. J. Klionsky, « Autophagosome formation: core machinery and adaptations », *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, n° 10, p. 1102, 2007.
- [91] N. Papaevgeniou et N. Chondrogianni, « The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation », *Redox Biol.*, vol. 2, p. 333- 347, 2014.

- [92] D. Vilchez, I. Saez, et A. Dillin, « The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases », *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 5659, 2014.
- [93] S. Wilk et M. Orłowski, « Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex », *J. Neurochem.*, vol. 40, n° 3, p. 842- 849, 1983.
- [94] M. Hernebring *et al.*, « Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28 », *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1381, 2013.
- [95] H. Aguilaniu, L. Gustafsson, M. Rigoulet, et T. Nyström, « Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis », *Science*, vol. 299, n° 5613, p. 1751- 1753, 2003.
- [96] F. G. Whitby *et al.*, « Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators », *Nature*, vol. 408, n° 6808, p. 115- 120, 2000.
- [97] X. Gao, J. Li, G. Pratt, S. Wilk, et M. Rechsteiner, « Purification procedures determine the proteasome activation properties of REGγ (PA28γ) », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 425, n° 2, p. 158- 164, 2004.
- [98] T. Grune *et al.*, « HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, n° 7, p. 1355- 1364, 2011.
- [99] A. Frieben, « Demonstration eines Cancroid des rechten Handrucksens, das sich nach langdauernder Einwirkung von Rontgenstrahlen entwickelt hatte », *Fortschr Roentgenstr.*, vol. 6, p. 106- 111, 1902.
- [100] R. Protection, « ICRP publication 103 », *Ann ICRP*, vol. 37, n° 2.4, p. 2, 2007.
- [101] International Commission on Radiological Protection, *ICRP Publication 60: 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. Elsevier Health Sciences, 1991.
- [102] F. Whicker et J. Bedford, « Protection of the natural environment from the ionising radiation. Are specific criteria needed », présenté à Proceedings of an International Symposium on Environmental Impact of Radioactive Releases, International Atomic Energy Agency, IAEA-SM-339/193, p. 561- 567, 1995.
- [103] J. Valentin, « The 2007 Recommendations of the International Commission or Radiological Protection », *Publication*, vol. 103, p. 53- 59, 1977.
- [104] B. J. Howard et C.-M. Larsson, « The ERICA Integrated Approach and its contribution to protection of the environment from ionising radiation », *J. Environ. Radioact.*, vol. 99, n° 9, p. 1361- 1363, 2008.
- [105] F. for A. of E. Impact (Project), C. Williams, et L.-E. Holm, *Framework for assessment of environmental impact (FASSET) of ionising radiation in European ecosystems*. Institute of Physics Pub., 2004.
- [106] D. Copplestone, J. Hingston, et A. Real, « The development and purpose of the FREDERICA radiation effects database », *J. Environ. Radioact.*, vol. 99, n° 9, p. 1456- 1463, 2008.

- [107] J. Garnier-Laplace *et al.*, « A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances », *J. Radiol. Prot.*, vol. 30, n° 2, p. 215, 2010.
- [108] S. UNSCEAR, « Effects of Ionising Radiation, UNSCEAR 1996 Report to the General Assembly with Scientific Annex », ISBN 7-5022-2135-2, 1996.
- [109] F. Alonzo *et al.*, « DELIVERABLE (DN 5.1) Plans for laboratory radiation effects studies ».
- [110] W. F. Morgan et W. J. Bair, « Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective », *Radiat. Res.*, vol. 179, n° 5, p. 501- 510, 2013.
- [111] J. Roh *et al.*, « Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, n° 10, p. 3933- 3940, 2009.
- [112] D. Woodhead, « A possible approach for the assessment of radiation effects on populations of wild organisms in radionuclide-contaminated environments? », *J. Environ. Radioact.*, vol. 66, n° 1- 2, p. 181- 213, 2003.
- [113] A. N. Jha, « Ecotoxicological applications and significance of the comet assay », *Mutagenesis*, vol. 23, n° 3, p. 207- 221, 2008.
- [114] A. Fedorenkova, J. A. Vonk, H. R. Lenders, N. J. Ouborg, A. M. Breure, et A. J. Hendriks, « Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, n° 11, p. 4328- 4333, 2010.
- [115] K. S. B. Rose, « Lower limits of radiosensitivity in organisms, excluding man », *J. Environ. Radioact.*, vol. 15, n° 2, p. 113- 133, 1991.
- [116] B. G. Blaylock, C. W. Theodorakis, et L. R. Shugart, « Biological effects of ionizing radiation », in *Protection of the natural environment. International symposium on ionising radiation. Proceedings, V. 1*, 1996.
- [117] T. Nakamori *et al.*, « Effects of acute gamma irradiation on *Folsomia candida* (Collembola) in a standard test », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 71, n° 2, p. 590- 596, 2008.
- [118] J. Suzuki et N. Egami, « Mortality of the Earthworms, *Eisenia foetida*, after γ -irradiation at Different Stages of Their Life History », *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, vol. 24, n° 3, p. 209- 220, 1983.
- [119] T. Nakamori, Y. Kubota, T. Ban-Nai, Y. Fujii, et S. Yoshida, « Effects of acute gamma irradiation on soil invertebrates in laboratory tests », *Radioprotection*, vol. 44, n° 05, p. 421- 424, 2009.
- [120] D. Copplestone, S. Bielby, S. R. Jones, D. Patton, P. Daniel, et I. Gize, « Impact Assessment of ionising Radiation on Wildlife », 2001.
- [121] H. C. Panter, « Variations in radiosensitivity during development of the frog *Limnodynastes tasmaniensis* », *J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol.*, vol. 238, n° 2, p. 193- 199, 1986.
- [122] B. I. Sarapultsev et S. A. Geras'kin, « Genetic grounds of radioresistancy and the evolution », *Energoatomizdat Mosc. Russ.*, 1993.

- [123] D. Woodhead, « The impact of radioactive discharges on native British wild-life and the implications for environmental protection », Environment Agency, 1998.
- [124] U. N. S. C. on the E. of A. Radiation, « Sources and effects of ionizing radiation. UNSCEAR 1996 report to the General Assembly, with scientific annex », 1996.
- [125] T. Hertel-Aas, D. H. Oughton, A. Jaworska, H. Bjerke, B. Salbu, et G. Brunborg, « Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta) », *Radiat. Res.*, vol. 168, n° 5, p. 515- 526, 2007.
- [126] B. H. Erickson et P. G. Martin, « Effects of continuous prenatal γ radiation on the pig and rat », in *Biological and environmental effects of low-level radiation*, 1976.
- [127] B. H. Erickson et P. G. Martin, « Reproductive and genetic effects of continuous prenatal irradiation in the pig », *Teratology*, vol. 30, n° 1, p. 99- 106, 1984.
- [128] C. Ronnback, « Effects of continuous irradiation during gestation and suckling periods in mice. », 1965.
- [129] S. Muramatsu, H. Hanada, et T. Tsuchiya, « Effects of continuous gamma radiation on the reproductivity of mice », in *Late biological effects of ionizing radiation*, 1978.
- [130] E. W. Hupp, « Effects of continuous lifetime irradiation on Spanish goats », *Biol. Environ. Eff. Low-Level Radiat. Proc. Ser.*, vol. 1, p. 119- 126, 1976.
- [131] G. Pinon-Lataillade et J. Maas, « Continuous gamma-irradiation of rats: dose-rate effect on loss and recovery of spermatogenesis. », *Strahlentherapie*, vol. 161, n° 7, p. 421- 426, 1985.
- [132] Y. Hyodo-Taguchi, « Effects of chronic gamma-irradiation on spermatogenesis in the fish, *Oryzias latipes*, with special reference to regeneration of testicular stem cells », in *Radiation effects on aquatic organisms*, 1980.
- [133] J. F. Knowles, « Long-term irradiation of a marine fish, the plaice *Pleuronectes platessa*: an assessment of the effects on size and composition of the testes and of possible genotoxic changes in peripheral erythrocytes », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 75, n° 6, p. 773- 782, 1999.
- [134] F. L. Harrison et S. L. Anderson, « Effects of chronic irradiation on the reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata* », *Radiat. Res.*, vol. 140, n° 3, p. 401- 409, 1994.
- [135] J. F. Knowles et L. N. Greenwood, « The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae) », *Mar. Environ. Res.*, vol. 38, n° 3, p. 207- 224, 1994.
- [136] R. Gilbin, F. Alonzo, et J. Garnier-Laplace, « Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna* », *J. Environ. Radioact.*, vol. 99, n° 1, p. 134- 145, 2008.
- [137] F. W. Whicker, « Impacts on plants and animals », in *Health Impacts of Large releases of radionuclides. CIBA F SYMP*, vol. 203, 1997.

- [138] U. N. S. C. on the E. of A. Radiation, *Sources and effects of ionizing radiation: sources*, vol. 1. United Nations Publications, 2000.
- [139] H. Reyners, E. G. de Reyners, F. Poortmans, A. Crametz, H. Coffigny, et J.-R. Maisin, « Brain atrophy after foetal exposure to very low doses of ionizing radiation », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 62, n° 5, p. 619- 626, 1992.
- [140] A. Real, S. Sundell-Bergman, J. F. Knowles, D. S. Woodhead, et I. Zinger, « Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection », *J. Radiol. Prot.*, vol. 24, n° 4A, p. A123, 2004.
- [141] H. Vandenhove, N. Vanhoudt, A. Cuyppers, M. Van Hees, J. Wannijn, et N. Horemans, « Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways », *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 48, n° 9, p. 778- 786, 2010.
- [142] R. Gilbin, F. Alonzo, et J. Garnier-Laplace, « Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna* », *J. Environ. Radioact.*, vol. 99, n° 1, p. 134- 145, 2008.
- [143] A. Buisset-Goussen, « Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle: le nématode *Caenorhabditis elegans* », Aix-Marseille, 2014.
- [144] J. L. Hingston *et al.*, « The Environment Agency is the leading public body protecting and improving the environment in England and Wales. It's our job to make sure that air, land and water are looked after by everyone in today's society, so that tomorrow's generations inherit a cleaner, healthier world. », 2004.
- [145] J. C. Barescut *et al.*, « Terrestrial invertebrate population studies in the Chernobyl exclusion zone, Ukraine », *Radioprotection*, vol. 40, n° S1, p. S857- S863, 2005.
- [146] W. F. Morgan, « Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro », *Radiat. Res.*, vol. 159, n° 5, p. 567- 580, 2003.
- [147] O. Kovalchuk, P. Burke, J. Besplug, M. Slovack, J. Filkowski, et I. Pogribny, « Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation », *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 548, n° 1, p. 75- 84, 2004.
- [148] I. Kovalchuk, J. Molinier, Y. Yao, A. Arkhipov, et O. Kovalchuk, « Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation », *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 624, n° 1, p. 101- 113, 2007.
- [149] M. Donà *et al.*, « Gamma irradiation with different dose rates induces different DNA damage responses in *Petunia x hybrida* cells », *J. Plant Physiol.*, vol. 170, n° 8, p. 780- 787, 2013.
- [150] P. Hartman, P. Goldstein, M. Algarra, D. Hubbard, et J. Mabery, « The nematode *Caenorhabditis elegans* is up to 39 times more sensitive to gamma radiation generated from ¹³⁷Cs than from ⁶⁰Co », *Mutat. Res. Repair*, vol. 363, n° 3, p. 201- 208, 1996.

- [151] E. Maupas, « Modes et formes de reproduction des nematodes. », *Arch. Zool. Expérimentale Générale*, vol. 8, p. 463- 624, 1901.
- [152] A. Barrière et M.-A. Félix, « High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations », *Curr. Biol.*, vol. 15, n° 13, p. 1176- 1184, 2005.
- [153] K. Kiontke et W. Sudhaus, « Ecology of *Caenorhabditis* species », *WormBook*, vol. 9, p. 1- 14, 2006.
- [154] Z. F. Altun et D. H. Hall, « Handbook of *C. elegans* Anatomy », *WormAtlas Httpwww Wormatlas Orghandbookcontents Htm*, 2005.
- [155] C. Couillault et C. Kurz, « Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire », *Stal*, vol. 36, p. 59- 74, 2010.
- [156] L. N. Staniland, « The swarming of Rhabditid eelworms in mushroom houses », *Plant Pathol.*, vol. 6, n° 2, p. 61- 62, 1957.
- [157] S. Brenner, « The genetics of *Caenorhabditis elegans* », *Genetics*, vol. 77, n° 1, p. 71- 94, 1974.
- [158] A. Viñuela, L. B. Snoek, J. A. Riksen, et J. E. Kammenga, « Genome-wide gene expression regulation as a function of genotype and age in *C. elegans* », *Genome Res.*, vol. 20, n° 7, p. 929- 937, 2010.
- [159] L. W. Hillier, A. Coulson, J. I. Murray, Z. Bao, J. E. Sulston, et R. H. Waterston, « Genomics in *C. elegans*: so many genes, such a little worm », *Genome Res.*, vol. 15, n° 12, p. 1651- 1660, 2005.
- [160] C. Couillault *et al.*, « TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM », *Nat. Immunol.*, vol. 5, n° 5, p. 488, 2004.
- [161] M.-A. Félix et C. Braendle, « The natural history of *Caenorhabditis elegans* », *Curr. Biol.*, vol. 20, n° 22, p. R965- R969, 2010.
- [162] L. Byerly, R. C. Cassada, et R. L. Russell, « The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction », *Dev. Biol.*, vol. 51, n° 1, p. 23- 33, 1976.
- [163] J. E. Sulston, E. Schierenberg, J. G. White, et J. N. Thomson, « The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* », *Dev. Biol.*, vol. 100, n° 1, p. 64- 119, 1983.
- [164] G. von Ehrenstein et E. Schierenberg, « Cell lineages and development of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes. », *Cell Lineages Dev. Caenorhabditis Elegans Nematodes*, p. 1- 71, 1980.
- [165] E. A. Bucher et G. Seydoux, « Gastrulation in the nematode *Caenorhabditis elegans* », in *Seminars in Developmental Biology*, vol. 5, p. 121- 130, 1994.
- [166] W. B. Wood, « The nematode *Caenorhabditis elegans* », 1988.
- [167] Z. F. Altun et D. H. Hall, *Introduction.. WormAtlas. 2009.*

- [168] R. Lints et D. Hall, *Reproductive system, overview*. WormAtlas, 2009.
- [169] K. Machaca et S. W. L'Hernault, « The *Caenorhabditis elegans* *spe-5* gene is required for morphogenesis of a sperm-specific organelle and is associated with an inherent cold-sensitive phenotype », *Genetics*, vol. 146, n° 2, p. 567- 581, 1997.
- [170] T. Schedl, « 10 Developmental Genetics of the Germ Line », *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.*, vol. 33, p. 241- 269, 1997.
- [171] E. J. Hubbard et D. Greenstein, « Introduction to the germ line », *WormBook*, vol. 1, n° 4, 2005.
- [172] J. Kimble et D. Hirsh, « The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans* », *Dev. Biol.*, vol. 70, n° 2, p. 396- 417, 1979.
- [173] R. Ellis et T. Schedl, « Sex determination in the germ line », 2007.
- [174] A. Antebi, C. E. Norris, E. M. Hedgecock, et G. Garriga, « Cell and Growth Cone Migrations. », 1997.
- [175] J. McCarter, B. Bartlett, T. Dang, et T. Schedl, « On the Control of Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation in *Caenorhabditis elegans* », *Dev. Biol.*, vol. 205, n° 1, p. 111- 128, 1999.
- [176] M. A. Miller *et al.*, « A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation », *Science*, vol. 291, n° 5511, p. 2144- 2147, 2001.
- [177] T. E. Johnson et P. S. Hartman, « Radiation effects on life span in *Caenorhabditis elegans* », *J. Gerontol.*, vol. 43, n° 5, p. B137- B141, 1988.
- [178] B. Schumacher *et al.*, « Translational repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis », *Cell*, vol. 120, n° 3, p. 357- 368, 2005.
- [179] T. Takanami, A. Mori, H. Takahashi, et A. Higashitani, « Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans* », *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, n° 21, p. 4232- 4236, 2000.
- [180] S.-J. Lee, J.-S. Yook, S. M. Han, et H.-S. Koo, « A Werner syndrome protein homolog affects *C. elegans* development, growth rate, life span and sensitivity to DNA damage by acting at a DNA damage checkpoint », *Development*, vol. 131, n° 11, p. 2565- 2575, 2004.
- [181] B. Conradt et D. Xue, *Programmed cell death (October 6, 2005)*, *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook. 1.32. 1. 2005.
- [182] A. Bailly et A. Gartner, « Germ cell apoptosis and DNA damage responses », in *Germ Cell Development in C. elegans*, Springer, p. 249- 276, 2013.
- [183] W. B. Derry, A. P. Putzke, et J. H. Rothman, « *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance », *Science*, vol. 294, n° 5542, p. 591- 595, 2001.

- [184] M. X. Gao, E. H. Liao, B. Yu, Y. Wang, M. Zhen, et W. B. Derry, « The SCFFSN-1 ubiquitin ligase controls germline apoptosis through CEP-1/p53 in *C. elegans* », *Cell Death Differ.*, vol. 15, n° 6, p. 1054- 1062, 2008.
- [185] A. Gartner, P. R. Boag, et T. K. Blackwell, « Germline survival and apoptosis », 2005.
- [186] G. L. Anderson, W. A. Boyd, et P. Williams, « Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans* », *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, n° 4, p. 833- 838, 2001.
- [187] G. L. Anderson, R. D. Cole, et P. L. Williams, « Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans* », *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 23, n° 5, p. 1235- 1240, 2004.
- [188] R. H. Kessin, G. G. Gundersen, V. Zaydfudim, et M. Grimson, « How cellular slime molds evade nematodes », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, n° 10, p. 4857- 4861, 1996.
- [189] M. Dutilleul, B. Goussen, J.-M. Bonzom, S. Galas, et D. Réale, « Pollution breaks down the genetic architecture of life history traits in *Caenorhabditis elegans* », *PLoS One*, vol. 10, n° 2, p. e0116214, 2015.
- [190] T. Stiernagle, « Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.101. 1 », 2006.
- [191] P. Zhou et J. Regenstein, « Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret assay », *J. Food Sci.*, vol. 71, n° 8, 2006.
- [192] S. P. dit Ruys, J.-M. Bonzom, et S. Frelon, « Benchmarking of protein carbonylation analysis in *Caenorhabditis elegans*: specific considerations and general advice », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 99, p. 364- 373, 2016.
- [193] D. Huang, B. Sherman, et R. Lempicki, « Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protoc. 4 (1) », *DW HuangBT ShermanRA Lempicki2009Systematic Integr. Anal. Large Gene Lists Using DAVID Bioinforma. Resour. Nat. Protoc.*, vol. 4, n° 1, p. 4457, 2009.
- [194] M. R. Knowles *et al.*, « Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis », *Proteomics*, vol. 3, n° 7, p. 1162- 1171, 2003.
- [195] V. Strassberger, T. Fugmann, D. Neri, et C. Roesli, « Chemical proteomic and bioinformatic strategies for the identification and quantification of vascular antigens in cancer », *J. Proteomics*, vol. 73, n° 10, p. 1954- 1973, 2010.
- [196] V. J. Patel *et al.*, « A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches », *J. Proteome Res.*, vol. 8, n° 7, p. 3752- 3759, 2009.
- [197] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Lubner, I. Paron, N. Nagaraj, et M. Mann, « Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, n° 9, p. 2513- 2526, 2014.

- [198] J. Cox et M. Mann, « MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification », *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, n° 12, p. 1367, 2008.
- [199] B. Schwanhäusser *et al.*, « Global quantification of mammalian gene expression control », *Nature*, vol. 473, n° 7347, p. 337, 2011.
- [200] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, et M. Mann, « Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment », *J. Proteome Res.*, vol. 10, n° 4, p. 1794- 1805, 2011.
- [201] M. Kuzmic *et al.*, « In situ visualization of carbonylation and its co-localization with proteins, lipids, DNA and RNA in *Caenorhabditis elegans* », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 101, p. 465- 474, 2016.
- [202] J. Tamarit, A. de Hoogh, E. Obis, D. Alsina, E. Cabiscol, et J. Ros, « Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 12, p. 3778- 3788, 2012.
- [203] T. Zimmermann, « Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy », in *Microscopy Techniques*, Springer, p. 245- 265, 2005.
- [204] T. Nyström, « Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence », *EMBO J.*, vol. 24, n° 7, p. 1311- 1317, 2005.
- [205] J. F. Turrens, « Mitochondrial formation of reactive oxygen species », *J. Physiol.*, vol. 552, n° 2, p. 335- 344, 2003.
- [206] M. P. Murphy, « How mitochondria produce reactive oxygen species », *Biochem. J.*, vol. 417, n° 1, p. 1- 13, 2009.
- [207] L. Chen et K. Madura, « Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 13, p. 5599- 5606, 2005.
- [208] K. SHINOHARA, M. TOMIOKA, H. NAKANO, T. Shigenobu, I. T. O. Hisashi, et S. KAWASHIMA, « Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition », *Biochem. J.*, vol. 317, n° 2, p. 385- 388, 1996.
- [209] J. Beyette, G. G. MASON, R. Z. MURRAY, G. M. COHEN, et A. J. Rivett, « Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes », *Biochem. J.*, vol. 332, n° 2, p. 315- 320, 1998.
- [210] C. Wójcik, « Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 6, n° 1, p. 25- 48, 2002.
- [211] U. G. Lopes, P. Erhardt, R. Yao, et G. M. Cooper, « p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 20, p. 12893- 12896, 1997.
- [212] A. M. Pickering et K. J. Davies, « Degradation of Damaged Proteins-The Main Function of the 20S Proteasome », *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 109, p. 227, 2012.

- [213] A.-L. Bulteau, M. Moreau, C. Nizard, et B. Friguët, « Impairment of proteasome function upon UVA-and UVB-irradiation of human keratinocytes », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, n° 11, p. 1157- 1170, 2002.
- [214] T. Reinheckel, O. Ullrich, N. Sitte, et T. Grune, « Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 377, n° 1, p. 65- 68, 2000.
- [215] A. M. Pickering, A. L. Koop, C. Y. Teoh, G. Ermak, T. Grune, et K. J. Davies, « The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes », *Biochem. J.*, vol. 432, n° 3, p. 585- 595, 2010.
- [216] T. REINHECKEL, N. SITTE, O. ULLRICH, U. KUCKELKORN, K. J. DAVIES, et T. GRUNE, « Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress », *Biochem. J.*, vol. 335, n° 3, p. 637- 642, 1998.
- [217] I. V. Kjærsgård, M. R. Nørrelykke, C. P. Baron, et F. Jessen, « Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n° 25, p. 9437- 9446, 2006.
- [218] N. Sitte *et al.*, « Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts », *FASEB J.*, vol. 14, n° 11, p. 1490- 1498, 2000.
- [219] B. Friguët et L. I. Szwedá, « Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein », *FEBS Lett.*, vol. 405, n° 1, p. 21- 25, 1997.
- [220] A. Lilienbaum, « Relationship between the proteasomal system and autophagy », *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 4, n° 1, p. 1, 2013.
- [221] W.-X. Ding *et al.*, « Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability », *Am. J. Pathol.*, vol. 171, n° 2, p. 513- 524, 2007.
- [222] C. Wang et X. Wang, « The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, n° 2, p. 188- 194, 2015.
- [223] R. R. Kopito, « Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation », *Trends Cell Biol.*, vol. 10, n° 12, p. 524- 530, 2000.
- [224] M. Takalo, A. Salminen, H. Soininen, M. Hiltunen, et A. Haapasalo, « Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases », *Am J Neurodegener Dis*, vol. 2, n° 1, p. 1- 14, 2013.
- [225] N. Morgner *et al.*, « Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90 », *Cell Rep.*, vol. 11, n° 5, p. 759- 769, 2015.
- [226] P. Hainaut et J. Milner, « Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. », *EMBO J.*, vol. 11, n° 10, p. 3513- 3520, 1992.

- [227] A. M. Davidoff, J. D. Iglehart, et J. R. Marks, « Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, n° 8, p. 3439- 3442, 1992.
- [228] E. Ai, D. S. Poole, et A. R. Skop, « RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans* », *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, n° 6, p. 1629- 1638, 2009.
- [229] F. Pajonk et W. H. McBride, « Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses », *Radiother. Oncol.*, vol. 59, n° 2, p. 203- 212, 2001.
- [230] A. R. Skop et J. G. White, « The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos », *Curr. Biol.*, vol. 8, n° 20, p. 1110- 1117, 1998.
- [231] C. E. Brown, T. Lechner, L. Howe, et J. L. Workman, « The many HATs of transcription coactivators », *Trends Biochem. Sci.*, vol. 25, n° 1, p. 15- 19, 2000.
- [232] M. J. Carrozza, R. T. Utley, J. L. Workman, et J. Côté, « The diverse functions of histone acetyltransferase complexes », *TRENDS Genet.*, vol. 19, n° 6, p. 321- 329, 2003.
- [233] B. Grant et D. Hirsh, « Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte », *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, n° 12, p. 4311- 4326, 1999.
- [234] V. Matyash *et al.*, « Distribution and Transport of Cholesterol in *Caenorhabditis elegans* », *Mol. Biol. Cell*, vol. 12, n° 6, p. 1725- 1736, 2001.
- [235] A. S. DePina, W. B. Iser, S.-S. Park, S. Maudsley, M. A. Wilson, et C. A. Wolkow, « Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms », *BMC Physiol.*, vol. 11, n° 1, p. 11, 2011.
- [236] H. Wang, J. T. Tan, A. Emelyanov, V. Korzh, et Z. Gong, « Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio* », *Gene*, vol. 356, p. 91- 100, 2005.
- [237] R. N. Finn, G. C. Østby, B. Norberg, et H. J. Fyhn, « In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx », *J. Exp. Biol.*, vol. 205, n° 2, p. 211- 224, 2002.
- [238] E. Lubzens, G. Young, J. Bobe, et J. Cerdà, « Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed », *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 165, n° 3, p. 367- 389, 2010.
- [239] C. Britton et L. Murray, « Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* », *J. Cell Sci.*, vol. 117, n° 21, p. 5133- 5143, 2004.
- [240] A. Buisset-Goussen, B. Goussen, C. Della-Vedova, S. Galas, C. Adam-Guillermin, et C. Lecomte-Pradines, « Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans* », *J. Environ. Radioact.*, vol. 137, p. 190- 197, 2014.
- [241] I. Kolomyitseva, E. Novoselova, T. Kulagina, et A. Kuzin, « The effect of ionizing radiation on lipid metabolism in lymphoid cells », *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, vol. 51, n° 1, p. 53- 58, 1987.

- [242] Z. Niyas, P. S. Variyar, A. S. Gholap, et A. Sharma, « Effect of γ -irradiation on the lipid profile of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 22, p. 6502- 6504, 2003.
- [243] M. J. Steinbaugh *et al.*, « Lipid-mediated regulation of SKN-1/Nrf in response to germ cell absence », *Elife*, vol. 4, p. e07836, 2015.
- [244] R. P. Oliveira *et al.*, « Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf », *Aging Cell*, vol. 8, n° 5, p. 524- 541, 2009.
- [245] A. F. Kisselev et A. L. Goldberg, « Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates », *Methods Enzymol.*, vol. 398, p. 364- 378, 2005.
- [246] C. T. Aiken, R. M. Kaake, X. Wang, et L. Huang, « Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, n° 5, p. R110. 006924, 2011.
- [247] X. Wang, J. Yen, P. Kaiser, et L. Huang, « Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress », *Sci. Signal.*, vol. 3, n° 151, p. ra88, 2010.
- [248] R. Shringarpure, T. Grune, J. Mehlhase, et K. J. Davies, « Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 1, p. 311- 318, 2003.
- [249] T. Grune, T. Reinheckel, et K. J. Davies, « Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. », *FASEB J.*, vol. 11, n° 7, p. 526- 534, 1997.
- [250] M. Rechsteiner et C. P. Hill, « Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors », *Trends Cell Biol.*, vol. 15, n° 1, p. 27- 33, 2005.
- [251] X. Li, O. Matilainen, C. Jin, K. M. Glover-Cutter, C. I. Holmberg, et T. K. Blackwell, « Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity », *PLoS Genet*, vol. 7, n° 6, p. e1002119, 2011.
- [252] A. Caratero, M. Courtade, L. Bonnet, H. Planel, et C. Caratero, « Effect of a continuous gamma irradiation at a very low dose on the life span of mice », *Gerontology*, vol. 44, n° 5, p. 272- 276, 1998.
- [253] S. Z. Liu, W. H. Liu, et J. B. Sun, « Radiation hormesis: its expression in the immune system. », *Health Phys.*, vol. 52, n° 5, p. 579- 583, 1987.
- [254] A. C. Upton, « Radiation hormesis: data and interpretations », *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 31, n° 4- 5, p. 681- 695, 2001.
- [255] J. Korzelius, S. Ruijtenberg, V. Portegijs, H. Xu, H. R. Horvitz, et S. van den Heuvel, « *C. elegans* MCM-4 is a general DNA replication and checkpoint component with an epidermis-specific requirement for growth and viability », *Dev. Biol.*, vol. 350, n° 2, p. 358- 369, 2011.
- [256] S. J. Elledge, « Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis », *Science*, vol. 274, n° 5293, p. 1664- 1672, 1996.
- [257] J. M. Bailis et S. L. Forsburg, « MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair », *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 14, n° 1, p. 17- 21, 2004.

- [258] K. M. Glover-Cutter, S. Lin, et T. K. Blackwell, « Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf », *PLoS Genet.*, vol. 9, n° 9, p. e1003701, 2013.
- [259] R. Van Der Hoeven, K. C. McCallum, M. R. Cruz, et D. A. Garsin, « Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans* », *PLoS Pathog.*, vol. 7, n° 12, p. e1002453, 2011.
- [260] B. Head et A. Aballay, « Recovery from an acute infection in *C. elegans* requires the GATA transcription factor ELT-2 », *PLoS Genet.*, vol. 10, n° 10, p. e1004609, 2014.
- [261] M.-X. Qian *et al.*, « Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis », *Cell*, vol. 153, n° 5, p. 1012- 1024, 2013.
- [262] J. Scheel, J. Srinivasan, U. Honnert, A. Henske, et T. V. Kurzchalia, « Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans* », *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, n° 2, p. 127, 1999.
- [263] J. Garnier-Laplace, M. Gilek, S. Sundell-Bergman, et C.-M. Larsson, « Assessing ecological effects of radionuclides: data gaps and extrapolation issues », *J. Radiol. Prot.*, vol. 24, n° 4A, p. A139, 2004.
- [264] I. Kouranti et A. Peyroche, « Protein degradation in DNA damage response », présenté à *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 23, p. 538- 545, 2012.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tableau 23 : Liste exhaustive des protéines variantes entre les différentes conditions d'exposition et les contrôles, identifiées et caractérisées dans les banques de données après irradiation aiguë. «--» signifie que la protéine est réprimée par rapport aux témoins (ratio d'intensités en LFQ inférieur à 2) et « ++ » signifie que la protéine est sur-exprimée par rapport aux témoins (ratio d'intensités en LFQ supérieur à 2)

ID gène	0,5Gy vs contrôles	1Gy vs contrôles	3,3Gy vs contrôles
<i>rps-19</i>	-	-	--
<i>hat-1</i>	-	--	--
<i>lrch-1</i>		++	
<i>acn-1</i>		++	
<i>noah-2</i>		++	
<i>sym-1</i>		++	
<i>tag-297</i>		++	
<i>noah-1</i>		++	
<i>glf-1</i>		++	
<i>col-14</i>		++	
<i>asp-10</i>		+	+
<i>mup-4</i>		+	+
<i>ttr-14</i>		+	+
<i>lys-6;lys-5</i>		+	+
<i>clcc-63</i>		+	+
<i>chdp-1</i>		-	-
<i>cat-4</i>		-	-
<i>vit-5</i>		-	-
<i>vit-4</i>		-	-
<i>vit-1</i>		--	-
<i>far-1</i>		--	--
<i>vit-3</i>		--	-
<i>lrch-1</i>			++
<i>ttr-18</i>			++
<i>acn-1</i>			++
<i>ego-2</i>			++
<i>obr-3</i>			++
<i>unc-115</i>			++
<i>noah-2</i>			++
<i>tag-297</i>			++
<i>map-1</i>			++
<i>sym-1</i>			++
<i>col-139</i>			++
<i>noah-1</i>			++

<i>col-48</i>			++
<i>aos-1</i>			+
<i>col-14</i>			+
<i>col-98</i>			+
<i>col-19</i>			+
<i>col-159;col-160</i>			+
<i>col-97;sqt-3;col-109;col-43</i>			+
<i>glf-1</i>			+
<i>hpo-5</i>			+
<i>ego-1</i>			+
<i>ifb-2</i>			+
<i>lipl-5</i>			+
<i>lys-1</i>			+
<i>ugt-50</i>			+
<i>cllec-50</i>			+
<i>nep-1</i>			+
<i>leo-1</i>			+
<i>lmp-1</i>			+
<i>ryr-1</i>			+
<i>imp-3</i>			+
<i>mif-2</i>			+
<i>cllec-65</i>			+
<i>pad-1</i>			+
<i>rpb-7</i>			+
<i>let-805</i>			+
<i>emc-1</i>			+
<i>tag-196</i>			+
<i>asp-13</i>			+
<i>coq-3</i>			+
<i>aagr-4</i>			+
<i>hmr-1</i>			+
<i>atg-5</i>			+
<i>ppw-2</i>			+
<i>smg-2</i>			+
<i>cogc-3</i>			+
<i>mrp-5</i>			+
<i>stc-1</i>			+
<i>npp-6</i>			+
<i>cpr-5</i>			+
<i>sur-5</i>			+
<i>fln-2</i>			+
<i>vig-1</i>			+
<i>alg-1</i>			+
<i>iffb-1</i>			+

<i>mec-7</i>			+
<i>alh-3</i>			+
<i>rps-20</i>			+
<i>rps-21</i>			+
<i>copa-1</i>			+
<i>lys-4</i>			+
<i>pbs-5</i>			+
<i>tba-4</i>			+
<i>chc-1</i>			+
<i>haf-4</i>			+
<i>rpa-1</i>			-
<i>gpi-1</i>			-
<i>EIF-3.L</i>			-
<i>spc-1</i>			-
<i>srs-2</i>			-
<i>ima-2</i>			-
<i>aldo-1</i>			-
<i>rpt-4</i>			-
<i>ivd-1</i>			-
<i>tkk-1</i>			-
<i>mel-32</i>			-
<i>got-2.2</i>			-
<i>EIF-3.E</i>			-
<i>cgh-1</i>			-
<i>nuo-2</i>			-
<i>cdc-48.1</i>			-
<i>alh-4</i>			-
<i>tag-170</i>			-
<i>cct-4</i>			-
<i>rpn-3</i>			-
<i>gstk-1</i>			-
<i>air-1</i>			-
<i>pfkb-1.1</i>			-
<i>rpac-40</i>			-
<i>irs-1</i>			-
<i>tim-44</i>			-
<i>nft-1</i>			-
<i>rpn-1</i>			-
<i>mrps-9</i>			-
<i>rpt-5</i>			-
<i>kin-2</i>			-
<i>rpl-15</i>			-
<i>tag-165</i>			-
<i>rab-7</i>			-
<i>ger-1</i>			-

<i>ubh-4</i>			-
<i>pges-2</i>			-
<i>acdh-10</i>			-
<i>lis-1</i>			-
<i>pck-1</i>			-
<i>pdhb-1</i>			-
<i>mpst-1</i>			-
<i>hsp-60</i>			-
<i>rpn-9</i>			-
<i>gss-1</i>			-
<i>ech-1.2</i>			-
<i>nuo-4</i>			-
<i>mrps-31</i>			-
<i>ymel-1</i>			-
<i>let-754</i>			-
<i>bcat-1</i>			-
<i>cdc-37</i>			-
<i>app-1</i>			-
<i>ncbp-1</i>			-
<i>tsfm-1</i>			-
<i>rpn-8</i>			-
<i>ctps-1</i>			-
<i>let-92</i>			-
<i>asna-1</i>			-
<i>asns-2</i>			-
<i>acox-1</i>			-
<i>ech-4</i>			-
<i>dhs-21</i>			-
<i>rop-1</i>			-
<i>imb-1</i>			-
<i>atln-1</i>			-
<i>unc-25</i>			-
<i>prdx-6</i>			-
<i>AP-1</i>			-
<i>cif-1</i>			-
<i>rpl-34</i>			-
<i>pcyt-1</i>			-
<i>vha-14</i>			-
<i>pyp-1</i>			-
<i>nduf-2.2</i>			-
<i>pmt-1</i>			-
<i>mrps-15</i>			-
<i>emc-2</i>			-
<i>cct-7</i>			-
<i>mrpl-13</i>			-

<i>dhs-6</i>			-
<i>ran-1</i>			-
<i>fnta-1</i>			-
<i>icd-1</i>			-
<i>rps-12</i>			-
<i>tag-242</i>			-
<i>gst-6</i>			-
<i>icl-1</i>			-
<i>cfim-1</i>			-
<i>ugt-12</i>			-
<i>phb-2</i>			-
<i>gdh-1</i>			-
<i>smz-1;smz-2</i>			-
<i>pah-1</i>			-
<i>rpl-7A</i>			-
<i>F46H5.3</i>			-
<i>Y38F1A.6</i>			-
<i>his-11;his-4;his-48;his-41;his-39</i>			-
<i>moma-1</i>			-
<i>rps-24</i>			-
<i>ftt-2</i>			-
<i>nuo-6</i>			-
<i>hel-1</i>			-
<i>lap-1</i>			-
<i>mlc-2</i>			-
<i>sod-2</i>			-
<i>skr-1</i>			-
<i>rpl-5</i>			-
<i>cct-8</i>			-
<i>chch-3</i>			-
<i>cdr-4</i>			-
<i>nud-1</i>			-
<i>pam-1</i>			-
<i>mtch-1</i>			-
<i>cpi-2</i>			-
<i>nkat-3</i>			-
<i>tomm-20</i>			-
<i>pud-2.1</i>			-
<i>calu-1</i>			-
<i>pat-6</i>			-
<i>mrpl-17</i>			-
<i>cyp-25a2</i>			-
<i>ggtb-1</i>			-
<i>prdx-2</i>			-

<i>asb-1</i>			-
<i>dnj-16</i>			-
<i>sdhb-1</i>			-
<i>got-1.2</i>			-
<i>dpt-1</i>			-
<i>cts-1</i>			-
<i>mrps-7</i>			-
<i>rps-7</i>			-
<i>fat-3</i>			-
<i>rpl-25.2</i>			-
<i>rps-17</i>			-
<i>rpl-30</i>			-
<i>gst-7</i>			-
<i>sec-22</i>			-
<i>cyc-1</i>			-
<i>cdr-2</i>			-
<i>cdr-6</i>			--
<i>rpl-10a</i>			--
<i>aldo-2</i>			--
<i>mdt-28</i>			--
<i>mrpl-9</i>			--
<i>rpa-0</i>			--
<i>rpl-25.1</i>			--
<i>vha-8</i>			--
<i>gst-38</i>			--
<i>hpd-1</i>			--
<i>rpl-27</i>			--
<i>rpl-36</i>			--
<i>rpl-35</i>			--
<i>atp-5</i>			--
<i>pfkb-1.2</i>			--
<i>vha-10</i>			--
<i>cpn-4</i>			--
<i>rmd-2</i>			--
<i>sti-1</i>			--
<i>ubc-9</i>			--
<i>far-2</i>			--
<i>cco-2</i>			--
<i>mag-1</i>			--
<i>did-2</i>			--

ANNEXE 2

Tableau 24 : Liste exhaustive des protéines variantes entre les différentes conditions d'exposition et les contrôles, identifiées et caractérisées dans les banques de données après irradiation chronique. «--» signifie que la protéine est réprimée par rapport aux témoins (ratio d'intensités en LFQ inférieur à 2) et « ++ » signifie que la protéine est sur-exprimée par rapport aux témoins (ratio d'intensités en LFQ supérieur à 2)

ID gène	0,5Gy vs controles	1Gy vs controles	3,3Gy vs controles
<i>dpf-2</i>	++		
<i>clcc-87</i>	++	+	
<i>vit-3</i>	+	+	++
<i>vit-1</i>	+	+	+
<i>clcc-91</i>	+		
<i>vit-5</i>	+	+	+
<i>daf-18</i>	+		
<i>vit-4</i>	+	+	+
<i>nasp-2</i>	+	+	
<i>cpg-2</i>	+		
<i>ttr-50</i>	+		
<i>clcc-88</i>	+		
<i>gln-6</i>	+	+	
<i>mcm-6</i>	+		
<i>cpg-1</i>	+		
<i>vit-2</i>	+	+	+
<i>gpd-1</i>	+		
<i>vit-6</i>	+	+	+
<i>pcn-1</i>	+		
<i>mcm-2</i>	+		
<i>obr-1</i>	+		
<i>mcm-3</i>	+		
<i>phy-2</i>	-		
<i>col-104</i>	--	--	--
<i>sym-1</i>	--	--	--
<i>col-14</i>	--	--	--
<i>noah-1</i>	--	--	--
<i>col-48</i>	--	-	--
<i>mlt-11</i>	--		
<i>mlt-8</i>	--	--	--
<i>noah-2</i>	--	--	--
<i>acn-1</i>	--	--	--
<i>glf-1</i>	--	--	--
<i>lon-8</i>	--		
<i>chch-3</i>		++	
<i>mlc-1</i>		+	
<i>asb-1</i>		+	

<i>mcm-7</i>		+	
<i>sip-1</i>		+	
<i>cat-4</i>		+	
<i>acly-2</i>		+	
<i>ptr-23</i>		-	
<i>clec-67;clec-72</i>	-	-	
<i>lrp-1</i>		-	-
<i>tag-131</i>		-	
<i>pmr-1</i>		-	
<i>nep-1</i>		-	-
<i>hke-4.2</i>		-	
<i>aqp-7</i>		-	
<i>sqt-3;col-109;col-97;col-43</i>	-		
<i>emc-3</i>		-	
<i>hmt-1</i>	--		
<i>ttr-15</i>			+
<i>aldo-2</i>			+
<i>perm-2</i>			+
<i>tbh-1</i>			+
<i>calu-1</i>			+
<i>mca-3</i>			-
<i>lec-10</i>			-
<i>dpy-4</i>			--

Valorisations scientifiques de la thèse

Communications orales

-**Dubois Cécile.**, Catherine Lecomte, Mira Kuzmic, Sebastien Pyr dit Ruys, Luc Camoin, Romain Ladouce, Simon Galas, Sandrine Frelon. Approche intégrée des effets des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines. **Journées des thèses de l'IRSN.** (Le Croisic, France, Mars 2016)

-**Dubois Cécile.**, Catherine Lecomte, Mira Kuzmic, Sebastien Pyr dit Ruys, Luc Camoin, Romain Ladouce, Simon Galas, Sandrine Frelon. Is protein carbonylation a sensitive effect marker of gamma irradiation damage ? Comparison between acute and chronic irradiation. **Symposium SETAC Europe** (Ghent, Belgique, Septembre 2016)

- **Dubois Cécile.**, Catherine Lecomte, Mira Kuzmic, Sebastien Pyr dit Ruys, Luc Camoin, Matthieu Pophillat, Patrick Fourquet, Stéphane Audebert, Simon Galas, Sandrine Frelon. Approche intégrée des effets des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines. **Journées du groupe de recherche en écotoxicologie aquatique** (IRSTEA, Lyon, France, Juin 2017)

- **Dubois Cécile.**, Catherine Lecomte, Sébastien Pyr dit Ruys, Mira Kuzmic, Luc Camoin, Romain Ladouce, Simon Galas, Sandrine Frelon. Proteome modulation as an early marker of gamma irradiation effect on *Caenorhabditis elegans* egg hatchability? **Congrès SETAC Europe** (Bruxelles, Belgique, Mai 2017)

Communications affichées

- **Dubois Cécile.,** Catherine Lecomte, Mira Kuzmic, Sebastien Pyr dit Ruys, Simon Galas, Sandrine Frelon. Approche intégrée des effets des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines . **Journées des thèses de l'IRSN.** (L'île sur la Sorgue, France, Mars 2015)



IRSN
INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Approche intégrée des dommages des rayonnements ionisants : de l'ADN aux protéines

¹Cécile Dubois Contact : cecile.dubois@irsn.fr



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Responsables IRSN : ¹Frelon S., ²Lecomte-Pradines C.

¹Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transfert des radionucléides (LZBT)/ IRSN / PRP-ENV/SERIS-Cadarache //

²Laboratoire d'Ecotoxicologie (LECO) / IRSN / PRP-ENV/SERIS-Cadarache

Directeur de Thèse : S. GALAS
Institut des biomolécules Max Mousseron /
Université de Montpellier

Contexte et état de l'art

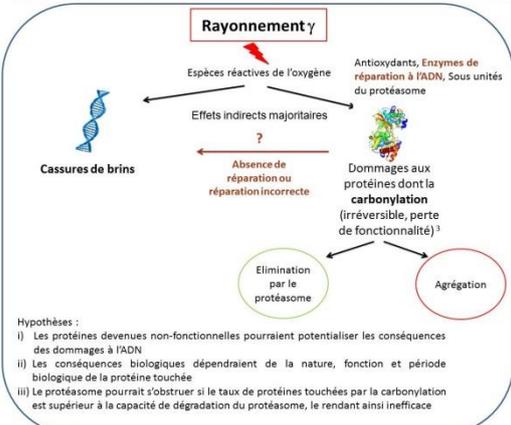
Par la nature ubiquiste des rayonnements ionisants, l'exposition chronique à de faibles doses est une problématique environnementale majeure. D'autant plus, que très peu d'études concerne les effets d'une exposition chronique. Les données ainsi acquises après expositions aiguës ont été extrapolées au chronique¹, ce qui crée une source d'incertitudes, d'autant plus que les effets sont *a priori* différents entre l'aigu et le chronique.

→ **Nécessité d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de toxicité radio-induits après irradiation chronique faibles doses**

Alors que les modèles classiques de radiotoxicité considèrent les dommages à l'ADN comme la lésion critique universelle dans les cellules, plusieurs études ont montré que les protéines, étaient les cibles initiales des dégâts d'irradiation cellulaire, notamment via leur carbonylation². Cette modification post-traductionnelle est irréversible et peut induire une perte de fonction de la protéine endommagée³. Ce dommage existe à l'état physiologique, mais peut être augmenté après stress (irradiation, dessiccation)⁴. Au niveau basal de production les protéines carbonylées sont éliminées par le protéasome, mais produites en grandes quantités elles vont obstruer celui-ci, le rendant alors inefficace.

Des études ont été menées sur la carbonylation des protéines radio-induite, mais seulement après irradiation aiguë fortes doses . A ce jour aucun mécanisme clair n'a été identifié, et aucune étude n'a investigué la cinétique de production des protéines carbonylées et leurs conséquences biologiques après irradiation chronique à des doses modérées, voire environnementales.

Rayonnement γ



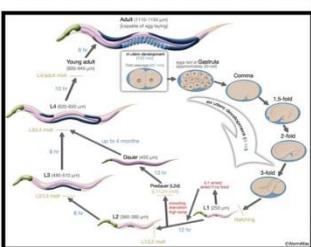
Hypothèses :

- i) Les protéines devenues non-fonctionnelles pourraient potentialiser les conséquences des dommages à l'ADN
- ii) Les conséquences biologiques dépendraient de la nature, fonction et période biologique de la protéine touchée
- iii) Le protéasome pourrait s'obstruer si le taux de protéines touchées par la carbonylation est supérieur à la capacité de dégradation du protéasome, le rendant ainsi inefficace

Choix du modèle biologique

Caenorhabditis elegans :

- nématode eucaryote pluricellulaire, bactériophage et ubiquiste (eaux interstitielles du sol)
- 1mm à l'âge adulte
- Génome séquencé et banque de mutants considérable
- cycle de vie 3 jours à 20°C (exposition sur tout son cycle de vie et mesure de reproduction)
 - ✓ éclosion : 12h
 - ✓ Jeune adulte : 56h
 - ✓ Adulte gravide : 65h



Nécessité de bien les synchroniser

A fortes doses d'irradiation aiguë, la carbonylation des protéines a été corrélée à une baisse de sa fécondité⁶
Une diminution de sa reproduction corrélée à i) une augmentation de l'apoptose, ii) arrêt du cycle cellulaire et iii) diminution du stock de spermatozoïdes après irradiation chronique à été démontrée à partir de 42mGy/h⁷

Objectifs du projet de thèse

- 1) Déterminer la sensibilité du marqueur carbonylation des protéines après irradiation aiguë en dessous de 200Gy (cinétique d'apparition, taux et nature des protéines endommagées)
- 2) Comparer le mode d'irradiation aigu vs chronique sur la base des résultats de l'objectif 1 par la mise en œuvre d'une approche intégrant les dommages à l'ADN, la caractérisation du statut redox cellulaire, la mesure de l'activité du protéasome et la mesure de paramètres macroscopiques tel que la reproduction

Approche méthodologique choisie

Méthodologie à mettre au point

- Protéines carbonylées : taux et nature (2D DIGE + spectrométrie de masse)
- Activité Redox : Dosage des EROs par sondes DCFHDA

Chronique vs aigu

Méthodologie déjà acquise

- Reproduction : Comptage progéniture
- Activité du protéasome : Mesure du taux de dégradation d'un peptide fluorescent
- Dommages à l'ADN : q-PCR

Première expérience prévue

Irradiation γ aiguë

2 doses d'irradiation : 2-200Gy



C. elegans : stade jeune adulte

Mesure de la cinétique d'apparition des protéines carbonylées (et élimination) post irradiation aiguë (t1h, t2h, t4h, t6h, t10h, t24h)

Oxyblot (information globale sur le taux de protéines carbonylées)

Références

¹Garnier-Laplace, J., M. Gilek, et al. (2004). "Assessing ecological effects of radionuclides: data gaps and extrapolation issues." *Journal of Radiological Protection* 24(4A): A139. ²Krisko, A. and M. Radman (2010). "Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(12): 14373-14377. ³Fedorova, M., R. C. Bullen, et al. (2014). "Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies." *Mass spectrometry reviews* 33(2): 79-97. ⁴Goudreau, J. and H. Aguilaniu (2010). "Carbonylated proteins are eliminated during reproduction in *C. elegans*." *Aging Cell* 9(6): 991-1003. ⁵http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/introframeset.html#krisko, A., M. Leroy, et al. (2012). "Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7): 2354-2357. ⁶Buisset-Goussien, A., B. Goussien, et al. (2014). "Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*." *Journal of Environmental Radioactivity* 137(0): 190-197.

- **Dubois Cécile.**, Catherine Lecomte, Mira Kuzmic, Sebastien Pyr dit Ruys, Luc Camoin, Romain Ladouce, Simon Galas, Sandrine Frelon. Approche intégrée des effets des dommages des rayonnements ionisants chez *Caenorhabditis elegans* : de l'ADN aux protéines. Journées de l'école doctorale CBS2 (Montpellier, France, Mai 2016)

Contact : cecile.dubois@irsn.fr



FAIRE AVANCER LA SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Integrated approach to characterize γ irradiation damages on *Caenorhabditis elegans* : from DNA to proteins

¹Cécile Dubois, ¹Catherine Lecomte, ¹Sebastien Pyr dit Ruys, ¹Mira Kuzmic, ²Simon Galas, ³Romain Ladouce, ⁴Luc Camoin, ¹Sandrine Frelon

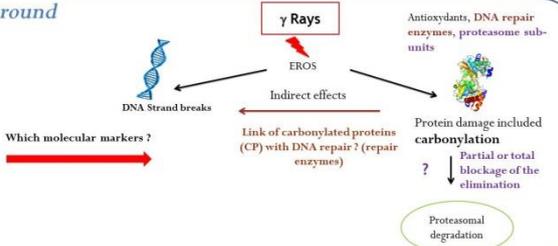
¹Laboratoire d'écotoxicologie (LECO) / IRSN / PRP-ENV/SERIS-Cadarache / ²Institut des biomolécules Max Mousseron / Université de Montpellier / ³Mediterranean Institute for Life Sciences / Split - Croatie / ⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille / Marseille




Background

- Ubisquistic nature of γ rays
- Lack of data about chronic exposures (only 36%)
- Different effects between acute vs chronic exposures \rightarrow different underlying mechanisms^{1,2}
- Data on *C. elegans* after γ irradiation:
 - Acute: Reproduction decrease correlated to an increase in carbonylated proteins³
From 10 to 120Gy: damages in the germline \rightarrow reproduction decrease⁴
 - Chronic: From 42mGy/h reproduction decreases correlated to: increase of apoptosis, decrease of spermatozooids stock and cellular cycle arrest⁵.

Need to improve the understanding of radiation-induced molecular mechanisms after chronic exposure



Which molecular markers?

Aims

Objective of my PhD project: Understanding the role of protein carbonylation after chronic irradiation of *C. elegans* regarding other molecular endpoints (DNA damage and repair, proteasomal activity) and their link with macroscopic endpoints (reproduction, lifespan)

Objective 1: Characterize the threshold of *C. elegans* carbonylation after acute γ irradiation between 0 and 200Gy

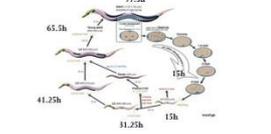
Objective 2: Compare the two irradiation modes Acute vs. Chronic by the same integrated approach on one final radiation dose (1 to 2 doses chosen)

Biological model

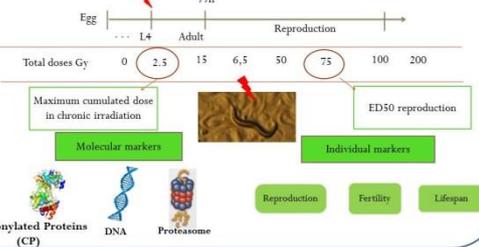
*Caenorhabditis elegans*⁶

Short lifecycle : 3 days at 20°C \rightarrow chronic exposures (during all the lifecycle of the nematode : from egg stage to sexual maturity stage (L4/YA))

Genome fully sequenced and mutants \rightarrow mechanisms elucidation



Experimental strategy



Institut Curie Cesium 137 irradiator

Maximum cumulated dose in chronic irradiation

ED50 reproduction

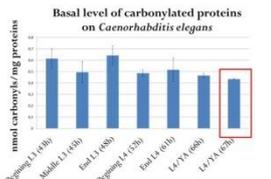
Molecular markers: Carbonylated Proteins (CP), DNA, Proteasome

Individual markers: Reproduction, Fertility, Lifespan

Results of objective 1

i-Choice of *C. elegans* life stage

Basal level of carbonylated proteins on *Caenorhabditis elegans*

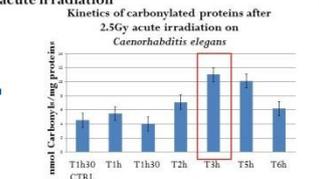


Life stages (hours post synchronization)

14-14/YA adult stage = basal level of carbonylation

ii-Determine the protein carbonyl production kinetics after acute irradiation

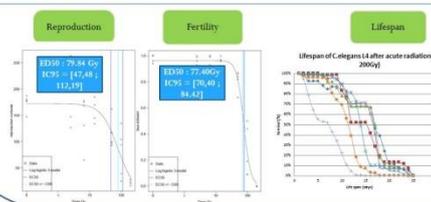
Kinetics of carbonylated proteins after 2.5Gy acute irradiation on *Caenorhabditis elegans*



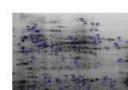
Optimal time of PC analysis post irradiation = 3h

iii- Integrated approach to ionizing radiation damage in *C. elegans* after acute radiation: from DNA to proteins

Individual markers



Molecular markers



Gel 2D acute 2,5Gy : carbonylated proteins

Carbonylated proteins relative to controls		Total proteins relative to controls	
Up-carbonylated	Down-carbonylated	Up-expressed	Down-expressed
73	6	24	10

113 protein spots differing between controls and exposed \rightarrow 15 identified by mass spectrometry

Collaboration Medis and Proteomic platform Marseille (MAP)

Conclusions and perspectives

The first results showed that CP level depends on the nematode life cycle, with a minimum of CP level for young adult stage (sexual maturity). Kinetics of CP production performed at this stage after 2.5 and 75 Gy (data not shown) acute exposures showed a maximum CP rate 3h post irradiation. Finally, the study of carbonylomes by 2D analysis showed 113 carbonylated protein spots differing between controls and exposed, 15 has been identified by mass spectrometry. The same methodology will be performed after multiple acute- and chronic- irradiation, to characterize CP sensitivity between 0 and 200Gy and finally compare the two irradiation-modes through CP and other molecular and individual parameters.

References: ¹Garnier-Laplace, J., S. Gerat'kin, et al. (2013). "Are radioisotopy data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates." *Journal of Environmental Radioactivity* 121(0): 12-21. ²Buiset-Gossens, A., B. Gossens, et al. (2014). "Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*." *Journal of Environmental Radioactivity* 137(0): 190-197. ³Krisko, A., M. Leroy, et al. (2012). "Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in beldioid rotifers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7): 2354-2357. ⁴Bully, A. and A. Gartner (2011). *Caenorhabditis elegans Radiation Responses. Molecular Determinants of Radiation Responses*. Springer: 101-123. ⁵http://www.wormbook.org ⁶Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77(1): 71-94.

211

- **Cécile Dubois,** Matthieu Pophillat, Luc Camoin, Patrick Fourquet, Catherine Lecomte, Sébastien Pyr dit Ruys, Simon Galas, Sandrine Frelon. Proteome modulation as an early marker of gamma irradiation effect on *Caenorhabditis elegans* egg hatchability? **Congrès SMMAP (Spectrométrie de Masse, Métabolomique et Analyse Protéomique)** (Marne la Vallée, France, Octobre 2017)



INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Proteome modulation as an early marker of γ irradiation effect on *Caenorhabditis elegans* egg hatchability?

¹Cécile Dubois, ²Matthieu Pophillat ²Luc Camoin, ²Patrick Fourquet, ¹Catherine Lecomte, ¹Sébastien Pyr dit Ruys, ¹Mira Kuzmic, ³Simon Galas, ¹Sandrine Frelon

Contact : ceciledubois98@gmail.com




Laboratoire d'écotoxicologie (LECO) / IRSN / FRP-ENV/SERIS-Cadarache ; ²Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille / Marseille ; ³Institut des biomolécules Max Mousseron / Université de Montpellier

Background

- ✓ Ubiquitous nature of γ rays \rightarrow need to improve the risk assessment for environmental species
 - But lack of data about chronic exposures (only 36%)¹
 - Need of more sensitive endpoints than individual ones, such as reproduction
 - Need to improve the understanding of molecular mechanisms linked to radiation induced effects²
- ✓ Proteins are key biomolecules of organisms much less studied than DNA where as their damage (oxydation) or modulation can be sensitive markers of irradiation
 - After acute irradiation (>200Gy) it has been demonstrated that different radiosensitivity between species can be explained by a differential proteome protection against oxydation (protein carbonylation)³
 - Carbonylated proteins are eliminated mainly by proteasome (protein complex)⁴

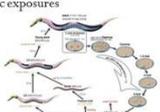
Objective

Assessment of acute vs chronic physiological effects induced by γ irradiation by:

- i) The characterization of the proteome changes
- ii) The better understanding of the role of protein carbonylation induction and degradation

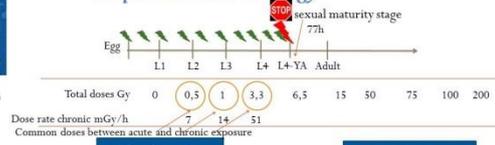
Biological model : *C. elegans*

- ✓ Short lifecycle : 3 days at 20°C ; useful for chronic exposures
- ✓ Genome fully sequenced



- ✓ After gamma irradiation :
 - ✓ Acute: >200Gy Reproduction decline correlated to an increase of carbonylated proteins⁵
 - From 10 to 120Gy: damage in the germline \rightarrow reproduction decrease⁶
 - ✓ Chronic: From 42mGy/h reproduction decrease correlated to: increase of apoptosis, decrease of spermatozoids stock and cellular cycle arrest⁷.

Experimental strategy

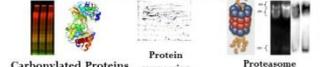


Total doses Gy: 0, 0,5, 1, 3,3, 6,5, 15, 50, 75, 100, 200

Dose rate chronic mGy/h: 7, 14, 51

Common doses between acute and chronic exposure

Molecular markers



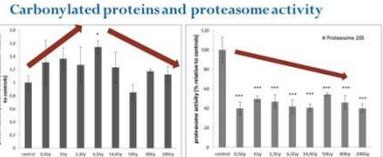
Individual markers



Reproduction

- Brood size : Decrease from 30Gy
- Hatching success : Decrease from 30Gy

Carbonylated proteins and proteasome activity

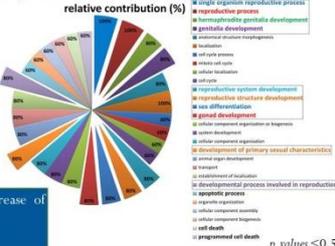


- none dose dependant relationship
- Significant decrease of the 20S proteasome from 0,5 to 200 Gy \rightarrow Other cellular mechanism to remove PC : autophagy ?

Results

Protein expression

- 4 proteins repressed and 2 over-expressed at 0.5 Gy; 2 proteins repressed and 4 over-expressed at 1 Gy and at 3.3 Gy



- Proteins involved in reproduction are over-expressed from 0.5 Gy (rack-1; act-1; act-5; hsp-1 and rps-0)
- Particularly, rack-1 is required for germline development
- Proteins involved in apoptosis are over-expressed from 0.5 Gy (act-5; hsp-1 and rps-0)

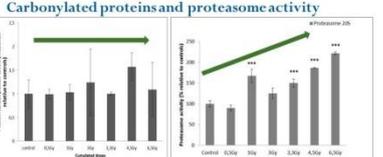
\rightarrow Proteasome activity decrease is linked to an increase of apoptosis by accumulating pro-apoptotic proteins⁸
 \rightarrow Damaged embryo removal

p. values <0.5

Reproduction

- Brood size : Decrease from 3,3Gy
- Hatching success : no impact

Carbonylated proteins and proteasome activity



- No impact on carbonylated proteins level from 0,5 to 6,5 Gy
- Significant increase of the 20S from 1 Gy \rightarrow Proteasome is involved in the removal of PC after chronic irradiation

Protein expression

- Only one protein is differentially expressed at 1 Gy : Act-4 involved in the reproduction of *C.elegans*, but not only (cytoskeletal major protein)
- Act-4 is over-expressed after acute irradiation (0.5 and 1Gy) but repressed after chronic irradiation (1Gy) \rightarrow same target but different modulation of this protein between acute vs chronic irradiation

\rightarrow Increase of proteasome activity could be involved in a efficient turnover of proteins dedicated to DNA repair, or signalisation of DNA damage, allowing DNA damage signalisation during gametogenesis, as a checkpoint control, in order to eliminate damaged germcells before embryogenesis.

Conclusions and perspectives

Hatching success is impacted after acute but not after chronic irradiation. At the molecular level, the carbonylated protein level response after acute exposure varies slightly and is not proportional to the dose, whereas the carbonylated protein level was not significantly modulated after chronic irradiation compared to controls. In addition, whereas the proteasome activity is inhibited by acute irradiation from 0.5 Gy, it is activated after chronic irradiation from 1 Gy, then probably mitigating cytotoxic effects by carbonylated protein accumulation prevention. These results highlight that molecular mechanisms are totally different between the two irradiation modes and then emphasize the limitation of data extrapolation from acute in order to predict the effects of chronic exposure. Moreover, proteomic analysis revealed that after acute irradiation, proteins involved in the reproduction and particularly in the germline development are over-expressed from 0.5 Gy, as well as the proteins involved in apoptosis. These results, taking together suggest that after acute irradiation, the proteasome activity decrease could be linked to an increase of apoptosis, resulting in the elimination of damaged embryos. Indeed, proteome modulation is a sensitive and predictive marker of acute irradiation damage on reproduction and especially on egg hatching. This proteomic approach gave promising results, but to extend and refine the low number of targets likely to be differentially modulated after chronic exposure, a label-free proteomic approach is in progress (protein MW <5kDa and > 150kDa; hydrophobic proteins).

References ¹FREDERICA Database ²Pereira, S et al. (2012) *Aquatic Toxicology* ³Knisko, A., Radman, M. (2013) *Cold Spring Harbor perspectives in biology* ⁴Davies, K. J. A et al. (2001) *Biochimie* ⁵Knisko, A., M. Leve, et al. (2012). Proceedings of the National Academy of Sciences ⁶Bailey, A. and A. Gartner (2011). Molecular Determinants of Radiation Response. Springer ⁷Bautes-Goussens, A., et al. (2014). *Journal of Environmental Radioactivity* ⁸Lopes, U. G et al., (1997) *Journal of Biological Chemistry*

Article Scientifique

- Cécile Dubois, Catherine Lecomte, Sébastien Pyr dit Ruys, Mira Kuzmic, Claire Della-Vedova, Nicolas Dubourg, Simon Galas, Sandrine Frelon. **Protein oxidation and degradation are differentially modulated after chronic and acute γ -radiation exposure of *C. elegans***

Soumis dans la revue « Free radical biology and medicine »

- Publication prévue : Partie protéomique, analyse DIGE et Label free

Draft ARTICLE (Soumis dans FRBM)

Protein oxidation and degradation are differentially modulated after chronic and acute γ -radiation exposure of *C. elegans*

Cécile Dubois¹, Catherine Lecomte¹, Sébastien Pyr dit Ruys¹, Mira Kuzmic¹, Claire Della-Vedova², Nicolas Dubourg¹, Simon Galas³, Sandrine Frelon¹.

¹IRSN/PSE-ENV/SRTE - Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides - BP3 - 13115 St Paul lez Durance Cedex – France. ²IRSN/PSE-ENV/SRTE – LRTA - BP3 - 13115 St Paul lez Durance Cedex – France. ³Université de Montpellier- 15 avenue Charles Flahault BP 14491 34093 Montpellier cedex 5

† Corresponding author: Frelon S.

tel: (+33).04.42.19.94.71 / fax: (+33).04.42.19.91.51 / email: sandrine.frelon@irsn.fr

Authors contribution

Dubois Cécile participated to experimental conception and design, acquisition of data, as well as, analysis, interpretation of data and article drafting.

Lecomte Catherine contributed to set up the global experimental design, the breeding and maintenance of nematodes with her expertise in *C. elegans* and article drafting.

Pyr dit Ruys Sébastien contributed with his expertise in carbonylated protein assay to provide technical advices, as well as, article drafting.

Kuzmic Mira participated to experimental conception and article drafting.

Della-Vedova Claire performed statistical analysis, figures, captions and contributed to article drafting.

Dubourg Nicolas performed MCNP calculations and dose measurements with RPL dosimeters.

Galas Simon with his expertise in *C. elegans* participated to set up the global experimental design and article drafting.

Frelon Sandrine participated to experimental conception and design inside the full project, as well as, analysis, interpretation of data and article drafting.

Abstract

Environmental species are chronically exposed to oxidative stress derived from several sources including ionizing radiation, a natural and ubiquitous phenomenon which can be enhanced by human

activities. The induced toxicity mechanisms still remain unclear and seem depending on the mode of exposure, *i.e.* acute and chronic. To better understand these phenomena, it is necessary to conduct studies both at the subcellular and individual levels. Proteins, functional molecules in organisms, are the targets of oxidative damage (especially *via* their carbonylation (PC)) and are likely to be relevant biomarkers. Then the aim of this work was to better understand the role of PC production and proteolytic activity on the acute vs chronic effects induced by gamma irradiation, particularly on reproduction endpoint.

Caenorhabditis elegans were subjected to both chronic and acute γ rays exposure at five cumulated doses, *i.e.* 0, 0.5, 1, 3.3 and 6.5 Gy. After irradiation, reproduction was monitored by measuring the number of offspring per individual and the hatching success. Carbonylated protein level was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis after protein extraction and carbonyl derivatization. Proteasome activity was assayed using native gel electrophoresis following by in-gel proteasome activity assay. Results showed that hatching success is impacted after acute but not after chronic irradiation. At the molecular level, the carbonylated protein level response after acute exposure varies slightly and is not proportional to the dose, whereas the carbonylated protein level was not significantly modulated after chronic exposure compared to controls. In addition, whereas the 20S proteasome activity is inhibited by acute irradiation from 0.5 Gy, it is activated after chronic irradiation from 1 Gy, then probably mitigating cytotoxic effects by carbonylated protein accumulation prevention. These results showed that proteasome activity is a more sensitive and predictive marker of acute and chronic exposure to gamma radiation effects than reproduction parameter.

Altogether this study highlights the limitation of data extrapolation obtained for acute exposure in order to predict the effects of chronic exposure. Moreover, this study provides the preliminary clues to understand the role of protein oxidation and proteolytic activity in the radiation-induced molecular mechanisms after chronic *versus* acute irradiation in *C. elegans*.

Keywords

Gamma radiation; Acute vs Chronic; Reproduction; Carbonylation; Proteasome; *Caenorhabditis elegans*.

Abbreviations

Nuclear power plants (NPP); Ubiquitin Proteasome System (UPS); Nematode Growth Medium (NGM); Radio Photo Luminescent dosimeters (RPL); Mini Irradiator for Radio-Ecology (MIRE); Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations Dose-effet en Laboratoire (MICADO-Lab) ; Dose inducing 50% of Effect compared to controls (DE50) ; Igepal CA-630 (NP-40) ; sodium dodecyl sulfate (SDS) ; 1,4-dithiothreitol (DTT) ; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ; trichloroacetic acid (TCA) ; urea-thiourea CHAPS containing buffer (UTC following numbers are related to individual component molarity or detergent percentage) ; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ; ImageQuant Total Lab software (IQTL) ; Succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine- amino-methyl-coumarin (suc-LLVY-AMC) ; carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal (MG132) ; Bovine serum albumin (BSA), Horse-radish-peroxidase (HRP), Enhanced Chemiluminescence (ECL).

Introduction

Emission of ionizing radiation in the environment is a natural and ubiquitous phenomenon which can be enhanced by human activities (nuclear power plants (NPP), accidental release, nuclear medicine and military applications). Environmental species are then subjected to chronic exposures and non-human biota protection from ionizing radiation has become a major public, regulatory and scientific concern over the past decades (1, 2). Despite this awareness, the environmental risk assessment of chronic exposure is hampered by a lack of knowledge (only 36% of studies on non-human species concern chronic irradiation (FREDERICA Database)), and extrapolation of data from acute to chronic exposure is not always relevant. In fact, it has been previously demonstrated that effects are different between acute and chronic exposure. For example, a study has shown that for a same cumulated dose, contrary to acute irradiation, chronic irradiation induces acceleration of *Danio rerio* egg hatching(3) and induces an hypomethylation of the mouse genome (4). However, to date, underlying molecular mechanisms governing the differences in the observed effects are poorly understood (3, 5, 6). For this reason, there is a real need to have a deeper view on the differential molecular mechanisms involved in the responses to acute and chronic irradiation.

While DNA damage has been studied for decades, proteins have been much less studied after gamma irradiation. However, proteins, like DNA, lipids and sugars, are also impacted by ionizing radiation. In particular, their oxidation (for example their carbonylation) can become critical for the cell. In addition, proteome protection pathways, particularly those acting against oxidation, can be linked to the differential radiosensitivity of species (7). One of the most studied oxidative damage to proteins is carbonylation (8). Protein carbonylation is an irreversible post-translational modification, and is also an aging and oxidative stress biomarker (9). In addition, it has been shown that after huge doses of gamma rays, an increase of protein carbonylation is correlated i) to the death of *E.coli* (10) and ii) to a decrease of hatching success of *C. elegans* (11). However, to date, there is only data concerning protein carbonylation after huge doses of acute irradiation (up to 200 Gy).

Proteins are continuously degraded by proteolytic systems in order to maintain physiological cellular process. Fast removal of proteins is particularly important for damaged proteins. The two main intracellular proteolytic pathways are the ubiquitin-proteasome system and autophagy. Evidences accumulated over the past decades suggest that the proteasomal system is mostly responsible for degrading carbonylated proteins (12, 13).

At the heart of the proteasomal system is the 20S proteasome, an hollow cylindrical protein complex containing the proteolytic active sites in its central cavity. This complex has multiple catalytic activities: a trypsin-like activity, a caspase-like activity and a chymotrypsin-like activity that hydrolyze peptide bonds on the carboxyl side of basic, acidic and hydrophobic amino acids, respectively (14).

The 20S proteasome is considered to be physiologically latent, *i.e.* unable to degrade normal, tightly folded proteins, because its entrance pores are normally closed. Its activity is modulated by multiple regulators that favor proteolysis by recruiting specific protein substrates and by opening upon binding the entrance pores, thereby allowing substrates to access to the proteolytic active site and to be degraded (15, 16). Therefore, depending on the regulators bound to the 20S core, several forms of the proteasome coexists in cells, among which the most abundant are the so-called 30S, 26S and 20S proteasomes. The 26S/30S proteasomes consist of the 20S core complex bound to either one or two 19S regulatory complex(es), respectively (15). These forms of the proteasome degrade mainly polyubiquitylated proteins in an ATP-dependent manner (12).

Despite its latent character, the 20S proteasome can degrade oxidized proteins *in vitro*, independently of ubiquitin/ATP (12), most likely because they are unfolded and/or aggregated. In fact, the 20S proteasome has been shown to be able to recognize and interact with abnormally

exposed hydrophobic amino acids in oxidatively damaged and unfolded proteins. This recognition/interaction induces conformational changes in the 20S subunit structure and promotes channel opening followed by proteolysis (12, 17).

Due to its protein nature, the proteasome itself is a target of ionizing radiation, but studies have only focused on proteasome sensitivity after acute irradiation (18, 19). Regarding sensitivity of proteasome to ionizing radiation, it has been shown that global proteasomal activity is impacted from 2 Gy of acute gamma irradiation in a non-dose-dependent manner. Especially, the S6 ATPase subunit, a 19S subunit responsible of substrate translocation into the catalytic 20S core, is a target of ionizing radiation, and its modification induces a 60% decrease of the chymotrypsin-like activity (19). It is also well established in yeast that under oxidative stress the 26S proteasome tends to reversibly dissociate into free 20S subunit and 19S regulators, a process that might help to rapidly degrade the newly oxidized proteins (20).

The free living nematode *Caenorhabditis elegans* (21) is a relevant biological invertebrate model for mechanistic studies, as its genome is fully sequenced (22). In addition, *C. elegans* has been used for many years to study acute radiation effects and their consequences on germline development and hatching (23-25), results showing that its hatching success is impacted above 30 Gy. In addition, its short life-cycle and high fecundity, which make this organism easy to breed under laboratory conditions (22, 26), are useful for studying the effects of chronic exposure to gamma irradiation. Indeed, more recently, one study used *C. elegans* to investigate the effects of chronic exposure to gamma irradiation on reproduction, and showed that the number of progeny per individual is lowered from 4.2 Gy (cumulated dose) without impacting hatching success (27). However, all studies have mainly focused on the effects of ionizing radiation on physiological endpoints and DNA damage. These studies have shown that genotoxic damage could be linked to reproduction decline after acute and chronic irradiation (24, 25, 28). As proteins are involved in key biological processes, including DNA repair, epigenetic mechanisms and apoptosis, it is relevant to assess their damage and degradation after both acute and chronic exposure in order to better understand the toxicity mechanisms and the response to ionizing radiations.

This study was undertaken to initiate the assessment of the molecular mechanisms involved in the acute vs chronic responses to gamma irradiation by studying i) global proteins damage (carbonylation), ii) protein degradation by proteasomes and iii) the consequences on individual parameters such as reproduction, which is an ecologically relevant parameter.

First, the basal level of carbonylated proteins over *C. elegans* life cycle was characterized. Then, kinetics of carbonylated protein production was investigated at two different doses of acute irradiation in order to determine the optimal time for protein carbonylation measurement. Finally, the global level of carbonylated proteins and their degradation by proteasome were characterized and compared after both acute and chronic irradiation. In parallel, individual parameters such as reproduction (*i.e.* number of progeny per individual and hatching success) were monitored after acute and chronic irradiation.

Material and methods

Strain and maintenance conditions

The wild-type N2 strain of *C. elegans* provided by CGC (*Caenorhabditis* Genetic Center) was used in this study. Populations were maintained at 19°C and 80% of humidity on 9cm petri dishes poured with NGM (Nematode Growth Medium) and seeded with *Escherichia Coli* OP50 as food source.

E. coli OP50 were grown in L-Browth medium at 37°C overnight. Petri dishes were seeded with 1mL of saturated culture of bacteria and UV killed (Bio-Link Crosslinker, $\lambda = 254 \text{ nm}$; intensity = 200 mWm^{-2}) for 20 minutes to avoid food heterogeneity between dishes.

Age synchronization of *C. elegans*

Age synchronization for irradiation- 100 gravid worms were randomly selected from the stock population and placed on 9 cm petri dishes. 96 h later, eggs were separated from adult worms by a bleaching procedure (29), and collected embryos were allowed to growth in a control incubator for 96 h. The gravid worms were separated from eggs already laid by a sucrose gradient (3.5 – 7 %), and then re-synchronized by a bleaching procedure in order to collect the eggs *in utero* synchronized over 3 h.

*Age synchronization for studying the basal level of carbonylated protein over *C. elegans* life cycle*- In order to measure the basal level of carbonylated proteins on *C. elegans*, 1000 synchronized embryos were allowed to growth in a control incubator (19°C and 80% humidity). Worms were then collected at different times post-synchronization (48 h, 52 h and 67 h) corresponding respectively to the L3, L4 and L4-YA stages and snap frozen.

Irradiation

Irradiations were performed in control incubators (19 °C and 80 % humidity), data loggers were placed in the incubator in order to measure humidity and temperature during irradiation. Nematode plates were placed perpendicularly to the cesium-137 source to obtain an homogeneous dose rate at the surface of the plate. Radio Photo Luminescent dosimeters (RPL, GD-301 type, Chiyoda Technol Corporation, Japan) were placed on each experimental unit in order to measure the delivered cumulated dose. At the end of each irradiation, worms were collected, rinsed with M9 medium (5 g.L⁻¹ NaCl, 25 mM KPO₄ buffer and 1 mM MgSO₄) to ensure bacteria removal, centrifuged and the pellets were snap frozen.

Acute - For acute irradiation, 3000 age-synchronized embryos were transferred to fresh 6 cm plates and allowed to reach L4-YA stage in a control incubator. Nematodes were then irradiated with a cesium-137 source (200 TBq) using the GSR-D1 apparatus from RadExpe platform (Curie Institute, France). L4-YA *C. elegans* were irradiated at two different dose rates (1 Gy.min⁻¹ and 15 Gy.min⁻¹ depending on the sample position, to keep the irradiation time equivalent) during different times of irradiation in order to test ten cumulated doses (excluding control): 0.5, 1, 2.5, 3.3, 6.5, 14.4, 50, 75, 80 and 200 Gy.

Chronic - For chronic irradiation, nematodes were exposed to cesium-137 source using the platforms MIRE (Mini Irradiator for Radio-Ecology) (1.6 GBq) and MICADO-Lab (Moyen d'Irradiation Chronique pour l'Acquisition de relations Dose-effet en Laboratoire) (370 GBq) (Cadarache, France), from embryo stage to L4-YA adult stage to cover the complete lifecycle (65 h). Six dose rates (excluding controls): 7, 14, 45, 50, 75 and 100 mGy.h⁻¹ corresponding to six cumulated doses (0.5, 1, 3, 3.3, 4.5, 6.5 Gy) were tested. Chronic irradiations at 7, 14 and 50 mGy.h⁻¹ were performed using MIRE facility, whereas 45, 75 and 100 mGy.h⁻¹ were reached by using MICADO-lab facility.

Reproduction measurements

Reproduction was observed daily until the end of spawning (8 days). To monitor brood size, 20 worms per condition were daily transferred into 20 individual petri dishes. Petri dishes with eggs

were placed at 19°C during 15h to allow hatchability. The hatched progeny and the unhatched eggs were counted. This method allows measuring number of progeny per individual and hatching success.

Protein extraction and protein carbonyl content measurement

Kinetics of carbonylated protein production were assessed with data obtained at 2.5 Gy (1 Gy.min⁻¹) and at 75 Gy (15 Gy.min⁻¹) with worm sampling from 1 hour to 6 hours post-irradiation. Only one control has been carried out (time = 1h30) because all nematodes were within the same life stage and thus the same basal level of carbonylated proteins.

After irradiation, 1000 *C. elegans* per replicate were subjected to protein extraction. 100 µl of 0.5-mm diameter zirconium beads and an equal amount of lysis buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1.0%(v/v) Igepal CA-630 (NP-40), 1%(v/v) TritonX-100, 0.5% (w/v) sodiumdeoxycholate, 0.1%(w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 2%(v/v) glycerol, 2 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 1 mg.ml⁻¹ leupeptin, 1 mg.ml⁻¹ aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mM ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)) were added on top of worm pellets and incubated for 15 min on ice. *C. elegans* were then homogenized by three 6800-rpm cycles in the Precellys grinder system (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux). After 1 h incubation on ice, lysates were centrifuged (13500 g) at 4°C for 15 min. Supernatant was sampled, protein concentration was determined using the BCA kit (ThermoScientific) using BSA as a standard, according to the manufacturer's instructions and the remaining volume quickfrozen with liquid nitrogen.

Protein carbonylation levels were determined as described before (30). Briefly, 15 µg of proteins were labeled by the addition the carbonyl labelling dye (Cy5™-Hz MW569.61g/mol (FP-IO2490, Interchim) for 20 min at 25°C in the dark at the final concentration of 0.25 mM. Samples were then precipitated on ice for 20 min by the addition of 10 % TCA (v/v). After washing steps to remove excessive dye, pellets were resuspended in UTC9231 (9 M urea, 2 M thiourea, 3% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) ASB14, 20 mM Tris, pH 9.5) under stirring (1600 rpm) at 30°C in the dark for two hours. 1 µL of 0.1 mM Cy2™-NHS dye (FP- LV2330, Interchim) was added to the samples after pH adjustment to 8.6, and incubated on ice during 30 min. After stopping the reaction by adding 1 µL of 10 mM lysine, samples were subjected to 1D-SDS PAGE (Mini-PROTEAN TGX pre-cast gels(4–15%gradient, 15wells(Biorad)), at 100 V during 15 min and 150 V until loss of the migration front. Gels were then scanned in fluorescence on a TYPHOON FLA 9500 imager (GE Healthcare). Images were analyzed according to the manufacturer's instructions with Image Quant Total Lab (IQTL, GE Healthcare) software. Quantification was performed by on gel spotting of Cy5™-Hz dye in order to get a calibration curve.

Measurement of proteasome activity and expression level

Protein extraction- After irradiation, 3000 *C. elegans* were suspended in 150 µL of proteasome activity lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2% IGEPAL CA-630, 1mg.ml⁻¹ aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, pH 8) and homogenized during 4 min with 2000 rot.min⁻¹ using Potter-Elvehjem (Eurostar digital ika labortechnik) at 4 °C. Lysates were then centrifuged (13500 g) for 15 min at 4 °C. Protein concentration was determined by method of Bradford using BSA as a standard.

Peptidase activity assay- In sample, chymotrypsin-Like activity was assayed in 384 well plate, by following the hydrolysis kinetics of the Suc-LLVY-AMC peptide (Sigma Aldrich), for 30 min at 37°C, in the presence or not of MG132 (20 µM, Sigma Aldrich). Proteasome activity was determined as the

difference between the activity of the untreated extracts and the residual activity remaining in the presence of MG132. Fluorescence was measured using FLx800™ fluorescence spectrophotometer (Biotek Laboratories).

In gel activity measurement and western blot analysis- Native gel electrophoresis of proteasome complexes was performed with a method adapted from Myeku *et al* (31). 40 µg of proteins were subjected to native PAGE electrophoresis at 4 °C at 100 V during 2 h and at 150 V during 2h30 on a 3.5%-8% gradient gel. Chymotrypsin-like activity was assayed following gel incubation in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and 100 µM proteasome substrate (Suc-LLVY-AMC Sigma Aldrich) for 30 min at 37 °C. Proteasome bands were visualized under UV (Fusion FX Vilber). Activity quantification of each detected proteasome complex relative to control was done by image analysis with Image Quant Total Lab (IQTL, GE Healthcare) software. Each native gel experiment was repeated at least twice.

Then proteasome expression level was assayed by western blot analysis. Protein transfer was done at 40 V overnight at 4 °C on PVDF membrane (0.22 µm Merck Millipore). After blocking with 0.5 % BSA (Bovine serum albumin Sigma-Aldrich), membranes were incubated with a primary antibody in blocking buffer overnight at 4 °C (1:200 dilution in blocking buffer). The anti α 1-7 antibody reacts with subunits of the 20S core particle (BML-PW8195 EnzoLifesciences). After removing the primary antibody and washing steps, membranes were incubated with the secondary antibody (ab6728 rabbit anti-mouse IgG HL (HRP), abcam) in blocking buffer on a rocker at room temperature for 1h (1:100000 dilution in blocking buffer). Membranes were then washed three times with blocking buffer, one time with Tris Buffered Saline Tween 0.1 % (TBST), and the last washing was done with TBS. The blot was then revealed using a chemiluminescent horseradish peroxidase method (Fusion FX Vilber) with the ECL reagent according to manufacturer's instructions (Immobilon Pierce). Only the 20S subunit expression level could have been quantified by image analysis with Image Quant Total Lab (IQTL, GE Healthcare) software. Each blot was repeated at least twice. Internal standard was used for each native gel-blot in order to normalize the signal between the different gels and blots.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 3.2.4(32), and RStudio environment version 0.99.893 (33).

For reproduction endpoints, results are expressed as a mean of 20 individual biological replicates. Modeling of the data was done using a 3 parameters log-logistic model in order to determine the DE50 relative to two effect criteria *i.e.* the total spawning per individual and the hatching success (Dose inducing 50% of Effect compared to controls) (34). For in gel proteasome activity and carbonylated proteins levels, results are expressed as a mean of three biological replicates (n=3 pool of 3000 or 1000 nematodes, respectively) with corresponding standard deviation (SD) otherwise indicated. Normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of data variance (Levene's test) were tested before all statistical analysis. When these two assumptions were not found, a logarithmic transformation was applied. The effects of the considered treatments were assessed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc pairwise comparison (Dunnet-test and Tukey-test). The significance level (alpha risk) was fixed to 0.05.

Results

Chronic irradiation

Reproduction parameters

Data in Table 1 show that the number of progeny per individual is impacted from 3.3 Gy (50 mGy.h⁻¹) in a dose-dependent manner until 6.5 Gy (100 mGy.h⁻¹). Results also showed that there is no impact on the percentage of hatching after chronic irradiation from 2.5 Gy to 6.5 Gy, compared to unexposed worms.

Conditions of irradiation	control	3Gy	3.3Gy	4.5Gy	6.5Gy
Number of progeny per individual	204±58	175±47	142±50*	161±34*	149±49*
% of hatching	100%±10	99%±1	99%±5	98%±5	98%±1

Table 1: Number of progeny per individual and percentage of hatching of *C. elegans* after chronic irradiation from egg stage to L4-YA stage (65 h). n= 20. Data are expressed as means ± SD (*P<0.05, Dunnet test).

Protein carbonylation production and degradation by proteasome

Protein carbonylation level was monitored after chronic irradiation from 0.5 to 6.5 Gy (7 to 100 mGy.h⁻¹). No significant difference was observed between conditions (data not shown). Proteasome activity was also measured. Results on the global proteasome activity showed 75% (±3) inhibition of the chymotrypsin like activity in worms treated with 20 µM of MG132, attesting of the substrate specificity. The results also showed no significant impact of chronic irradiation from 3 to 6.5Gy on the chymotrypsin-like activity of the global proteasome, compared to untreated worms (data not shown). But interestingly, as presented in Figure 61 A, in gel activity of each subunit (measured as shown in Fig. 1C, left panel) allowed to detect a significant increase of the 30S proteasome activity at 1 Gy (14 mGy.h⁻¹; +110%) and at 6.5 Gy (100 mGy.h⁻¹; +37%) (respective *p.values* =1.2.10⁻⁷, 0.008), and of the 26S proteasome activity at 1 Gy (+34%) and 3.3 Gy (+22%) (respective *p.values* =0.001, 0.1) compared to controls. On another hand a significant decrease of the 26S proteasome activity is found at 0.5 Gy (-25%), 4.5 Gy (-56%) and 6.5 Gy (-48%) (with respective *p.values*= 0.01, 3.10⁻⁶, 2.10⁻⁵). Interestingly, the activity of the 20S proteasome increases between 20 and 55% compared to unexposed worms in a dose-dependent manner from 1 Gy (respective *p.values*=1.10⁻⁵, 5.10⁻⁴, 0.05, 2.10⁻⁷, 5.10⁻⁹). Western blot analysis (Figure 61 B) showed that the expression level of the 20S proteasome, as evaluated by immunoblotting of its subunits, increased at 1, 3.3, 4.5 and 6.5 Gy (respective *p.values*=0.001, 0.03, 5.10⁻⁴, 0.03). 20S subunit level increased also at 3 Gy but not significantly (*p.value* =0.1).

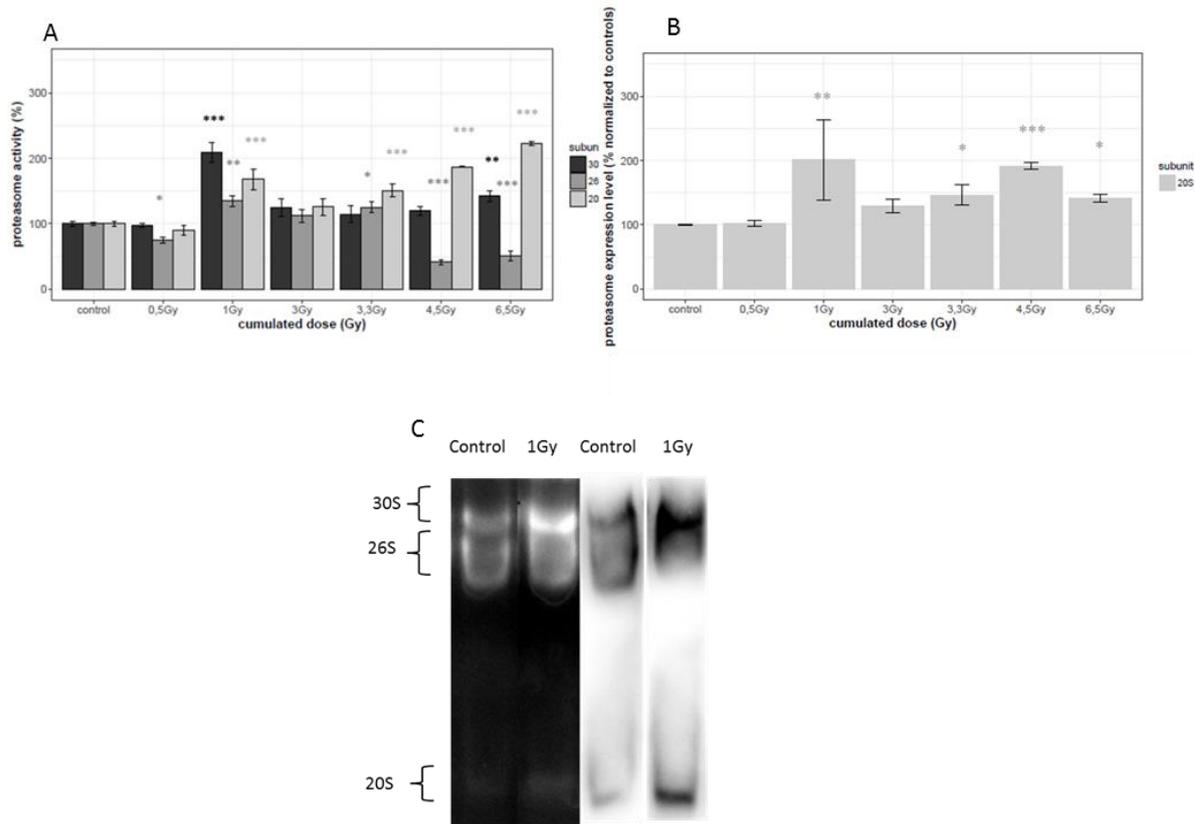


Figure 61 : A/ Dose response curve of proteasome activity after chronic irradiation from 0.5 to 6.5 Gy. Native gel electrophoresis followed by quantification using IQTL software. n= 3 (pool of 3000 nematodes). Data are expressed as means of proteasome activity (% relative to unexposed worms) \pm SEM for the 30S (dark grey), 26S (middle grey) and 20S (light grey) proteasomes as (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001, Dunnet Test). B/ Dose response curve of the 20S subunit expression level from 0.5 to 6.5 Gy. Western blot analysis followed by quantification using IQTL software. n=3 (pool of 3000 nematodes). Data are expressed as means of proteasome expression level normalized to unexposed worms \pm SEM (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001, Dunnet Test).C/ Native gel electrophoresis, followed by in gel proteasome activity assay of the 30S 26S and 20S proteasomes (left panel) and western blot analysis of the 30S 26S and 20S proteasomes (right panel).

Acute irradiation

Reproduction parameters

A significant decrease of the number of progeny per individual, compared to control, was observed from and above 30 Gy, associated with a decreased rate of hatchability and in a dose-dependent manner, until 200 Gy (Table 2). The DE50 number of progeny per individual and the DE50 rate of hatching were determined *via* a log-logistic modelling curve to be 79.8 Gy (CI95= [47.4; 112.1]) and 77.4 Gy (IC95 = [70.4; 84.4]), respectively.

Conditions of irradiation	control	2.5Gy	6.5Gy	14.4Gy	50Gy	80Gy	200Gy
Number of progeny per individual	173 \pm 15	190 \pm 54	143 \pm 47	168 \pm 29	113 \pm 28*	79 \pm 46**	22 \pm 5***
% of hatching	98 \pm 2	96 \pm 3	96 \pm 5	95 \pm 4	81 \pm 7*	26 \pm 19**	0 \pm 0***

Table 2: Number of progeny per individual and percentage of hatching of *C. elegans* after acute irradiation at the L4-YA stage. n= 20. Data are expressed as means \pm SD (* P <0.05; **<0.01; *** P <0.001, Dunnet Test).

Set up of the experimental design for carbonylated protein measurement

Basal level of carbonylated proteins in *C. elegans* over its life cycle – Testing of different life stages (L3, L4 and L4-YA stages) showed that carbonylated proteins level is around 1.9 ng of carbonyls/mg of proteins (\pm 0.09) and varies moderately during *C. elegans* life cycle (data not shown). The only

significant difference was between the L3 (48h post synchronization) and the L4-YA (67h post synchronization) stages (*p. value* =0.03), showing that the L3 stage has the highest basal level of carbonylated proteins. In conclusion, results showed a low but gradual decrease of the basal level of carbonylated proteins from the L3 to the L4-YA adult stages. Since the latter stage showed also the lowest variability, all the subsequent experiments were performed on this life stage.

Kinetics of carbonylated protein production after acute irradiation -

A significant induction of carbonylated proteins level compared to controls was detected at 3hours post irradiation at 2.5 Gy (*p. value* = 0.03) (Table 3). A decrease of carbonylated protein level seems to occur at 6hrs post-irradiation but the high standard deviation at 3hrs post irradiation prevents statistical validation of this conclusion. At 75 Gy a significant increase is observed at 2hrs 40, 4hrs and 5hrs post irradiation compared to controls (respective *p. values* = 4.10^{-5} ; 3.10^{-5} ; 1.10^{-5}). The maximum accumulation of carbonylated protein seems to occur between 2h40 and 5hrs post irradiation. The optimal time for protein carbonylation analysis was therefore chosen at 3hrs post irradiation since protein carbonylation was at its maximum level at this time for the two very different doses and dose rates tested.

Time post irradiation (h)	Control	1h	1h30	2h	2h40	3h	4h	5h	6h
2.5Gy	1 ±0.1	1.2±0.2	0.9±0.1	1.6±0.4	NA	2.0±0.7*	NA	1.9±0.7	1.3±0.2
75Gy	1 ±0.2	1.2±0.2	0.8±0.2	NA	2.0±0.2***	NA	1.9±0.1***	2.1±0.3***	NA

Table 3 : Kinetics of carbonylated proteins production on *C. elegans* after acute irradiation at 2.5 Gy (1 Gy.min⁻¹) and at 75Gy (15 Gy.min⁻¹). Worms used in this assay were 3hours synchronized, irradiated at 2.5 and 75 Gy, and collected at different times post irradiation as indicated. n= 3 (pool of 1000 nematodes). Data are expressed as induction (ratio of carbonylated protein level between exposed and controls) of carbonylated proteins compared to controls as means ± SD (*P<0.05; **P<0.01; *P<0.001, Dunnet test). NA corresponds to No Available Data.**

Protein carbonylation production and degradation by proteasome

The results in Figure 62A show a maximal increase of protein carbonylation level at 3h post irradiation for the dose of 6.5 Gy compared to controls (significant increase *p. value* =0.01). These results demonstrate that the carbonylated protein level response varies slightly and is not proportional to the dose. The activities of the main forms of the proteasome were assessed after native electrophoresis, as done previously after chronic irradiation. Results in Figure 62B show that the 30S proteasome activity (in % of activity relative to controls) is significantly decreased at 0.5 and 200 Gy compared to unexposed worms. The 26S proteasome activity (in % of activity relative to controls) is significantly decreased from 50 Gy to 200 Gy compared to unexposed worms. Finally, the 20S proteasome activity (in % of activity relative to controls) is significantly lowered from 0.5 Gy in a non-dose-dependent manner until 200 Gy compared to unexposed worms. Western blot analysis revealed no significant impact of acute irradiation on the 20S proteasome expression levels (data not shown). In conclusion, there is no proven link between proteasome activity decline and carbonylated proteins increase at 6.5 Gy compared to controls. Furthermore, the lower level of carbonylated proteins at 14.4 and 50 Gy cannot be obviously explained by proteasome degradation activity.

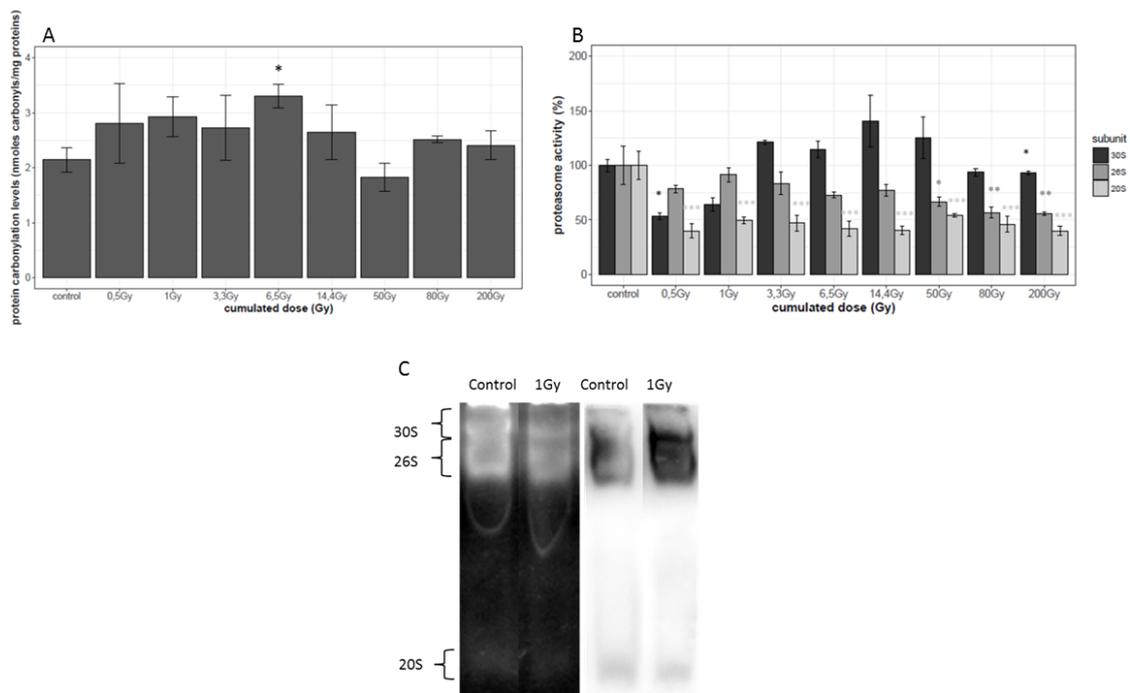


Figure 62 : A/ Dose response curve of protein carbonylation induction after acute irradiation from 0.5 to 200 Gy. Worms used in this assay were 3hours synchronized, irradiated from 0.5 to 200 Gy ($1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ and $15 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$), and collected at 3h post irradiation. $n = 3$ (pool of 1000 nematodes). Data are expressed as means of protein carbonylation level (induction relative to unexposed worms) \pm SEM (* $P < 0.05$ Dunnett and Tukey test). B/ Dose response curve of proteasome activity from 0.5 to 200Gy. Native gel electrophoresis followed by quantification using IQTL software. $n = 3$ (pool of 3000 nematodes). Data are expressed as means of proteasome activity (% relative to unexposed worms) \pm SEM for the 30S (dark grey), 26S (middle grey) and 20S (light grey) proteasomes as (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, Dunnett Test). C/ Native gel electrophoresis followed by in gel proteasome activity assay of the 30S 26S and 20S proteasomes (left panel) and western blot analysis of the 30S 26S and 20S proteasomes (right panel).

Discussion

In this study we assessed the mechanisms involved in the acute vs chronic responses to gamma irradiation by studying protein oxidation, its degradation by proteasome and their link to the observed effects on *C. elegans* reproduction parameters.

Reproduction

Hatching success is not impacted after chronic exposure to gamma irradiation from 0.5 to 6.5 Gy (7 to $100 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$). This is relevant with a recent study carried out on one generation of *C. elegans*, exposed from 2.5 to 22 Gy (35). However the number of progeny per individual decreased from 3.3 Gy ($50 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$), suggesting that gametogenesis is impacted. These results also corroborate with previous studies showing a decrease of progeny number from 4 Gy ($64.5 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$) at the first generation, worsened with successive irradiated generations *i.e.* from 2.5 Gy ($42 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$) at the third generation. In addition, this study revealed that, for the third generation, an increase of apoptosis, a decrease of sperm cells and of the number of mitotic cells could explain this phenomenon (27). Other studies have shown reprotoxicity of chronic gamma irradiation on others organisms than *C. elegans*. These studies revealed a decrease of progeny number per individual and a decrease of hatching success on *Ophryotrocha diadema*, *Neanthes arenaceodentata*, *Daphnia magna* and *Eisenia fetida* exposed to $0.19 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$, $13.7 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$, $31 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$ and $43 \text{ mGy} \cdot \text{h}^{-1}$ respectively (36-38). These results suggest that in the case of chronic exposures, there were more an accumulation of DNA damage in

non-dividing cells, and then this damage became apparent after fertilization when the cells started to divide (36). Nevertheless, these organisms have different periods of gametogenesis and different modes of reproduction than *C. elegans*. In the present study, the effect on the number of progeny per individual from 50 mGy.h⁻¹ could be explained by an increased apoptosis phenomenon for the damaged gametes, leading to their decrease and therefore to a decrease in the number of progeny per individual (39).

Our results after acute exposure are consistent with previous studies on *C. elegans* which showed that the number of progeny per individual is impacted from 30 Gy and a decrease of hatching success is observed from 40 Gy of acute irradiation (23, 25). These findings suggest that unlike chronic irradiation, both gametogenesis and embryogenesis may be impacted after acute irradiation. Other studies carried out using cesium-137 source on invertebrates, showed that the hatching success of *Neanthes arenaceodentata* is impacted from 0.5 Gy, and that the DE50_{rate of hatching} for *folsomia candida* and *Eisenia fetida* was 21.9 Gy and 11.1 Gy respectively (40-42). This suggests that *C. elegans* is less sensitive to ionizing radiation than these other invertebrates. These studies suggested that reduction in hatching success may result from lethal mutations in the developing gametes, which affects the survival of embryos at early life stage (40). Here we conclude that sperm cells or oocyte killing will affect principally the number of progeny per individual, but not the hatching success. A possible explanation for the reduced hatching success after acute irradiation is the induction of deleterious mutations during gametogenesis, which are not repaired and transmitted to developing embryos(23).

On another hand, genotoxic effects may not be the only candidates to explain reprotoxic effects induced by gamma irradiation. As described before by Krisko and collaborators in 2012, an increase of protein carbonylation level after acute doses of gamma irradiation (up to 200 Gy) seems to be linked to a decrease of hatching success in *C. elegans*(11). The contribution of carbonylated protein in the reproduction decline after chronic and acute irradiation on *C. elegans* was tested in this study.

Basal level of carbonylated proteins

Several studies highlighted that increased protein carbonyl content is a hallmark of cellular and organism aging (43-45). As *C. elegans* has a very rapid life cycle and changes its life stage within a few hours, also involving important metabolic variation during these stage switches (gonad establishment, increased protein biosynthesis and mitochondrial level), the analysis of the basal level of carbonylated proteins in the nematode over a part of its life cycle was necessary in order to observe small carbonylation variations and the lowest variability as possible.

The present study showed evidence that among the different studied stages, the L4-YA adult stage has the lowest basal level of carbonylated proteins. Several processes may explain the observed difference between the L3 and the L4-YA stage. First of all, the L3 stage is marked by the initiation of the prophase I of meiosis, the gonad arms undergone a rapid extension, meaning an increased need for cellular energy (46). The L3 stage is the life stage where mitochondria are the most numerous. Yet, mitochondria are also a stock of reactive oxygen species that could thus oxidized proteins and produce carbonylated proteins (47-49). Conversely, at the end of the L4-YA stage, somatic cellular division stopped and gonads are well established. The low level of carbonylated proteins at the L4-YA stage can therefore be linked to this lower production of reactive oxygen species but also to an increased proteolytic activity in order to remove carbonylated proteins. Further studies will be necessary to investigate the role of the proteasome in the carbonylated proteins level variation

during *C. elegans* lifecycle. However, the L4-YA stage was used in this study because of its low biological variability in terms of protein carbonylation.

Dose response curves of carbonylated proteins and proteasome activity after chronic irradiation

Our study showed that there was no significant difference in the carbonylated protein level after chronic irradiation from 0.5 to 6.5 Gy (7 to 100 mGy.h⁻¹) and an absence of significant global proteasome chymotrypsin-like activity modulation after chronic irradiation from 3 to 6.5 Gy (cumulated doses). In gel proteasome activity showed that chronic irradiation, although it has no clear impact on overall chymotrypsin-like activity of the proteasome, leads to a profound remodeling of the equilibrium between the different forms of the proteasome, especially at the highest cumulated doses. Equivalent to 38%, 55% and 6% of activity for 30S, 26S and 20S at the basal level, respectively, the proteasomal activity distribution after the highest dose of 6.5Gy is 58%, 29% and 13% of activity for 30S, 26S and 20S, respectively. This suggests a compensation of these three proteasome forms in order to maintain a basal level of global proteasome activity.

The activation of the 20S proteasome activity could be due to two phenomena. The first one is the dissociation of the 30S and 26S proteasomes in order to increase the level of the free 20S proteasome (20, 50, 51). As described in a precedent study, stress-induced disassembly of the 30S and 26S proteasomes is used to increase the 20S expression level, allowing cells to clear more effectively the damaged proteins and mitigate the cytotoxic effects of their accumulation (52, 53). The second phenomenon is that the 20S proteasome can bind to alternative protein activators in order to form the active "20S proteasome". To date, three of such 20S activators have been identified in mammalian *i.e.* PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ and PA200 (16, 54, 55), whereas only two of them in *C. elegans i.e.* PA28 γ and PA200 (56). These proteasome activators modulate 20S proteasome structure by opening the α ring channel, thereby facilitating the entry of protein substrates for degradation. In our study, the 20S proteasome expression level seems increasing from 1 Gy chronic irradiation (cumulated dose), supporting the hypothesis by which the 20S proteasome activity increases because of its expression level is enhanced. This increase in 20S expression level could be related to the involvement of the SKN-1 regulatory pathway. Indeed, a study has shown that SKN-1 pathway is known to respond to oxidative stress by upregulating genes that detoxify and defend against free radicals and other reactive molecules (57). SKN-1 holds expression and activity of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and coordinates specific protective responses to perturbations, in protein synthesis or degradation through the UPS (58) (57). Moreover, it has been shown that the ubiquitin-dependent proteasomes are involved in the DNA damage responses pathways (the so-called "DDR pathway"), by allowing the degradation and the renewal of proteins necessary to DNA damage repair(59, 60).

In addition, after chronic irradiation, proteolysis seems to be stimulated in order to remove oxidized proteins. This phenomenon has already been observed in condition of mild oxidative stress where the 20S proteasome was responsible for the degradation of oxidatively damaged histones to promote the turnover of these proteins, indirectly allowing the efficient repair of DNA damage (61). Indeed, histones play critical roles in chromatin remodeling, DNA repair and epigenetic regulation of gene expression(62). After gamma radiations, the process could be the same as reactive oxygen species that can oxidize histones are also produced. Anyway, our results taking

together suggest that the three forms of proteasome activation after chronic irradiation from 1 Gy possibly could be involved in the repair of DSB.

Dose response curves of carbonylated proteins and proteasome activity after acute irradiation.

Results of kinetics of carbonylated proteins after acute irradiation on *C. elegans* indicated that the optimal time for protein carbonylation analysis (resulting of production and degradation of carbonylated proteins) was measured at 3hrs post irradiation at 2.5 and 75 Gy. Furthermore, for the two doses, carbonylated protein induction was very similar despite the dose rate difference. The results of kinetics of carbonylated protein level corroborate with the dose-response curve of carbonylated protein level after acute irradiation, which showed that carbonylated proteins level is not dose-dependent after acute irradiation from 0.5 to 200 Gy. Krisko and collaborators (11) have previously measured the carbonylated protein level after acute irradiation from 200Gy to 6000 Gy on *C. elegans* (respective dose rates of 26 and 38 Gy.min⁻¹). In this study, at 200 Gy, the induction rate compared to controls was 3.3, and then increased to reach a plateau of 4.6 from 900 to 6000 Gy. This drastic increase in the level of carbonylated proteins could be due to a saturation of defense mechanisms against free radicals or proteolysis systems. In our study, we showed that the induction of carbonylated proteins after acute irradiation from 0.5 to 200 Gy was small (1.3 ± 0.3 at 0.5 Gy, 1.1 ± 0.1 at 200 Gy). This difference with Krisko and collaborators may be due to an effective mechanism of carbonylated protein degradation up to 200 Gy, active at dose rates of 1 and 15 Gy.min⁻¹, inactive at dose rates used by Krisko et al, 26 and 38 Gy.min⁻¹. A study has previously shown that the activity of the proteasome is significantly impacted 15 minutes after acute irradiation at 10 Gy (dose rate of 5 Gy.min⁻¹), and that it is then gradually recovered until 24hrs post-irradiation (19). The slight induction of carbonylated proteins from 0.5 to 200 Gy observed in our study could therefore be due to the progressive recovery of proteasome activity at 3 hrs post-irradiation, which seems to be equivalent at 1 and 15 Gy.min⁻¹ as no differential induction of carbonylated proteins occurs between these dose rates.

Previous studies showed that carbonylated proteins are mostly eliminated by proteasome (12, 13, 63). In the present study, we showed that proteasome activity of the three proteasome forms does not seem to be directly linked to the level of carbonylated proteins after acute irradiation. Indeed, we found, that the chymotrypsin-like activity of the 30S proteasome was decreased from 0.5 Gy with a non-dose-dependent relationship, as well as the one of the 26S proteasome for which the chymotrypsin-like activity was significantly decreased from 50 Gy. On the contrary, the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome was significantly decreased from 0.5 Gy until 200 Gy compared to controls. In conclusion, the global proteasome activity (mostly due to the 30S and the 26S activities) was not so modified in our conditions, *i.e.* 3hrs post irradiation, from 0,5 Gy to 14,4 Gy. Our results are different than another study which demonstrated that global proteasome activity of human prostate carcinoma cells was impacted from 2 Gy (5 Gy.min⁻¹) at 3hrs post irradiation in a non-dependent relationship (19). But this difference can be explained by the use of two totally different biological models (in vivo vs in vitro; invertebrate vs superior vertebrate and healthy vs cancer cells). Indeed, several studies have shown that mammalian cancer cells exhibited greater proteolytic activity than healthy cells (64). It is therefore for this reason that proteasome inhibitors are more and more studied for therapeutic purposes, as once proteasome activity is inhibited, the pro-apoptotic protein p53 accumulated and increased apoptosis leading to tumor destruction(65). The link between apoptosis and proteasome activity blocking has been studied in multiple cell types (66-68).The important role of p53 (the ortholog of p53 in *C. elegans* is CEP-1(65))

in the induction of programmed cell death, as well as the fact that p53 is degraded by the ubiquitin proteasome system, made it one of the first proteins considered for possible involvement in proteasome inhibitor-mediated apoptosis(69, 70). Bailly and Gartner have already shown that acute irradiation leads to a dose dependent increase of DNA-Double Strand Breaks (DSB) mediated apoptosis from 7.5 to 120 Gy(24). As our study showed that 26S proteasome activity decreased from 50Gy, we can hypothesize that a decline in the ubiquitin-dependant proteasome activity could block CEP-1 degradation, involving an increase of apoptosis, and that here also the blocking of the proteasome constitutes a cell defense mechanism to precisely avoid the degradation of proteins involved in apoptosis.

The 20S proteasome is known to be less sensitive to UV radiation and low doses of H₂O₂ (concentrations below 2mM were slightly stimulatory) than the 30 and the 26S proteasomes (71-73), indicating that its proteolytic sites are not targets of mild oxidative stress and UV-damage. But our study showed that it seems sensitive to acute gamma radiations. The 20S active core is known to selectively degrade damaged proteins, included oxidized ones (12, 74, 75). Since irradiation does not induce a decrease in the expression level of the 20S proteasome, the hypothesis of an indirect effect of irradiation on the 20S activity could be advanced to explain these results. This indirect effect may correspond to the obstruction of the proteasome. Indeed, the very carbonylated proteins have the specificity to form protein aggregates capable of inhibiting the proteasome activity by obstructing the catalytic core 20S (76) (77, 78). In our study, the 20S proteasome activity seems to be overtaken, which does not allow it to effectively degrade carbonylated proteins after acute irradiation from 0.5 to 200 Gy. The level of carbonylated proteins being constant despite the inhibition of the 20S activity from 0.5 Gy another regulation mechanism of carbonylated proteins is probably involved. It has also been shown that the ubiquitin-proteasome system is functionally linked with autophagy, a second major intracellular protein degradation system (79). Autophagy is usually responsible for the degradation of long-lived proteins and other cellular components, but evidence suggests that this system also plays compensatory role and is activated by proteasome inhibition (80). In addition a study highlighted that the proteasomal system degrades proteins one by one whereas autophagy degrades protein aggregates (81). This provides a possible mechanism likely to degrade carbonylated proteins explaining why the induction rate of carbonylated proteins after acute irradiation is small. Actually, an hypothesis is that acute irradiation induces carbonylated proteins, aggregating if accumulating, and that such aggregates inhibit proteasome activity by obstruction. At 0.5 Gy, where 20S proteasome is inactivated, autophagy may be stimulated in order to degrade aggregates, leading to a decrease of protein carbonylation(82, 83). Acute irradiation seems leading to a cellular balance between the two major degradation systems: proteasome and autophagosome.

Link between molecular effects and reproduction decline after acute vs chronic gamma irradiation on *C. elegans*.

In the present study we observed that for a same cumulated dose, chronic irradiation may have less of an impact on embryo development than acute irradiation, but a higher of an impact on the number of progeny per individual. As our results did not show any dose-dependent correlation between carbonylated protein level and reproduction decrease in both irradiation modes, it does not seem that carbonylated protein level can be directly linked neither to total brood size nor to the hatching success decline.

Concerning chronic exposure to gamma rays, the absence of hatching success effect, could be explained by the increase of the 30S, 26S and 20S proteasome activities from 1 Gy involving DSB repair(61) *via* the DDR pathway, and *via* the removal of the carbonylated proteins, included histones. These findings support the hypothesis by which *C. elegans* is less vulnerable to cumulative effect of chronic exposure due to the repair capacity of developing gametes (section “reproduction”) compared to other invertebrates. Indeed, chronic irradiation may stimulate defense mechanisms including proteasomal activity modulation *i.e.* up-regulation of the 20S proteasome expression level through the SKN-1 pathway, possibly explaining the absence of carbonylated protein induction and decrease of the 26S proteasome from 4.5 Gy that could be involved in the accumulation of pro-apoptotic proteins inducing an increase of apoptosis during gametogenesis. This latter phenomenon could be an explanation to the decrease of the number of progeny per individual after chronic irradiation without modification of embryogenesis as DNA repair seems also stimulated by other pathways.

After acute irradiation, our study showed that 26S proteasome activity is decreased from 50 Gy, whereas reproduction is impacted from 30 Gy. Apoptosis is a highly conserved mechanism used to eliminate superfluous or damaged cells in multicellular eukaryotes and it is remarkably prevalent in germ cells, and is activated by p53 (84). Indeed, germ cells are dedicated both for the maintenance of eternal proliferative potential and for maintaining pluripotency to allow differentiation after fertilization whereas somatic cells are dedicated to contribute to the fitness for one generation. Supervising mechanisms are thus likely to be extremely important in the germline to ensure quality control. As previously discussed, we can then hypothesize, that i) a decline in the 20S proteasome activity from 0.5 Gy may lead to a defect in DNA repair promoting apoptosis at moderate doses, and ii) a decline in the ubiquitin-dependant proteolysis from 50 Gy could lead to an accumulation of p53 *C. elegans* ortholog CEP-1, and an increase of apoptosis but also to a DDR pathway defect. After acute irradiation, we conclude that both gametogenesis and embryogenesis are decreased. An increase of apoptosis is linked to reproduction decline(35), more particularly on the number of progeny. On the contrary, activities of the three forms of proteasome declined at different doses, possibly leading to a defect in the DDR pathway that cannot be compensated by autophagy mechanisms, may induce an accumulation of DNA damage during embryogenesis, when checkpoint quality control are overtaken. This could then explain the decrease of the hatching success after acute irradiation on *C. elegans* from 30 Gy.

Conclusion

Our results confirm that the effects induced by chronic irradiation differ in quality and intensity from those induced by acute irradiation, thus highlighting the limitations of the extrapolation of data obtained for acute exposure in order to predict the effects of chronic exposure.

In addition, the protein carbonylation level is not a sensitive/predictive marker of the effects of reproduction neither after acute nor after chronic irradiation. But, carbonylated proteins seem to disturb the cellular mechanisms involved against reactive oxygen species. However, the proteasome activity endpoint, responded earlier (65h) than the phenotypic markers (190h for the total reproduction). 20S proteasome activity was also more sensitive than reproduction parameter for acute and chronic irradiation (impact on the 20S proteasome activity from 0.5 Gy and 1 Gy respectively). The use of this molecular marker seems to be complementary in term of sensitivity and biological relevance to reproduction measurement after irradiation.

The results of the present study provide the preliminary clues to understand the role of protein oxidation and degradation in the radiation-induced molecular mechanisms after chronic *versus* acute irradiation in *C. elegans*.

Further studies will be necessary to investigate the role of other protein damage than carbonylation, the link between proteasome and apoptosis and SKN-1 molecular pathway in the regulation of proteasome expression levels after irradiation. Finally, a perspective of this study would be to assess the role of autophagy in the removal of damaged proteins after acute irradiation on *C. elegans*. This could have an important implication for environmental biomonitoring in relation chronic exposure to ionizing radiation.

Acknowledgments

We are particularly grateful to Olivier Coux for his advice and participation in experimental conception of proteasome study. We also thank Niki Chondrogianni, Nikoletta Papaevgeniou and Stephan Cui   for their precious advices.

RadeXP platform (Institut Curie-France) for advices, logistic and technical support during irradiations. This work was part of the Needs-Environment research program supported by the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN).

References

1. Clarke R, Fry F, Stather J, Webb G. 1990 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Documents of the NRPB. 1993;4(1):1-5.
2. Sugier A, Lecomte J-F, N  not J-C. Les recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique. Revue générale nucléaire. 2007(4):90-5.
3. Pereira S, Bourrachot S, Cavalie I, Plaire D, Dutilleul M, Gilbin R, et al. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. Environmental Toxicology and Chemistry. 2011;30(12):2831-7.
4. Kovalchuk O, Burke P, Besplug J, Slovack M, Filkowski J, Pogribny I. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2004;548(1-2):75-84.
5. Kryshev AI, Sazykina TG. Modelling the effects of ionizing radiation on survival of animal population: acute versus chronic exposure. Radiation and Environmental Biophysics. 2015;54(1):103-9.
6. Chaudhry MA, Omaruddin RA, Kreger B, de Toledo SM, Azzam EI. Micro RNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation. Molecular biology reports. 2012;39(7):7549-58.
7. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee D-Y, et al. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. PLoS ONE. 2010;5(9):e12570.
8. Berlett BS, Stadtman ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(33):20313-6.
9. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta. 2003;329(1):23-38.
10. Krisko A, Radman M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(32):14373-7.

11. Krisko A, Leroy M, Radman M, Meselson M. Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(7):2354-7.
12. Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 2001;83(3-4):301-10.
13. Jung T, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I—structure of proteasomes. *Redox Biology*. 2013;1(1):178-82.
14. Wilk S, Orłowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *Journal of neurochemistry*. 1983;40(3):842-9.
15. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:477-513.
16. Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, et al. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*. 2000;408(6808):115-20.
17. Breusing N, Grune T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biological chemistry*. 2008;389(3):203-9.
18. Ishii N, Goto S, Hartman PS. Protein oxidation during aging of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(8):1021-5.
19. Pervan M, Iwamoto KS, McBride WH. Proteasome Structures Affected by Ionizing Radiation. *Molecular Cancer Research*. 2005;3(7):381-90.
20. Grune T, Catalgol B, Licht A, Ermak G, Pickering AM, Ngo JK, et al. HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(7):1355-64.
21. Maupas E. Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie expérimentale et générale*. 1901;8:463-624.
22. Brenner S. THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*. 1974;77(1):71-94.
23. Takanami T, Mori A, Takahashi H, Higashitani A. Hyper-resistance of meiotic cells to radiation due to a strong expression of a single *recA*-like gene in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic acids research*. 2000;28(21):4232-6.
24. Bailly A, Gartner A. *Caenorhabditis elegans* Radiation Responses. *Molecular Determinants of Radiation Response*: Springer; 2011. p. 101-23.
25. Gartner A, Milstein S, Ahmed S, Hodgkin J, Hengartner MO. A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell*. 2000;5(3):435-43.
26. Byerly L, Cassada RC, Russell RL. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*. 1976;51(1):23-33.
27. Buisset-Goussen A, Goussen B, Della-Vedova C, Galas S, Adam-Guillermin C, Lecomte-Pradines C. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2014;137(0):190-7.
28. Buisset-Goussen A, Goussen B, Della-Vedova C, Galas S, Adam-Guillermin C, Lecomte-Pradines C. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2014;137:190-7.
29. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.101.1. 2006.
30. dit Ruys SP, Bonzom J-M, Frelon S. Benchmarking of protein carbonylation analysis in *Caenorhabditis elegans*: specific considerations and general advice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;99:364-73.
31. Myeku N, Metcalfe MJ, Huang Q, Figueiredo-Pereira M. Assessment of proteasome impairment and accumulation/aggregation of ubiquitinated proteins in neuronal cultures. *Neurodegeneration: Methods and Protocols*. 2011:273-96.
32. Team RC. R: A language and environment for statistical computing [Computer software]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2016.
33. Team R. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>. 2015.

34. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0146021.
35. Buisset-Goussen A. Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle: le nématode *Caenorhabditis elegans*: Aix-Marseille; 2014.
36. Harrison FL, Anderson SL. Effects of chronic irradiation on the reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiation Research*. 1994;140(3):401-9.
37. Knowles J, Greenwood L. The effects of chronic irradiation on the reproductive performance of *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). *Marine Environmental Research*. 1994;38(3):207-24.
38. Hertel-Aas T, Oughton DH, Jaworska A, Bjerke H, Salbu B, Brunborg G. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiation Research*. 2007;168(5):515-26.
39. Anderson SL, Wild GC. Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*. 1994;102(Suppl 12):9.
40. Harrison FL, Anderson SL. Effects of acute irradiation on reproductive success of the polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Radiation Research*. 1994;137(1):59-66.
41. Nakamori T, Yoshida S, Kubota Y, Ban-nai T, Kaneko N, Hasegawa M, et al. Effects of acute gamma irradiation on *Folsomia candida* (Collembola) in a standard test. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2008;71(2):590-6.
42. Nakamori T, Kubota Y, Ban-Nai T, Fujii Y, Yoshida S. Effects of acute gamma irradiation on soil invertebrates in laboratory tests. *Radioprotection*. 2009;44(05):421-4.
43. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*. 2005;24(7):1311-7.
44. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of Proteomics*. 2013;92:63-70.
45. Toroser D, Orr WC, Sohal RS. Carbonylation of mitochondrial proteins in *Drosophila melanogaster* during aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;363(2):418-24.
46. Ellis R, Schedl T. Sex determination in the germ line. 2007.
47. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. 2003;552(2):335-44.
48. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009;417(1):1-13.
49. Papa S, Skulachev V. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Detection of Mitochondrial Diseases*: Springer; 1997. p. 305-19.
50. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(5):R110. 006924.
51. Wang X, Yen J, Kaiser P, Huang L. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Science signaling*. 2010;3(151):ra88.
52. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(1):311-8.
53. Grune T, Reinheckel T, Davies K. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*. 1997;11(7):526-34.
54. Gao X, Li J, Pratt G, Wilk S, Rechsteiner M. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REGγ (PA28γ). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004;425(2):158-64.
55. Ustrell V, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *The EMBO Journal*. 2002;21(13):3516-25.
56. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in cell biology*. 2005;15(1):27-33.

57. Li X, Matilainen O, Jin C, Glover-Cutter KM, Holmberg CI, Blackwell TK. Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genet.* 2011;7(6):e1002119.
58. Steinbaugh MJ, Narasimhan SD, Robida-Stubbs S, Mazzeo LEM, Dreyfuss JM, Hourihan JM, et al. Lipid-mediated regulation of SKN-1/Nrf in response to germ cell absence. *Elife.* 2015;4:e07836.
59. Kaplun L, Ivantsiv Y, Kornitzer D, Raveh D. Functions of the DNA damage response pathway target Ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26S proteasome system. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(18):10077-82.
60. Ramadan K, Meerang M. Degradation-linked ubiquitin signal and proteasome are integral components of DNA double strand break repair: New perspectives for anti-cancer therapy. *FEBS letters.* 2011;585(18):2868-75.
61. Ullrich O, Sitte N, Sommerburg O, Sandig V, Davies KJA, Grune T. Influence of DNA Binding on the Degradation of Oxidized Histones by the 20S Proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1999;362(2):211-6.
62. Qian M-X, Pang Y, Liu Cui H, Haratake K, Du B-Y, Ji D-Y, et al. Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis. *Cell.* 2013;153(5):1012-24.
63. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, et al. Protein damage, repair and proteolysis. *Molecular aspects of medicine.* 2014;35(0):1-71.
64. Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Research.* 2005;65(13):5599-606.
65. SHINOHARA K, TOMIOKA M, NAKANO H, Shigenobu T, Hisashi I, KAWASHIMA S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochemical Journal.* 1996;317(2):385-8.
66. Wójcik C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2002;6(1):25-48.
67. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(20):12893-6.
68. Beyette J, MASON GG, MURRAY RZ, COHEN GM, Rivett AJ. Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. *Biochemical Journal.* 1998;332(2):315-20.
69. Maki CG, Huijbregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Research.* 1996;56(11):2649-54.
70. Rolfe M, Chiu MI, Pagano M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *Journal of molecular medicine.* 1997;75(1):5-17.
71. Pickering AM, Davies KJ. Degradation of Damaged Proteins-The Main Function of the 20S Proteasome. *Progress in molecular biology and translational science.* 2012;109:227.
72. Bulteau A-L, Moreau M, Nizard C, Friguet B. Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002;32(11):1157-70.
73. Reinheckel T, Ullrich O, Sitte N, Grune T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2000;377(1):65-8.
74. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T, Davies KJ. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochemical Journal.* 2010;432(3):585-95.
75. REINHECKEL T, SITTE N, ULLRICH O, KUCKELKORN U, DAVIES KJ, GRUNE T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal.* 1998;335(3):637-42.
76. Kjærsgård IV, Nørrelykke MR, Baron CP, Jessen F. Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006;54(25):9437-46.

77. Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke W-d, Von Zglinicki T, et al. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *The FASEB Journal*. 2000;14(11):1490-8.
78. Friguet B, Szweda LI. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS letters*. 1997;405(1):21-5.
79. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;4(1):1-26.
80. Ding W-X, Ni H-M, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability. *The American Journal of Pathology*. 2007;171(2):513-24.
81. Wang C, Wang X. The interplay between autophagy and the ubiquitin–proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(2):188-94.
82. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in cell biology*. 2000;10(12):524-30.
83. Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis*. 2013;2(1):1-14.
84. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(11):838-48.

Résumé

De par l'omniprésence des rayonnements ionisants, l'évaluation de leur impact sur les écosystèmes est devenue une préoccupation environnementale majeure. Cependant, l'évaluation des risques environnementaux liés aux expositions chroniques souffre d'un manque de connaissances, d'autant que l'extrapolation des données acquises après exposition aiguë (plus nombreuses) ne semble pas adaptée pour la prédiction des effets des expositions chroniques. Pour exemple, les effets sur les paramètres individuels *i.e.* la reproduction, diffèrent entre ces deux modes d'expositions, suggérant que les mécanismes moléculaires sous-jacents diffèrent également. Il est donc nécessaire de réaliser des études au niveau individuel et subcellulaire afin de mieux comprendre les différences de radiotoxicité observées entre les deux modes d'irradiation. Les protéines sont les molécules fonctionnelles dans les organismes, elles peuvent être les cibles de dommages oxydatifs (*i.e.* carbonylation), et sont susceptibles d'être des marqueurs pertinents et sensibles de l'exposition aux rayonnements ionisants. Ainsi, l'objectif de ce projet de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de radiotoxicité (aigu vs chronique) en étudiant particulièrement la contribution du protéome chez un organisme modèle, le nématode *Caenorhabditis elegans*. Pour ce faire, l'étude des effets d'irradiation gamma aiguë et chronique sur une large gamme de doses (0,5 - 200Gy, dont 4 doses communes aux deux modes d'exposition) a été opérée au niveau individuel, et en particulier sur la reproduction, paramètre susceptible d'influencer directement la dynamique des populations. En complément, la modulation de l'expression des protéines mais aussi leurs dommages (*i.e.* carbonylation) et leur dégradation par le protéasome ont été évalués. Les résultats ont montré que l'irradiation aiguë induit un effet sur le succès d'éclosion et sur la ponte totale dès 30Gy alors que seule la ponte totale est impactée par l'irradiation chronique à partir de 3,3Gy. A l'échelle moléculaire, les niveaux de protéines carbonylées sont très peu modulés après exposition chronique ou aiguë aux rayonnements ionisants. Le protéasome semble être impliqué dans la dégradation des protéines carbonylées après irradiation chronique. En revanche, après irradiation aiguë, celui-ci semble dépassé, suggérant une possible implication d'autres mécanismes de défense (autophagie). Les profils d'expression des protéines, et notamment de protéines impliquées dans l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN, la réplication et la reproduction sont différents après irradiation aiguë et chronique. Ainsi, les protéines nécessaires au développement embryonnaire sont surexprimées après irradiation aiguë dès 0,5 Gy alors que celles impliquées dans le développement de la lignée germinale sont réprimées. Ces dernières sont surexprimées après irradiation chronique dès 0,5 Gy. Ces résultats, suggèrent que les mécanismes de radiotoxicité entre les expositions aiguës et chroniques sont bien distincts, et que les effets de l'irradiation aiguë pourraient être dus à une perturbation de la gamétogénèse. A l'inverse, l'irradiation chronique induirait un mécanisme de défense *via* la surexpression de protéines nécessaires à la maturation des ovocytes. Ce projet de recherche nous a permis d'apporter des connaissances sur les cascades d'événements moléculaires suite à différentes conditions d'irradiation gamma et illustre l'intérêt d'utiliser une approche intégrée pour mieux prédire et comprendre les effets observés sur les grandes fonctions biologiques. De plus ces travaux ont permis de caractériser des marqueurs protéiques d'exposition plus sensibles que les marqueurs individuels puisque l'activité du protéasome et l'expression des protéines est modulée dès 0,5Gy. *In fine* cet ensemble de données contribuera à améliorer l'évaluation des risques pour l'environnement.

Mots clés : irradiation gamma, aigu vs chronique, reproduction, carbonylation, protéasome, expression protéique, *Caenorhabditis elegans*

Abstract

Because of the ubiquitous nature of ionizing radiation, the risk assessment on ecosystems has become a major environmental concern. However, the environmental risk assessment of chronic exposures suffers from a lack of knowledge, especially because the extrapolation of data acquired after acute exposure in order to predict the effects of chronic exposures is not always relevant. Indeed, the effects on the individual parameters, *i.e.* reproduction, differ between these two irradiation modes, suggesting that underlying mechanisms are also different. It is therefore necessary to carry out studies at the individual and at the subcellular level in order to better understand molecular mechanisms governing these differences in the observed effects. Proteins are the functional molecules in organisms, they can be the targets of oxidative damage (*i.e.* carbonylation), and are likely to be relevant and sensitive markers of exposure to ionizing radiation. Thus, the objective of this research project was to improve the understanding of molecular mechanisms of radiotoxicity (acute vs chronic), particularly by studying the proteome contribution, on the biological model *Caenorhabditis elegans*. The study of the acute and chronic gamma irradiation effects, on a large dose range (between 0.5 and 200Gy, including 4 common doses to both irradiation modes), was performed at the individual level with the reproduction as endpoint, a parameter likely to directly influence the dynamic of populations. In addition, the modulation of protein expression but also their damage (*i.e.* carbonylation) and their degradation by the proteasome were evaluated. The results showed that acute irradiation induced an effect on hatching success and on total spawning from 30 Gy whereas only total spawning was impacted after chronic irradiation from 3.3 Gy. At the molecular level, the global level of carbonylated proteins was not so modified after chronic or acute exposure to ionizing radiation. The proteasome appears to be involved in the degradation of carbonylated proteins after chronic irradiation whereas after acute irradiation, it seems overtaken, suggesting a possible involvement of other defense mechanisms (autophagy). The protein expression, and particularly proteins involved in apoptosis, DNA repair, replication and reproduction, is differentially modulated after acute and chronic exposure. Thus, the proteins involved in embryonic development are overexpressed after acute irradiation as soon as 0.5 Gy whereas those involved in the germline development are repressed. These results suggest that the radiotoxicity mechanisms between acute and chronic exposures are quite different and that the effects of acute irradiation may be due to gametogenesis disturbance. Conversely to acute, chronic irradiation induces a defense mechanism *via* the overexpression of proteins involved in oocyte development. This research project allowed us to provide knowledge on the molecular cascade events following different gamma irradiation conditions and highlights the need of using an integrated approach to better predict and understand the observed effects on major biological functions. Moreover, this work allowed characterizing more sensitive markers of exposure than the individual ones as the proteasome activity and the protein expression is modulated from 0.5Gy. Ultimately this dataset would help to improve the environmental risk assessment.

Key Words : gamma irradiation, acute vs chronic, reproduction, carbonylation, proteasome, protein expression, *Caenorhabditis elegans*

