



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

G.F.D : Génie Biologique



**Hétérogénéité clonale de lignées cellulaires de carcinomes
épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures
après exposition aux radiations ionisantes.**

*Prolifération cellulaire, mort cellulaire radio-induite
et voies de détoxification des espèces réactives de l'oxygène*

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 8 Novembre 1999 pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

Par

Christophe DUBESSY

Membres du Jury :

Docteur C. MARCHAL	Directeur de Thèse
Professeur P. SCALLIET	Rapporteur
Professeur J.-C. JARDILLIER	Rapporteur
Docteur J.-L. MERLIN	Membre du Jury
Docteur G. GRIFFON-ETIENNE	Membre du Jury
Professeur M. DAUCA	Membre du Jury

A mes parents,
pour leur soutien et leurs encouragements

A Marie-Françoise,
pour son soutien, sa patience, et son amour

A Marine,
pour le bonheur qu'elle m'apporte chaque jour

A ma famille

Je tiens à remercier les membres de mon jury,

Monsieur le Docteur *Christian Marchal*

Je souhaite vivement vous remercier pour avoir accepté de diriger mes recherches. Vous avez su faire preuve de pédagogie pour m'enseigner les bases de la radiobiologie avec passion. Votre disponibilité et votre enthousiasme alliés à vos précieux conseils m'ont permis de mener à bien ce travail. Je vous prie de trouver ici, l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Docteur *Jean-Louis Merlin*

Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères pour votre soutien et votre confiance à mon égard pendant ces quatre années. La disponibilité dont vous avez su faire preuve et l'intérêt que vous avez porté à ce travail, de par vos qualités scientifiques et l'acuité de vos conseils, en ont permis la réalisation. Je ne saurais oublier votre entrain, votre bonne humeur ni l'ambiance agréable que vous contribuez à instaurer. Veuillez trouver ici, Jean-Louis, un témoignage de ma sincère reconnaissance pour votre confiance et votre sympathie.

Monsieur le Professeur *Pierre Scalliet*

Je vous adresse mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et me faites un grand honneur en acceptant de le juger. Veuillez croire, Monsieur, en ma haute considération.

Monsieur le Professeur *Jean-Claude Jardillier*

Je tiens à vous exprimer ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteur de mon mémoire de thèse. Soyez assuré, Monsieur, de mon profond respect.

Madame le Docteur *Geneviève Etienne-Griffon*

Je suis particulièrement sensible à ta participation dans ce jury. Ce travail, dont une partie découle du tien, a notamment pu être réalisé grâce aux conseils avisés et à l'aide, aussi bien technique que scientifique, que tu m'as apportés au début. Trouve ici l'expression de ma plus grande estime.

Monsieur le Professeur *Michel Dauça*

Votre participation au jury de ma thèse m'honore. Vous qui avez toujours su m'accueillir au sein de votre laboratoire, soyez assuré de ma respectueuse reconnaissance.

Je souhaite également remercier et associer toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail réalisé au Laboratoire de Recherche en Oncologie du Centre Alexis Vautrin.

Toute l'équipe du Laboratoire de Recherche en Oncologie et plus particulièrement à :

Carole Ramacci et Sophie Marchal pour leurs précieux conseils en culture cellulaire et cytométrie en flux mais également pour leur bonne humeur et leur sympathie.

Muriel Barberi-Heyob, Nathalie Bachmann, Corinne Dill, Dominique Marius-Leprince, Jean-François, Céline, Anne, Estelle, Sabine, les « PDTistes » : *Lina, Vlada, Stéphanie, Marie-Hélène*.

Aux différents stagiaires qui m'ont accompagnés : *Stéphanie, Henri-Pierre, Frédérique, Raphaël, François, Johnny, Sébastien*.

Monsieur le Professeur *François Guillemain* pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du Centre Alexis Vautrin.

Monsieur le Docteur *Gilles Dolivet* qui, outre ses critiques constructives concernant la première partie de ce manuscrit, m'a fait découvrir la chirurgie ORL.

Monsieur le Docteur *Philippe Becuwe et Arnaud Bianchi*. L'accueil chaleureux, les conseils éclairés, la disponibilité, la sympathie sont quelques mots qui définissent notre collaboration fructueuse concernant la MnSOD et la MT2A. Soyez en vivement remerciés.

Madame *Christine Arnould* et Mademoiselle *Raphaëlle Friot* dont l'accompagnement a été déterminant pour le développement du projet « compteur de sphéroïdes ».

Les *Comités Lorrains de la Ligue Contre Le Cancer* qui m'ont soutenu financièrement et ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens également à remercier *Monsieur Martel* pour la qualité de la reprographie qu'il a su réaliser dans les plus brefs délais.

Sommaire

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- Chapitre I Les cancers des Voies Aéro-digestives Supérieures (VADS).
- Chapitre II Bases radiobiologiques.
- Chapitre III Réponse tissulaire aux radiations ionisantes.
- Chapitre IV La réponse cellulaire aux radiations ionisantes.
- Chapitre V Intérêts des sphéroïdes en radiobiologie.

PARTIE EXPERIMENTALE

- Chapitre VI Matériels et méthodes.
- Chapitre VII Développement et étude de la radiosensibilité de fractions survivantes et clones issus des lignées cellulaires FaDu et KB après irradiation fractionnée.
- Chapitre VIII Expression du gène et de la protéine p53 et relations avec les arrêts du cycle cellulaire.
- Chapitre IX Mort cellulaire radio-induite.
- Chapitre X Expression de gènes et protéines impliqués dans les processus de détoxification.
- Chapitre XI Réalisation d'un système d'analyse automatique des sphéroïdes.

Bibliographie

Annexes

Table des matières

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I	LES CANCERS DES VOIES AÉRO-DIGESTIVES SUPÉRIEURES (VADS).....	16
I.1	EPIDÉMIOLOGIE.....	16
I.1.1	<i>Incidence ou morbidité</i>	16
I.1.2	<i>Mortalité</i>	17
I.2	FACTEURS DE RISQUES.....	17
I.2.1	<i>Tabac</i>	17
I.2.2	<i>Alcool</i>	18
I.2.3	<i>Autres</i>	19
I.2.3.1	<i>Virus</i>	19
I.2.3.2	<i>Expositions professionnelles</i>	19
I.2.3.3	<i>Prédispositions génétiques</i>	19
I.2.3.4	<i>Facteurs alimentaires</i>	20
I.2.3.5	<i>Conditions environnementales</i>	20
I.2.4	<i>Hygiène bucco-dentaire</i>	20
I.3	DIAGNOSTIC.....	20
I.3.1	<i>Les symptômes</i>	20
I.3.1.1	<i>Les cancers du larynx</i>	21
I.3.1.2	<i>Les cancers de la cavité orale</i>	21
I.3.1.3	<i>Les cancers de l'oropharynx et de l'hypopharynx</i>	21
I.3.1.4	<i>Les cancers des fosses nasales et des sinus de la face</i>	21
I.3.1.5	<i>Les cancers du nasopharynx</i>	21
I.3.2	<i>Pathologies associées</i>	21
I.3.3	<i>Investigations cliniques</i>	22
I.4	CLASSIFICATIONS.....	22
I.4.1	<i>Localisations anatomiques</i>	22
I.4.2	<i>TNM</i>	23
I.4.3	<i>Classification clinique</i>	24
I.4.4	<i>Anatomo-pathologie</i>	25
I.4.4.1	<i>Les tumeurs épithéliales (21)</i>	25
I.4.4.2	<i>Les tumeurs non épithéliales (21)</i>	25
I.5	TRAITEMENTS.....	25
I.5.1	<i>Chirurgie</i>	26
I.5.2	<i>Radiothérapie</i>	26
I.5.2.1	<i>Historique</i>	26
I.5.2.2	<i>Principe</i>	27
I.5.2.3	<i>Curiethérapie</i>	27
I.5.3	<i>Chimiothérapie</i>	27
I.5.3.1	<i>Historique</i>	27
I.5.3.2	<i>Principe</i>	28

1.5.3.3	Traitements.....	28
1.5.4	<i>Associations de traitements</i>	28
1.5.4.1	Radio-chimiothérapie concomitante.....	28
1.5.4.2	Chimiothérapie néo-adjuvante.....	29
1.5.4.3	Association radiothérapie-chirurgie.....	29
1.5.5	<i>Traitements des différentes formes de cancers des VADS (3, 21)</i>	29
1.5.5.1	Nasopharynx.....	29
1.5.5.2	Oropharynx.....	29
1.5.5.3	Hypopharynx.....	30
1.5.5.4	Larynx.....	30
1.5.5.5	Cavité buccale.....	30
1.5.5.6	Les adénopathies ganglionnaires.....	30
1.5.6	<i>Conséquences</i>	30
1.5.6.1	Effets secondaires.....	30
1.5.6.2	Récidives.....	31

RESUME DU CHAPITRE I

II	BASES RADIOBIOLOGIQUES	33
II.1	LES RAYONNEMENTS IONISANTS.....	33
II.1.1	<i>Rayonnements chargés</i>	33
II.1.2	<i>Neutres</i>	33
II.2	MODÈLES.....	34
II.2.1	<i>Une cible à un coup</i>	35
II.2.2	<i>n cibles à un coup</i>	35
II.2.3	<i>Modèle à 2 composantes</i>	37
II.2.4	<i>Linéaire et Quadratique</i>	38
II.2.5	<i>Validité des modèles et des paramètres radiobiologiques</i>	41
II.2.6	<i>Extension du modèle LQ</i>	42

RESUME DU CHAPITRE II

III	RÉPONSE TISSULAIRE AUX RADIATIONS IONISANTES	44
III.1	TYPES DE RAYONNEMENT.....	44
III.2	FRACTIONNEMENT.....	44
III.3	TOLÉRANCE.....	44
III.4	LÉSIONS.....	45
III.4.1	<i>Généralités</i>	45
III.4.2	<i>VADS</i>	45

III.4.3	<i>Autres tissus</i>	46
III.5	EVALUATION CLINIQUE DE LA RADIOSENSIBILITÉ.....	46
III.6	PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	48
III.6.1	<i>Etat prolifératif des cellules tumorales</i>	48
III.6.2	<i>Paramètres de cinétique tumorale</i>	48
III.6.3	<i>Valeurs des paramètres de cinétique tumorale</i>	49
III.6.4	<i>Repopulation</i>	49
III.7	RÉCIDIVES.....	49
III.7.1	<i>Données cliniques</i>	49
III.7.2	<i>Types cellulaires</i>	50
III.7.3	<i>Taux de cellules clonogéniques</i>	50
III.7.4	<i>Oxygénation</i>	51

RESUME DU CHAPITRE III

IV	LA RÉPONSE CELLULAIRE AUX RADIATIONS IONISANTES	54
IV.1	RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE.....	54
IV.2	LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO).....	55
IV.2.1	<i>Production des ERO</i>	55
IV.2.2	<i>Effets moléculaires des ERO</i>	57
IV.2.3	<i>Processus de détoxification</i>	58
IV.2.3.1	Le taux de glutathion (GSH).....	59
IV.2.3.2	Les glutathion S-transférases (GST).....	60
IV.2.3.3	Les superoxyde dismutases (SOD).....	61
IV.2.3.4	La glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR).....	62
IV.2.3.5	Les métallothionéines (MT).....	62
IV.3	LE CYCLE CELLULAIRE APRÈS IRRADIATION.....	64
IV.3.1	<i>Rappels</i>	64
IV.3.2	<i>La régulation des phases du cycle cellulaire</i>	65
IV.3.2.1	Point de contrôle G ₁ /S.....	66
IV.3.2.2	Point de contrôle G ₂ /M.....	67
IV.3.3	<i>Sensibilité des phases du cycle cellulaire aux radiations ionisantes</i>	67
IV.3.4	<i>L'arrêt en G₁/S</i>	68
IV.3.5	<i>L'arrêt en G₂/M</i>	70
IV.4	MÉCANISMES DE RÉPARATION DES RADICÉLÉSIONS DE L'ADN.....	72
IV.4.1	<i>Réparation des bases</i>	73
IV.4.2	<i>Réparation des cassures</i>	74
IV.5	LA MORT CELLULAIRE.....	76
IV.5.1	<i>Mort différée</i>	76
IV.5.2	<i>Concept actuel</i>	77

<i>IV.5.3 Nécrose</i>	78
<i>IV.5.4 Apoptose</i>	79
IV.5.4.1 Description physiologique.....	79
IV.5.4.2 Comparaison apoptose/nécrose.....	81
IV.5.4.3 Régulation de l'apoptose.....	83
IV.5.4.3.1 La voie dépendante de p53.....	83
IV.5.4.3.2 La voie sphingomyéline/céramide.....	85
IV.5.4.3.3 La voie Fas/FasL.....	86
IV.5.4.3.4 Les caspases	86
<i>IV.5.5 Relations entre l'apoptose et la radiosensibilité</i>	87

RESUME DU CHAPITRE IV

V INTÉRÊTS DES SPHÉROÏDES EN RADIOBIOLOGIE	91
V.1 INTRODUCTION	91
V.2 PARAMÈTRES AFFECTANT LA SENSIBILITÉ DES SPHÉROÏDES AUX RADIATIONS IONISANTES.....	92
<i>V.2.1 Communications et contacts intercellulaires</i>	92
<i>V.2.2 Oxygène</i>	93
<i>V.2.3 Réparation des dommages</i>	94
<i>V.2.4 Induction d'apoptose</i>	95
V.3 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR LES ÉTUDES DE RADIOBIOLOGIE.....	96
<i>V.3.1 Techniques de culture</i>	96
<i>V.3.2 Conditions de croissance</i>	98
<i>V.3.3 Les essais basés sur les sphéroïdes</i>	100
V.3.3.1 Méthodes basées sur la dissociation des sphéroïdes	100
V.3.3.1.1 Essais clonogéniques.....	101
V.3.3.1.2 Essais colorimétriques.....	101
V.3.3.1.3 Cytométrie en flux	101
V.3.3.2 Méthodes basées sur l'analyse de sphéroïdes entiers.....	102
V.3.3.2.1 Numération des sphéroïdes et détermination de leur taille.....	102
V.3.3.2.2 Mesures d'oxygène	103
V.4 LE SPHÉROÏDE COMME UN MODÈLE DE LA RADIOSENSIBILITÉ TUMORALE IN VIVO.....	104
<i>V.4.1 Les carcinomes des VADS</i>	104
<i>V.4.2 Les autres types</i>	105
V.5 CONCLUSION.....	105

RESUME DU CHAPITRE V

PARTIE EXPERIMENTALE

VI	MATÉRIELS ET MÉTHODES	109
VI.1	LIGNÉES CELLULAIRES	109
VI.2	TRAITEMENT DES CELLULES, CLONAGE CELLULAIRE	109
VI.3	DÉTERMINATION DE LA RADIOSENSIBILITÉ	110
VI.4	DÉTERMINATION DU TEMPS POTENTIEL DE DOUBLEMENT, DE LA DURÉE DE LA PHASE S ET DU LABELLING INDEX	111
VI.5	ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE ET DES ARRÊTS APRÈS IRRADIATION	112
VI.6	TEMPS DE DOUBLEMENT	112
VI.7	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE	114
VI.7.1	<i>Extraction d'ARN</i>	114
VI.7.2	<i>Transcription inverse</i>	115
VI.7.3	<i>PCR semi-quantitative</i>	115
VI.7.4	<i>Analyse des produits de PCR</i>	119
VI.8	ANALYSES STATISTIQUES	119
VI.9	WESTERN-BLOTS	119
VI.9.1	<i>Extraction et dosage de protéines</i>	120
VI.9.2	<i>Gels de polyacrylamide</i>	121
VI.9.3	<i>Traitement des échantillons</i>	122
VI.9.4	<i>Transfert</i>	123
VI.9.5	<i>Marquage</i>	124
VI.9.6	<i>Révélation</i>	125
VI.10	DÉTECTION DE L' APOPTOSE	126
VI.10.1	<i>Marquage à l'Acridine Orange-Bromure d'éthidium et détection par cytométrie en flux</i>	126
VI.10.2	<i>Marquage au Hœchst 33342 et détection par microscopie de fluorescence</i>	126
VI.11	CULTURE DE SPHÉROÏDES	128
VI.11.1	<i>Initiation</i>	128
VI.11.2	<i>Maintien</i>	128
VII	DÉVELOPPEMENT ET ÉTUDE DE LA RADIOSENSIBILITÉ DE CLONES ISSUS DE LA LIGNÉE CELLULAIRE KB APRES IRRADIATION FRACTIONNÉE	130
VII.1	OBJECTIFS	130
VII.2	MÉTHODOLOGIE	130
VII.3	RÉSULTATS	132
VII.3.1	<i>Radiosensibilité</i>	132

VII.3.1.1	Lignée KB et les clones.....	132
VII.3.1.2	Lignée FaDu.....	136
VII.3.2	<i>Prolifération cellulaire</i>	138
VII.3.2.1	Durée de la phase S.....	138
VII.3.2.2	Labelling Index.....	139
VII.3.2.3	Temps potentiel de doublement.....	140
VII.3.2.4	Temps de doublement.....	141
VII.3.2.5	Pertes cellulaires.....	142
VII.4	DISCUSSION.....	143
VII.4.1	<i>Radiosensibilité</i>	143
VII.4.2	<i>Prolifération cellulaire</i>	145
VII.4.2.1	Durée de la phase S (T_s).....	145
VII.4.2.2	Labelling Index (LI).....	146
VII.4.2.3	Temps potentiel de doublement (T_{pot}).....	146
VII.4.2.4	Temps de doublement (T_d).....	147
VII.4.2.5	Pertes cellulaires.....	147

RESUME DU CHAPITRE VII

VIII	EXPRESSION DU GÈNE ET DE LA PROTÉINE P53.....	151
VIII.1	OBJECTIFS.....	151
VIII.2	MÉTHODOLOGIE.....	152
VIII.2.1	<i>RT-PCR semi-quantitative</i>	152
VIII.2.2	<i>Western-Blot</i>	153
VIII.2.3	<i>Analyse du cycle cellulaire</i>	153
VIII.3	RÉSULTATS.....	154
VIII.3.1	<i>Expression de p53</i>	154
VIII.3.1.1	Taux d'expression basal de l'ARNm de p53.....	154
VIII.3.1.2	Cinétique d'expression de l'ARNm de p53.....	155
VIII.3.1.3	Cinétique d'expression de la protéine p53.....	158
VIII.3.2	<i>Cycle cellulaire</i>	159
VIII.3.2.1	Distribution des lignées dans le cycle cellulaire.....	159
VIII.3.2.2	Corrélations avec la radiosensibilité.....	161
VIII.3.2.3	Arrêts radio-induits du cycle cellulaire.....	163
VIII.3.2.3.1	FaDu, FaDu ^{m20} et FaDu ^{m72}	163
VIII.3.2.3.2	KB, KB ^m , clones.....	165
VIII.3.2.4	Corrélations avec la radiosensibilité.....	167
VIII.4	DISCUSSION.....	169
VIII.4.1	<i>Expression de p53</i>	169
VIII.4.2	<i>Distribution des cellules dans le cycle cellulaire</i>	172
VIII.4.3	<i>Arrêts radio-induits du cycle cellulaire</i>	173

RESUME DU CHAPITRE VIII

IX MORT CELLULAIRE RADIO-INDUITE.....	179
IX.1 OBJECTIFS.....	179
IX.2 MÉTHODOLOGIE.....	179
IX.3 RÉSULTATS.....	180
IX.3.1 <i>Détection par marquage AO-BET</i>	180
IX.3.1.1 Apoptose.....	181
IX.3.1.2 Nécrose.....	182
IX.3.2 <i>Observations en microscopie de fluorescence</i>	184
IX.4 DISCUSSION.....	186

RESUME DU CHAPITRE IX

X EXPRESSION DE GÈNES ET PROTÉINES IMPLIQUÉS DANS LES PROCESSUS DE DÉTOXIFICATION.....	191
X.1 OBJECTIFS.....	191
X.2 MÉTHODOLOGIE.....	192
X.2.1 <i>RT-PCR</i>	192
X.2.2 <i>Western-blots</i>	193
X.3 RÉSULTATS.....	193
X.3.1 <i>Expression basale des ARNm de GST-μ et GST-π</i>	193
X.3.2 <i>Expression radio-induite</i>	197
X.3.2.1 GST- π	197
X.3.2.2 MnSOD.....	199
X.3.2.3 MT2A.....	202
X.4 DISCUSSION.....	205
X.4.1 <i>Expression basale de GST-μ et GST-π</i>	205
X.4.2 <i>Cinétique d'expression</i>	207
X.4.2.1 GST- π	207
X.4.2.2 MnSOD.....	208
X.4.2.3 MT2A.....	209

RESUME DU CHAPITRE X

XI RÉALISATION D'UN SYSTÈME D'ANALYSE AUTOMATIQUE DES SPHÉROÏDES.....	213
XI.1 OBJECTIFS.....	213

XI.2	LOGICIEL.....	214
XI.2.1	<i>Configuration du logiciel</i>	214
XI.2.2	<i>Analyse d'image</i>	216
XI.2.2.1	Acquisition.....	216
XI.2.2.2	Binarisation.....	216
XI.2.2.3	Extraction simple.....	216
XI.2.2.4	Extraction des composantes connexes (si activé).....	218
XI.2.2.4.1	Extraction.....	218
XI.2.2.4.2	Erosion ultime.....	218
XI.2.2.4.3	Epaississement.....	218
XI.2.2.4.4	Transformée de Hough.....	219
XI.2.2.5	Résultats.....	219
XI.2.3	<i>Divers</i>	219
XI.3	AUTOMATE.....	220
XI.4	VALIDATION.....	222
XI.4.1	<i>Principes</i>	222
XI.4.2	<i>Résultats</i>	223
XI.4.3	<i>Conclusion</i>	224

RESUME DU CHAPITRE XI

Bibliographie

Annexes

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Abréviations

Liste des publications et communications

Publications

Brevet



Introduction générale

es cancers des voies aéro-digestives supérieures représentent l'une des premières cause de mortalité par cancers notamment en France. Ainsi on estime que 500 000 nouveaux cas de cancers des VADS sont dépistés chaque année dans le monde principalement chez l'homme mais son incidence est en nette progression chez la femme.

Bien que de nombreux progrès thérapeutiques (nouvelles associations, radiothérapie conformationnelle etc...) aient été réalisés ainsi qu'au niveau de l'amélioration de la qualité de vie (conservation du larynx), la mortalité reste importante notamment pour les formes les plus évoluées. Les traitements sont en parti basés sur l'utilisation des radiations ionisantes, le plus souvent associés à la chirurgie et à la chimiothérapie. Ces cancers montrent un taux de récurrences, généralement radiorésistantes, de 15 à 20 % qui apparaissent dans les 2 à 3 ans suivant le traitement.

Les radiations ionisantes produisent de nombreux effets au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire. Ainsi des espèces réactives de l'oxygène sont produites et occasionnent des lésions notamment au niveau de l'ADN. L'efficacité de leur élimination par les systèmes enzymatique de détoxification est liée à la radiosensibilité. L'irradiation provoque également des perturbations dans le déroulement du cycle cellulaire qui se répercutent sur l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN et l'induction d'apoptose. Ce processus de mort cellulaire programmée, induit par les radiations, peut influencer la réponse à un traitement anticancéreux. De même, la prolifération cellulaire et donc tumorale montre d'importantes répercussions sur la radiosensibilité. L'influence de ces facteurs étudiés sur des cultures cellulaires en monocouche, est parfois différente de celle rencontrée dans les tumeurs. Le modèle du sphéroïde tumoral multicellulaire permet toutefois de s'en approcher.

L'ensemble de ces facteurs est impliqué dans la résistance intrinsèque ou acquise aux radiations ionisantes sans que la totalité des mécanismes et leurs relations soit connus et identifiés.

L'objectif de ce travail est d'identifier et d'analyser les facteurs menant aux variations de sensibilité aux radiations ionisantes en se basant sur des modèles cellulaires de carcinomes épidermoïdes des VADS.



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Les cancers des Voies Aéro-digestives supérieures (VADS).

I Les cancers des Voies Aéro-digestives Supérieures (VADS)

1.1 Epidémiologie

L'épidémiologie des cancers est difficile à étudier car les certificats de décès ne prennent pas nécessairement en compte les antécédents, l'état carcinologique au moment du décès ainsi que la localisation précise notamment dans le cas des cancers des VADS. De plus, peu de pays disposent de registres des cancers qui restent souvent limités à quelques régions.

Il n'existe pas en France de registre national des cancers, les estimations sont donc extrapolées à partir des 12 registres régionaux tels que ceux du Doubs, du Bas-Rhin ou du Tarn (1) qui couvrent 11% de la population (2).

1.1.1 Incidence ou morbidité

C'est le nombre de nouveaux cancers apparaissant annuellement pour 100 000 habitants. En France, on dénombre 240 000 nouveaux cas de cancers chaque année, soit environ 4 cas pour 1 000 habitants.

Tableau 1 : Estimations de la morbidité et de la mortalité par cancers totaux et cancers des VADS sur la population Française en 1995 (d'après Ménégos *et al.* (2)).

	Morbidité			Mortalité		
	Total	hommes	femmes	Total	hommes	femmes
Cancers totaux	240 000	134 500	105 500	143 000	87 000	56 000
Répartition	100%	56%	44%	100%	61%	39%
Morbidité (brute) (/100 000)	413	477	353	246	306	189
Cancers des VADS*	16 900	14 900	2 000	7 500	6 650	850
Répartition	7,1%	11,1%	1,9%	5,2%	7,6%	1,5%
Morbidité (brute) (/100 000)	29,3	52,9	6,7	12,8	23,2	2,8

*cancers des VADS sans l'œsophage.

On estime que 500 000 nouveaux cas de cancers des VADS sont dépistés chaque année dans le monde (3). En France en 1995, les cancers des VADS (sans les cancers de l'œsophage) représentent 11,1% des cancers chez l'homme et 1,9% chez la femme (2) (Tableau 1). Bien qu'inégalement réparti, ce taux de morbidité est le plus élevé au monde (4). En effet, le Nord,

l'Ouest et l'Est sont les régions Françaises les plus touchées (5). Par exemple, on estime que 900 cas sont dépistés chaque année en Lorraine. Par comparaison, en Europe, ce taux est de 4,2% chez l'homme et 0,9% chez la femme (6). Aux Etats-Unis, il représente 3,6 % des nouveaux cas de cancers (7).

I.1.2 Mortalité

C'est le nombre de décès par cancers observé annuellement pour 100 000 habitants. En France, 27,5% des 520 000 décès annuels sont dus aux cancers, soit 143 000 décès (incidence de 246/100 000) (2, 4, 8). La proportion des voies aéro-digestives supérieures est importante car elle représente 5,2% de tous les cas (2). Ainsi, on estime qu'environ 7 500 personnes décèdent annuellement d'un cancer des VADS en France (sans les cancers de l'œsophage).

Il est à noter qu'il existe une très forte disparité d'incidence et de mortalité entre les deux sexes au niveau des VADS ; environ 10 fois plus d'hommes sont touchés par la maladie cancéreuse que les femmes (1, 2, 8).

I.2 Facteurs de risques

Contrairement à d'autres localisations (sein, prostate), les facteurs de risque des cancers des VADS sont bien identifiés. Il s'agit principalement du tabac et de l'alcool. Ces deux facteurs permettent d'expliquer la différence d'incidence de cette pathologie entre les hommes et les femmes.

I.2.1 Tabac

De nombreuses études (7, 9, 10) ont montré de manière irréfutable l'impact de la consommation de tabac dans la survenue de cancers des VADS mais également des bronches, du poumon et de l'œsophage (11). En effet, 5 à 10% de la fumée se dépose sur l'arbre trachéo-bronchique, 30 à 40% dans les alvéoles pulmonaires, le reste étant expiré ou déposé sur les muqueuses des VADS. Trois types de composés sont considérés comme cancérogènes : les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les dérivés de la pyrolyse de la nicotine et les nitrosamines.

Les sites anatomiques touchés varient selon le type de tabac et le mode de consommation. L'augmentation du risque relatif de survenue d'un cancer des VADS est liée de manière

linéaire à la quantité de tabac consommé (10). Toutefois, un retour du risque à la normale est observé après 5 à 10 ans de sevrage tabagique (10). Le nombre de patients non fumeurs touchés par un cancer des VADS n'est que de 2 à 10% selon les études (10).

I.2.2 Alcool

Plusieurs hypothèses sont actuellement avancées pour expliquer l'action carcinogène de l'alcool : irritation directe des muqueuses surtout pour les alcools forts, rôle de solvant pour les composés cancérigènes du tabac, rôle des composés carcinogènes (tanins, nitrosamines, hydrocarbures polycycliques aromatiques) contenus dans certaines boissons alcoolisées, action hépatique par induction d'enzymes de conversion et/ou de détoxification, rôle des carences nutritionnelles accompagnant l'alcoolisme. Un rôle direct important a été mis en évidence quand la consommation devient supérieure à 120 g d'alcool pur par jour. Seuls 3% des patients sont non buveurs. Comme pour le tabac, les localisations anatomiques touchées par la maladie varient selon la consommation d'alcool mais le risque relatif augmente de façon exponentielle, et non linéaire, avec la consommation d'alcool.

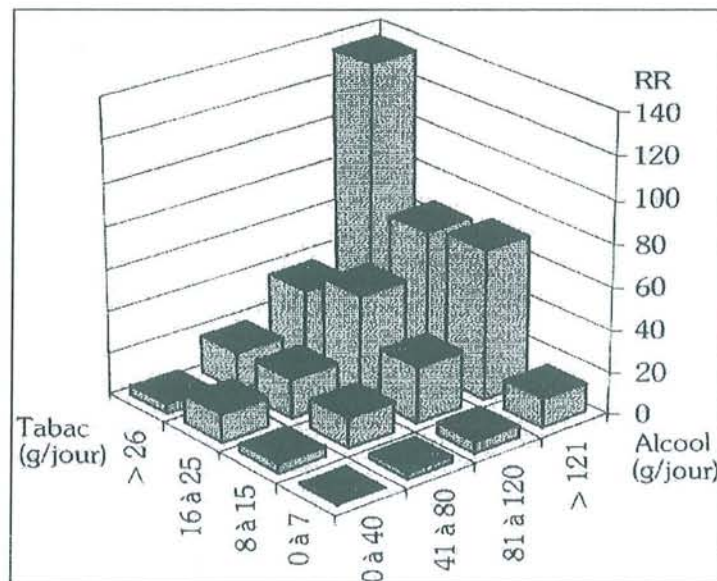


Figure 1 : Risque Relatif de cancer de l'hypopharynx en fonction du niveau d'association alcoolo-tabagique (d'après Tuyns *et al.*, 1988 (10)).

Toutefois, le rôle majeur de l'alcool est de potentialiser l'action du tabac. Les études épidémiologiques montrent d'ailleurs une supra-additivité de l'association alcoolo-tabagique (7, 10, 12). Un exemple concernant l'hypopharynx est illustré par la Figure 1.

I.2.3 Autres

D'autres facteurs de risques, moins prépondérants dans l'incidence de la maladie, ont été mis en évidence.

I.2.3.1 Virus

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), associé aux carcinomes naso-pharyngés, agit en dérégulant les processus apoptotiques. Ces cancers sont rares sauf dans des régions bien identifiées telles que le sud de la Chine, l'Asie du Sud-Est, l'Afrique du Nord où l'Alaska, et se distinguent des autres carcinomes épidermoïdes par leur indépendance vis-à-vis des facteurs alcoolo-tabagiques.

Les papilloma virus humain (HPV), notamment les types HPV 16, semblent également impliqués dans 10% des cancers de la cavité buccale en inactivant la protéine p53 (13, 14).

I.2.3.2 Expositions professionnelles

Plusieurs types d'activités professionnelles, émettant des poussières où des vapeurs, sont associés à une augmentation du risque de cancer des VADS. L'exposition aux poussières de bois (fosses nasales, sinus) est la plus fréquente, mais on peut également citer les expositions au nickel (sinus, larynx) et à l'amiante (larynx) (15, 16). Certaines activités professionnelles sont également considérées à risque sans que l'agent causal soit identifié (industries du cuir, du pétrole, de l'imprimerie, de l'extraction minière).

I.2.3.3 Prédispositions génétiques

Certaines jeunes personnes non exposées aux facteurs de risques cités précédemment, développent des cancers des VADS, ce qui laisse supposer l'existence d'une prédisposition génétique (17).

1.2.3.4 Facteurs alimentaires

Certains aliments auraient un effet protecteur dans le développement des cancers des VADS. On attribue un tel rôle aux caroténoïdes, aux fruits et aux légumes (18, 19). Inversement, d'autres aliments tels que ceux à base de poissons fumés seraient impliqués dans l'induction des cancers des VADS (particulièrement nasopharynx).

1.2.3.5 Conditions environnementales

Il a été mis en évidence une relation entre un faible niveau d'ensoleillement et la survenue de cancers des VADS qui provient certainement d'un déficit en vitamine D3 dans les populations concernées (20). Ces faits sont toutefois difficiles à interpréter car il existe une inter-relation entre plusieurs facteurs tels que l'alcool-tabagisme, l'alimentation, l'ensoleillement ou la pollution.

1.2.4 Hygiène bucco-dentaire

Un mauvais état bucco-dentaire est habituellement retrouvé chez les patients atteints de tumeurs des VADS. Ce fait semble toutefois corollaire à l'alcool-tabagisme plutôt qu'agent causal de la maladie.

1.3 Diagnostic

1.3.1 Les symptômes

Lorsque le cancer est faiblement évolué, les symptômes restent vagues et n'ont que peu de répercussions sur l'état général du malade. Seul un examen dentaire de routine peut permettre au dentiste de déceler certaines lésions des VADS accessibles (par exemple au niveau des gencives ou de la joue). L'attention est particulière si le patient présente un comportement alcool-tabagique à risque. Lorsqu'ils atteignent les derniers stades de développement, les cancers des VADS engendrent les mêmes symptômes tels que la douleur, l'obstruction des voies aériennes, une diminution de la mobilité de la langue, la formation de fistules, des symptômes oculaires ou des adénopathies cervicales. Il est toutefois possible de localiser un cancer des VADS en fonction des symptômes.

1.3.1.1 Les cancers du larynx

Ils sont caractérisés par des symptômes d'enrouement permanent ou de voix bitonale. Malgré tout, certains cancers tel que le cancer sous-glottique du larynx n'ont pas de symptômes particuliers (3).

1.3.1.2 Les cancers de la cavité orale

Ils ont tous des symptômes communs à savoir une tuméfaction, des douleurs, des ulcères qui ne cicatrisent pas et des changements dans la disposition des dents (3).

1.3.1.3 Les cancers de l'oropharynx et de l'hypopharynx

Ils ne présentent pas de symptôme précoce. Lorsque le cancer évolue, le patient peut parfois ressentir des douleurs au niveau de la gorge ainsi qu'une otalgie (3).

1.3.1.4 Les cancers des fosses nasales et des sinus de la face

Ils sont révélés par des sinusites récidivantes, l'obstruction des voies nasales, l'épistaxie, un gonflement douloureux de la face, une exophtalmie ou encore par la perte des molaires (3).

1.3.1.5 Les cancers du nasopharynx

Ils sont parmi les seuls cancers des VADS non liés aux facteurs alcool-tabagiques. Les deux sexes sont atteints à tous les âges. En fait, il est associé à l'infection par le virus d'Epstein-Bar et à des groupes à risques localisés en Asie du Sud-Est ayant une prédisposition génétique définie par un antigène du groupe HLA.

Les patients présentent des symptômes d'obstruction nasale, des saignements de nez, ou encore des otites. Le diagnostic, souvent tardif, met en évidence, pour les formes évoluées, des envahissements osseux ou nerveux, des adénopathies cervicales hautes et postérieures, et dans 75% des cas un envahissement ganglionnaire (3).

1.3.2 Pathologies associées

Les patients atteints d'un cancer des VADS présentent souvent des pathologies associées ayant pour cause la consommation d'alcool, de tabac, une mauvaise hygiène dentaire ou l'inhalation de substances cancérigènes. On constate des maladies du foie, du cœur et des

poumons ainsi que des déficits neurologiques, vasculaires et métaboliques. Les mauvaises habitudes alimentaires et les difficultés de mastication entraînent une malnutrition préjudiciable au malade.

Si ces pathologies associées ne sont pas guéries et qu'un bon état général n'est pas rétabli, les traitements anticancéreux risquent de ne pas être bien tolérés. Ces maladies seraient responsables de 30% de décès par cancers des VADS.

I.3.3 Investigations cliniques

La recherche de lésions et d'extensions ganglionnaires doit se faire de manière rigoureuse et précise, elle comporte l'examen de la partie visible de la muqueuse buccale, de la langue et une palpation du plancher de la bouche et du cou. Une biopsie s'impose lorsqu'une leuco ou une érythroplasie est décelée. La recherche de lésions cancéreuses dans les parties visuellement peu accessibles telles que le pharynx, le larynx, l'œsophage et les bronches s'effectue par endoscopie sous anesthésie. Les modifications anatomiques sont notées et une biopsie effectuée. Ces examens permettent de définir l'étendue du cancer et d'éventuels sites primitifs secondaires de tumeur. L'examen en profondeur des tumeurs, réalisé par scanographie, IRM et échographie, aide à la décision thérapeutique (21, 22).

I.4 Classifications

I.4.1 Localisations anatomiques

Le terme VADS regroupe de nombreux sites anatomiques dont les principaux sont la cavité orale, la cavité nasale, le larynx et le pharynx (composé du nasopharynx, de l'oropharynx et de l'hypopharynx). La Figure 2 résume les différentes localisations. Les tumeurs des glandes salivaires, de la thyroïde et de l'œsophage ne sont pas prises en compte dans les tumeurs des VADS.

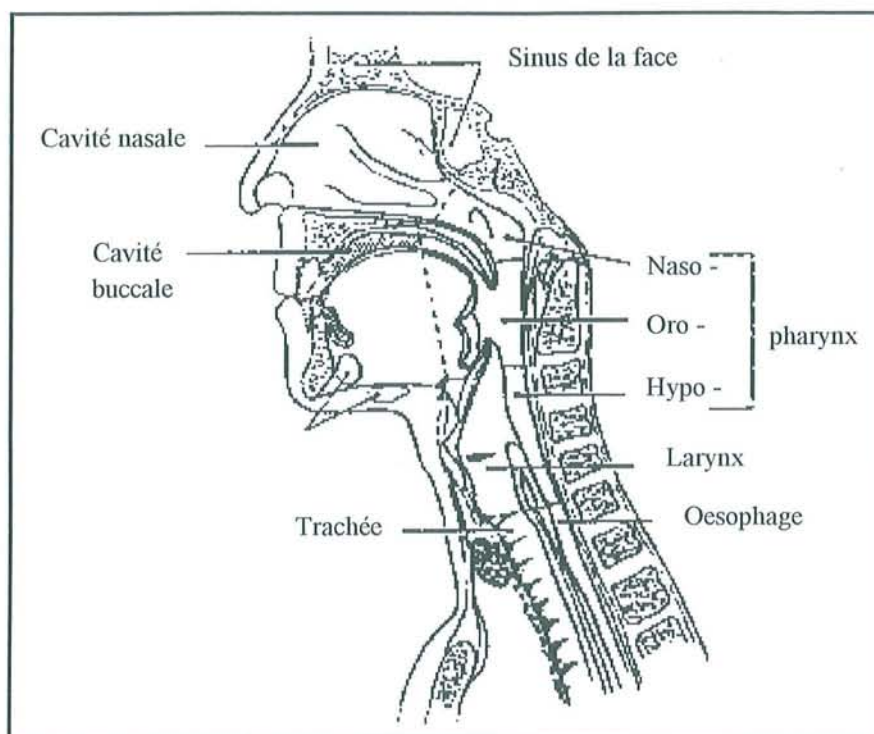


Figure 2 : Coupe sagittale et localisation anatomique des voies aéro-digestives supérieures.

I.4.2 TNM

Afin d’instaurer un langage commun entre les cliniciens, une classification appelée TNM a été adoptée par l’American Joint Committee on Cancer (23). Elle permet d’évaluer le développement tumoral, et l’envahissement métastatique local et distal. La classification des adénopathies régionales (N) et des métastases à distance (M) est valable pour toutes les localisations tumorales des VADS. Toutefois, la description du développement et de l’envahissement tumoral (T) varie selon la localisation du site de la tumeur primitive. Généralement T1, T2 et T3 décrivent l’évolution de la taille de la tumeur, alors que T4 décrit l’envahissement des structures adjacentes. Malgré tout, deux cancers des VADS sur trois sont décrits par la classification TNM du Tableau 2.

Tableau 2 : Classification TNM des cancers des VADS selon l'AJCC, 1988.

TNM	DESCRIPTION DES LÉSIONS
TX	La tumeur primaire ne peut pas être définie
TO	Pas de preuve d'une tumeur primaire
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur < 2 cm dans sa plus grande dimension
T2	2 < taille de la tumeur < 4 cm
T3	Tumeur > 4 cm
T4	La tumeur envahit les structures adjacentes (peau, sinus maxillaires)
NX	Les ganglions lymphatiques ne peuvent pas être définis
N0	Pas de métastase des ganglions lymphatiques
N1	Métastases d'un seul ganglion lymphatique (< 3 cm)
N2	
	a Métastase homo latérale d'un seul ganglion lymph. (3 < taille < 6 cm)
	b Métastases homo latérales des ganglions lymph. (< 6 cm)
	c Métastases bilatérales des ganglions lymph. (< 6 cm)
N3	Métastases des ganglions lymph. (> 6 cm)
MX	La présence de métastases distantes ne peut pas être définie
M0	Pas de preuve de métastases distantes
M1	Métastases distantes

I.4.3 Classification clinique

La classification TNM permet elle-même de décrire une classification des stades cliniques (Tableau 3) valable pour tous les cancers des VADS.

Tableau 3 : Equivalence entre stades cliniques et TNM des cancers des VADS.

STADES CLINIQUES	STADES TNM
0	Tis, N0, M0
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T3, N0, M0
	T1-3, N1, M0
IV	T4, N0-1, M0
	Tis-4, N2-3, M0
	Tis-4, N0-3, M1

I.4.4 Anatomo-pathologie

Un tissu cancéreux se compose des cellules cancéreuses proprement dites et du stroma (tissu de soutien). La différenciation de la tumeur, c'est à dire son aspect architectural proche ou éloigné du tissu d'origine est un élément pronostique important. Le degré de malignité, déterminé par l'index mitotique de la tumeur (nombre de mitoses par champ microscopique), a parfois une valeur pronostique (22).

Les anatomo-pathologistes distinguent l'origine tissulaire de la tumeur. Dans le cas des cancers des VADS, ceux-ci sont habituellement des carcinomes épidermoïdes, les lymphomes et les sarcomes demeurant rares.

I.4.4.1 Les tumeurs épithéliales (21)

Les carcinomes épidermoïdes représentent la forme la plus fréquemment rencontrée. Leur degré de différenciation et de kératinisation est très variable.

Les autres carcinomes sont représentés par les carcinomes indifférenciés que l'on rencontre surtout au niveau des amygdales et du rhino-pharynx ; les carcinomes glandulaires qui se développent à partir de l'épithélium cylindrique de la muqueuse respiratoire ou des glandes salivaires ; les carcinomes neuro-endocrines.

I.4.4.2 Les tumeurs non épithéliales (21)

Elles sont représentées par les mélanomes malins surtout présents au niveau de la muqueuse buccale et nasale, les sarcomes qui sont des cancers du tissu conjonctif, les lymphomes malins généralement situés dans l'oropharynx et les cavités naso-sinusiennes et les granulomes malins.

I.5 Traitements

Les traitements ont beaucoup progressé au cours de ce siècle, notamment ces dernières années avec l'extension des indications chirurgicales, la maîtrise fine de la radiothérapie et l'apparition de la chimiothérapie. Mais le pronostic vital des patients, à stade égal, a peu évolué.

Le traitement de choix des cancers des VADS est la radiothérapie. En effet, ce sont majoritairement des carcinomes épidermoïdes qui ont la faculté d'être radio-curables lorsque la tumeur est bien délimitée et peut être fortement irradiée. Lorsque la radiothérapie ne donne pas les résultats escomptés, la tumeur peut être considérée comme radio-résistante et conduire à des récives précoces. La chirurgie reste l'un des moyens pour parvenir à une guérison.

I.5.1 Chirurgie

L'utilisation de lambeaux pédiculés puis anastomosés a permis la reconstitution chirurgicale et ainsi d'étendre les indications aux tumeurs considérées jusqu'alors hors des ressources chirurgicales. Ces techniques ont ainsi permis la réalisation d'exérèses étendues, mais elles ont aussi modifié la morbidité de certains actes chirurgicaux tout en offrant une amélioration des suites fonctionnelles et esthétiques. Malgré tout, certaines indications telles que le nasopharynx et la base du crâne restent inaccessibles. L'extension tumorale peut également être un frein au traitement chirurgical (22).

Les nouvelles modalités de traitement, dont les associations avec la chimiothérapie et la radiothérapie, ainsi que la prise en compte de l'amélioration de la qualité de vie, poussent actuellement les équipes médicales à orienter les traitements vers un acte chirurgical moins mutilant, permettant par exemple la conservation du larynx (21).

I.5.2 Radiothérapie

I.5.2.1 Historique

Les rayons X, découverts par Röntgen en 1895, ont été utilisés pour la première fois par Despeignes en 1896 dans un but de traitement des cancers. Toutefois la première guérison d'un cancer du larynx par Röntgenthérapie sera obtenue en 1903. Le radium, découvert par Pierre et Marie Curie en 1898, ne sera utilisé médicalement que 10 ans plus tard. Le principe de l'irradiation fractionnée sera décrit en 1920 par Regaud et Coutard. Il faudra attendre 1962 pour que les rayons X à haute énergie soient utilisés. L'une des dernières évolutions majeures est l'avènement à la fin des années 80 de la radiothérapie conformationnelle permettant de cibler le volume tumoral (22).

1.5.2.2 Principe

La radiothérapie repose sur l'effet cellulaire létal des radiations ionisantes. Les constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides, etc...) sont altérés par l'intermédiaire d'espèces réactives de l'oxygène générées par les radiations ou par leur action directe.

Une radiothérapie à visée curative a pour but d'assurer le contrôle et la guérison locale ou locorégionale de la tumeur. Mais elle peut également être palliative voire symptomatique. La radiothérapie est le plus souvent réalisée en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie.

La dosimétrie et le volume d'irradiation sont déterminés après simulation. Ce dernier comporte la zone tumorale ainsi qu'une marge de sécurité tout en respectant les nombreux organes sensibles des VADS. Le schéma d'irradiation classique des tumeurs des VADS comporte 5 séances de 2 Grays (Gy) par semaine suivant un étalement de 5 à 7 semaines soit une dose totale de 50 à 75 Gy (22).

1.5.2.3 Curiethérapie

Elle consiste à irradier localement une tumeur afin de limiter les effets secondaires sur les tissus sains. Un ou plusieurs fils d'iridium 192 placés dans des tubes souples sont mis en place chirurgicalement afin de circonscrire l'irradiation du volume tumoral. La durée du traitement varie de 1 à 7 jours selon la dose à délivrer. Les principales indications dans les cancers des VADS concernent les tumeurs facilement accessibles par voie externe (lèvres, joue, langue, amygdales...) (22).

1.5.3 Chimiothérapie

1.5.3.1 Historique

La chimiothérapie a longtemps été limitée aux traitements de cancers évolués ou ayant récidivé. De plus les premiers essais réalisés avec le cyclophosphamide, le méthotrexate ou la bléomycine en monochimiothérapie n'ont pas donné de résultat encourageant. C'est l'association, dans les années 70, des sels de platine (cis-platine) au 5-fluoro-uracile qui a permis d'obtenir des taux de réponse importants (22, 24).

I.5.3.2 Principe

La chimiothérapie repose sur l'effet cytostatique (arrêt du cycle cellulaire) ou cytotoxique (mort cellulaire) des drogues sur les cellules.

I.5.3.3 Traitements

La chimiothérapie est généralement utilisée pour améliorer la survie des patients porteurs de cancers primitifs des VADS. Toutefois, elle est préconisée pour les cancers du larynx en association avec la radiothérapie afin de conserver l'organe (25). Pour les cancers métastasés ou chroniques, généralement incurables, la chimiothérapie à base de bléomycine, 5-fluorouracile, doxorubicine, cisplatine, méthotrexate et taxol (26) est prescrite afin de prolonger et soulager l'existence des patients.

Les principaux produits utilisés dans les traitements des cancers des VADS présentent des effets secondaires à court terme tels que la perte des cheveux ou la toxicité hématologique.

I.5.4 Associations de traitements

Devant l'efficacité incomplète des traitements classiques, des associations ont été proposées. La combinaison des traitements permet d'attaquer les cellules tumorales selon plusieurs voies métaboliques.

I.5.4.1 Radio-chimiothérapie concomitante

Le principe de cette association repose sur la radiosensibilisation des cellules cancéreuses par chimiothérapie. Certains produits cytostatiques (taxanes) agissent en bloquant le cycle cellulaire dans les phases radiosensibles telle que la mitose. D'autres (gemcitabine) empêchent la réparation des cassures de l'ADN dues aux radiations ionisantes car les produits bloquent les systèmes de réparation (27). Toutefois certaines associations ne donnent pas les résultats escomptés, ceci étant probablement dû à des résistances croisées ayant pour origine l'hypoxie tumorale ou encore le taux intracellulaire de glutathion (28, 29). L'application de ces protocoles augmente la toxicité sur les tissus sains notamment au niveau des muqueuses des VADS. Les voies de recherche s'orientent actuellement vers l'utilisation de la gemcitabine et de la fludarabine (30, 31).

1.5.4.2 Chimiothérapie néo-adjuvante

Il s'agit de réduire le volume tumoral avant chirurgie ou radiothérapie. Cette réduction ne modifie pas le volume d'exérèse ou d'irradiation car des cellules cancéreuses peuvent subsister en périphérie. L'association cis-platine-5-fluoro-uracile (CDDP/5-FU) est actuellement la plus utilisée (32).

1.5.4.3 Association radiothérapie-chirurgie

C'est la méthode de référence pour le traitement des cancers des VADS. La séquence habituelle consiste à réaliser une exérèse complète de la tumeur suivie d'une radiothérapie permettant d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles. La séquence inverse n'est pas utilisée car la chirurgie en terrain irradié pose fréquemment des difficultés per-opératoires (22).

1.5.5 Traitements des différentes formes de cancers des VADS (3, 21)

Trente pour cent des patients se présentent avec des tumeurs de stade T1 dont l'éradication est obtenue dans 80% des cas par la radiothérapie seule, ou T2 pour lesquelles la stérilisation tumorale est obtenue dans 60% des cas. Les autres ont des cancers plus évolués dont le pronostic est mauvais (30% de guérison pour les tumeurs de stade T3 et au-delà). Ces derniers ne peuvent guérir sans radiothérapie et l'exérèse de tout ou partie d'un organe conduisant ainsi à de sévères séquelles. Les états précancéreux sont traités, lorsqu'ils sont accessibles, par lasers CO₂, Argon ou YAG.

1.5.5.1 Nasopharynx

Soixante à 90% des patients ont également des métastases ganglionnaires. Ces cancers sont radiosensibles ce qui impose une radiothérapie à hautes doses. La survie à 5 ans est comprise entre 37 et 62%.

1.5.5.2 Oropharynx

La radiothérapie ou la chirurgie permettent d'obtenir 80% de contrôle local pour les cancers de l'oropharynx au stades T1 et T2. Mais la chirurgie occasionne de sévères séquelles physiques (33). Dix pour cent des patients développent des nécroses. La survie à 5 ans est de 60%.

1.5.5.3 Hypopharynx

Les lésions de stades T1 et T2 sont traitées par radiothérapie ou par ablation partielle du larynx et du pharynx. Le taux de survie à 5 ans atteint 60%. Généralement, le pronostic est très mauvais pour les tumeurs plus développées (30 % de contrôle local à 3 ans).

1.5.5.4 Larynx

La radiothérapie permet de guérir 80 à 98% des tumeurs de stade T1 et T2. Les lésions sont traitées conjointement par la chirurgie et la radiothérapie, le contrôle local peut ainsi atteindre 83%. Les complications sont quelques fois l'altération ou la perte de la voix, une chondronécrose ou l'apparition d'œdème laryngé récidivant.

1.5.5.5 Cavité buccale

Ils surviennent le plus souvent au niveau de la langue et du plancher de la bouche. Le choix s'effectue entre la chirurgie et la radiothérapie afin d'aboutir à un contrôle local compris entre 80 et 90% pour les tumeurs T1 et 50 à 80% pour les T2.

1.5.5.6 Les adénopathies ganglionnaires

Elles sont traitées par radiothérapie ou par chirurgie selon leur localisation, leur développement et l'origine de la tumeur primitive.

1.5.6 Conséquences

1.5.6.1 Effets secondaires

Les conséquences des traitements sur les patients dépendent des sites d'irradiation et d'exérèse. Les symptômes les plus généralement rapportés concernent la perte du goût, des difficultés à avaler, une suppression de la salivation si les glandes salivaires ont été irradiées, une fibrose des tissus mous ou une nécrose des os. Trente à 40% des patients présentent des dysfonctionnements biologiques thyroïdiens. Les patients qui survivent à la maladie se retrouvent parfois avec de lourds handicaps tels qu'une perte de la parole ou un dysfonctionnement des fonctions buccales ou hormonales, certains sont défigurés. L'après traitement est donc souvent synonyme de difficultés psychologiques et physiques (3, 21).

I.5.6.2 Récidives

Les récidives ou évolutions tumorales apparaissent dans les 2 à 3 ans après le traitement et touchent 15 à 20% des patients. Les traitements de rattrapage sont peu efficaces notamment du fait de leur radiorésistance. Celle-ci peut être due à la sélection lors de l'irradiation de cellules intrinsèquement radiorésistantes mais les radiations ionisantes peuvent également entraîner des modifications de l'expression génique induisant des mécanismes de résistance acquise.

RESUME

En France, l'incidence (7,1%) et la mortalité (5,2%) des cancers des VADS sont élevés notamment chez les hommes (11,1% et 7,6%) exposés aux principaux facteurs de risques bien identifiés que sont le tabac et l'alcool. La classification TNM ainsi que l'examen anatomo-pathologique des tumeurs (30% de T1/T2) permettent de proposer des traitements adaptés, basés sur la chirurgie, la radiothérapie ou leur association avec ou sans chimiothérapie (habituellement 5-FU/CDDP). Les effets secondaires sont souvent invalidants. Quinze à 20 % des patients présentent des récidives majoritairement radiorésistantes dans les 2 à 3 ans qui suivent le traitement.

Chapitre II

Bases radiobiologiques.

II Bases radiobiologiques

II.1 Les rayonnements ionisants

Un rayonnement est dit ionisant lorsque son énergie est suffisante pour arracher un électron orbital à un atome ou une molécule. Dans la matière vivante cette énergie est de 12,4 eV. Les doses de radiations sont définies par l'énergie absorbée et se mesurent en Grays (Gy) ($1\text{Gy} = 1\text{ J/kg}$).

L'influence d'un rayonnement ionisant sur la matière vivante est décrite par le Transfert d'Energie Linéique (TEL) qui est la quantité d'énergie transférée à la matière par unité de longueur ($\text{KeV}/\mu\text{m}$). Le classement selon le TEL est le suivant $\alpha > \beta^+$, $n > \beta^-$, X, γ .

On distingue les rayonnements ionisants chargés des rayonnements ionisants neutres (voir Tableau 4).

II.1.1 Rayonnements chargés

Les rayonnements chargés sont particuliers et directement ionisants. Ainsi, les rayonnements α sont des noyaux d'hélium (${}^4_2\text{He}$) dont l'énergie est comprise entre 1 et 10 MeV. Leur parcours dans les tissus biologiques est de quelques micromètres car les deux charges positives induisent une forte absorption.

Les rayonnements β sont des électrons positifs (e^+) ou négatifs (e^-). Lors d'une irradiation, la profondeur de pénétration peut atteindre quelques millimètres. Leur faible masse est facilement déviée surtout lorsque l'énergie diminue. Les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4.

II.1.2 Neutres

On distingue 3 types de rayonnements neutres.

Les neutrons sont des particules qui interagissent principalement avec l'hydrogène. Leur énergie est comprise de quelques MeV à quelques dizaines de MeV.

Les rayons X sont un rayonnement électromagnétique photonique émis par les atomes soumis à un bombardement de particules. Ils sont fortement pénétrants dans les tissus biologiques.

Les rayons gamma, électromagnétiques et photoniques, sont émis lors d'une transition nucléaire dont l'énergie est comprise de quelques KeV à 1 MeV. Ces rayonnements sont fortement pénétrants dans les tissus biologiques.

Tableau 4 : Propriétés des différents rayonnements ionisants

Rayonnement	Charge	Nature	Energie	Parcours	TEL
α	++	Noyaux d'hélium	$1 < E < 10 \text{ MeV}$	$\rho > \mu\text{m}$	+++
β^+	+	électrons positifs		$\mu\text{m} < \rho < \text{mm}$	++
β^-	-	électrons négatifs		$\mu\text{m} < \rho < \text{mm}$	+
Neutrons	neutre	neutrons	$qq\text{s MeV} < E < qq\text{s } 10 \text{ MeV}$	beaucoup	++
X	neutre	électromagnétique		beaucoup	+
γ	neutre	électromagnétique	$qq\text{s KeV} < E < 1 \text{ MeV}$	beaucoup	+

II.2 Modèles

C'est en 1955 que Puck et Marcus ont cultivé les premières cellules isolées de la lignée cellulaire humaine HeLa, et leur première courbe de survie, établie à partir de ces cellules, *in vitro*, publiée en 1956 (34), a suscité un grand intérêt dans le monde de la radiobiologie. Cette publication fut suivie, quelques années plus tard, par la publication de courbes de survie cellulaire obtenues, *in vivo*, d'abord pour des cellules cancéreuses (35), ensuite pour différents types de cellules normales : cellules souches de la moelle osseuse (8), les chondroblastes (36), de la peau (37), et les cellules souches de la muqueuse intestinale (38). Ces observations marquent le point de départ de la radiobiologie cellulaire quantitative qui a contribué de manière importante à la compréhension des mécanismes d'action de la radiothérapie anticancéreuse (39).

Des modèles théoriques traduits par des expressions mathématiques et illustrant la létalité cellulaire (courbe de survie) ont été décrits. Ces courbes de survie cellulaire sont habituellement présentées en coordonnées semi-logarithmiques et expriment la relation entre la survie cellulaire (S) et la dose d'irradiation absorbée (D).

II.2.1 Une cible à un coup

Ce modèle le plus simple qui correspond à une relation exponentielle et se traduit par l'Equation II-1 suivante :

$$\text{Equation II-1} \quad SF = e^{-\alpha D} \quad \text{ou} \quad S = e^{-D/D_0}$$

Le paramètre D_0 ($1/\alpha$), appelé dose létale moyenne, représente la dose nécessaire pour réduire la survie d'un facteur de $1/e$ soit de 37 %; il illustre la radiosensibilité des cellules et la pente de la partie exponentielle de la courbe de survie. D_0 est d'autant plus faible (et α d'autant plus élevé) que la radiosensibilité est plus élevée ; théoriquement, pour les cellules de mammifères, D_0 est de l'ordre de 1 à quelques Gy.

Ce modèle de courbe de survie exponentielle, illustré par la Figure 3-A, ne s'observe que pour quelques types cellulaires, les virus, les bactéries, les cellules de souches médullaires ou les cellules en mitose et en phase G_2 (40). De manière générale, le modèle à "une cible à un coup" où la cible répond à la loi du tout ou rien (la lésion "directement létale" est un phénomène de tout ou rien : la cellule est tuée ou intacte) permet de représenter la létalité cellulaire provoquée par "des lésions létales d'emblée" et interviendra dans des modèles plus complexes.

II.2.2 n cibles à un coup

De façon plus courante pour les cellules de mammifères irradiées, une relation sigmoïde entre le taux de survie et la dose absorbée est observée. Les cellules contiennent n "cibles" d'égales dimensions, chaque cible est inactivée par "un coup au but" et la mort de la cellule nécessite l'inactivation de la totalité des n cibles. Ce modèle est défini par l'Equation II-2 suivante :

$$\text{Equation II-2} \quad SF = 1 - \left(1 - e^{-D/D_0}\right)^n$$

La sigmoïde résultante (Figure 3-B) présente une partie incurvée, appelée "épaulement", suivie d'une partie exponentielle.

Elle est définie par deux paramètres qui sont la dose létale moyenne D_0 (qui réduit la population cellulaire de 37 % dans la partie exponentielle de la courbe), et le nombre d'extrapolation n (obtenu en prolongeant la partie exponentielle de la courbe jusqu'à son intersection avec l'axe des ordonnées). Le nombre d'extrapolation caractérise l'importance de

l'épaulement initial de la courbe et correspond théoriquement au nombre de "cibles" de la cellule.

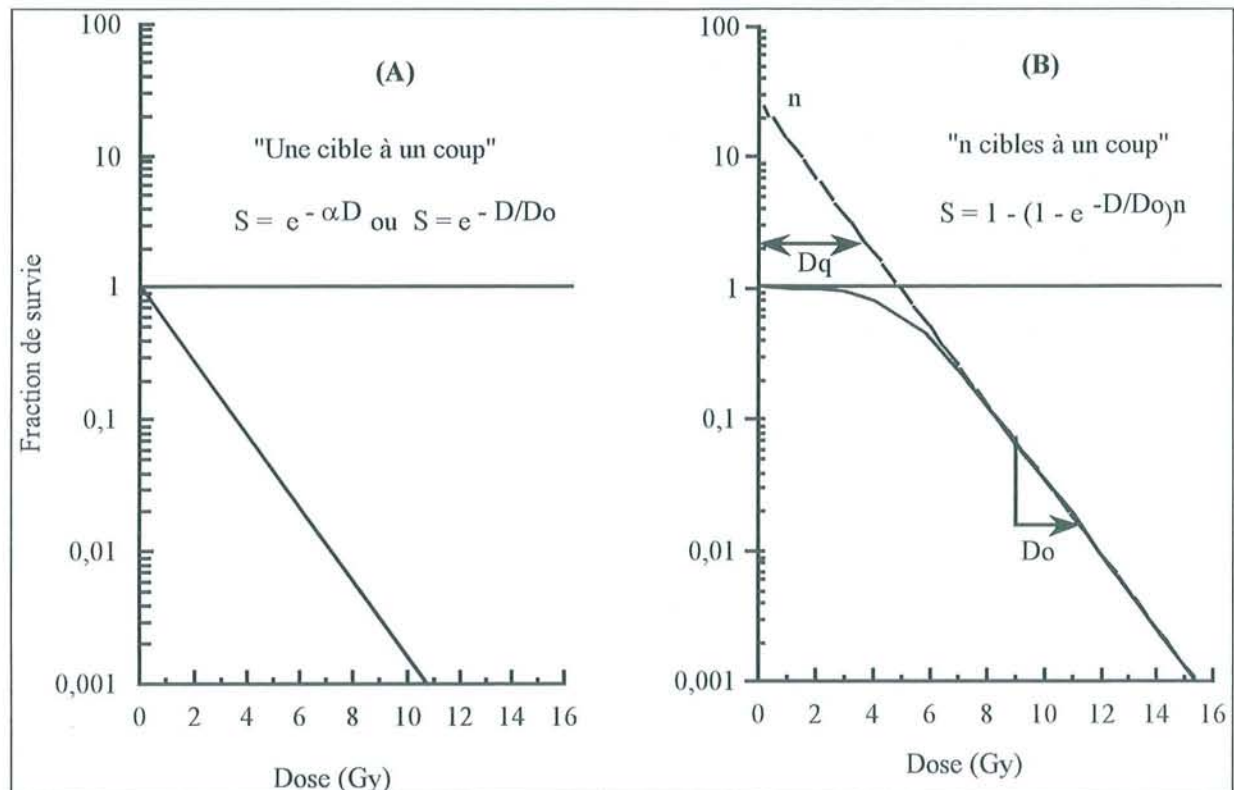


Figure 3: Courbes de survie cellulaire. Le taux de survie cellulaire est déterminé expérimentalement pour différentes doses, la courbe passant au mieux par ces points est tracée. Le taux de survie S est représenté en échelle logarithmique. (A) : Courbe de survie exponentielle (modèle à "une cible à un coup") réduite à une droite dans la représentation logarithmique. (B) : Courbe de survie sigmoïde (modèle à "n cibles à un coup") qui présente une partie incurvée (épaulement) suivie d'une partie exponentielle. La dose létale moyenne (D_0) désigne la dose qui dans la partie exponentielle réduit la fraction de cellules de $1/e$ soit 37%. Le nombre d'extrapolation (n) correspond au nombre de cibles. D_q est la dose "quasi-seuil" et représente la dose "perdue" au début d'une séance d'irradiation.

Dans la région de l'épaulement, pour des doses faibles, les radiations absorbées paraissent moins "efficaces" que dans la partie exponentielle de la courbe. C'est pourquoi un troisième

paramètre dans ce modèle est utilisé, la dose "quasi seuil" ou D_q , qui est obtenue en prolongeant la partie exponentielle de la courbe jusqu'à son intersection avec l'horizontale correspondant au taux de survie de 100%. Cette dose est considérée comme la dose "dépensée inutilement" du fait de l'existence de l'épaulement. D_q peut être calculé à partir des paramètres D_0 et n par l'Equation II-3 :

$$\text{Equation II-3} \quad D_q = D_0 \cdot \text{Log } n$$

II.2.3 Modèle à 2 composantes

L'inconvénient majeur du modèle à "n cibles à un coup", illustré par la Figure 4 est qu'il ne peut décrire correctement la dose-réponse à de faibles doses d'irradiation où l'on observe un épaulement "plat" dans la partie initiale de la courbe de survie, et des différences sont observées entre les courbes de survie cellulaires obtenues *in vitro* et *in vivo* (41). Autrement dit, ce modèle n'est pas adapté à l'étude des effets ionisants sur les cellules à faible dose, un certain nombre d'observations montrent des discordances entre les résultats expérimentaux et les prévisions basées sur ce modèle. Ceci a conduit à proposer un modèle un peu plus complexe dans lequel on distingue deux mécanismes pouvant entraîner la mort cellulaire : les lésions létales d'emblée (e^{-D/D_0}) et l'accumulation de lésions sublétales. Ce modèle est représenté par l'Equation II-4 :

$$\text{Equation II-4} \quad SF = 1 - \left(1 - e^{-D/nD_0}\right)^n$$

L'équation résultante de la courbe de survie illustrée par la Figure 4 représente le modèle à deux composantes. Elle est définie par l'Equation II-5 :

$$\text{Equation II-5} \quad S = \left(e^{-D/{}_1D_0}\right) \left[1 - \left(1 - e^{-D/{}_nD_0}\right)^n\right]$$

Dans cette formule, en plus des paramètres D_0 , D_q et n , cette courbe est définie par les paramètres ${}_1D_0$ et ${}_nD_0$ qui représentent respectivement, la dose létale moyenne pour les lésions létales d'emblée et l'accumulation des lésions sublétales. De plus, ${}_1D_0$ fixe la pente initiale de la courbe, par exemple la dose nécessaire dans la région des faibles doses à réduire le taux de survie de 1 à 0,37.

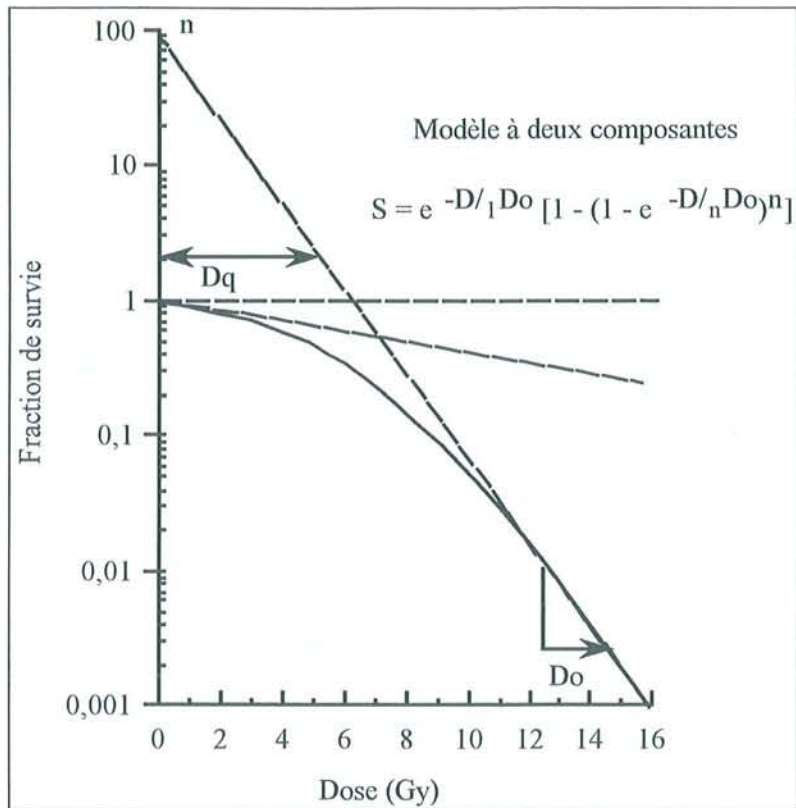


Figure 4 : Courbe de survie cellulaire correspondant au modèle à deux composantes. Cette courbe sigmoïde présente un épaulement et une partie exponentielle dont la pente est donnée par $(1/1Do+1/nDo)$. Cette courbe diffère essentiellement à l'origine ou dans la région de l'épaulement : alors que la tangente à l'origine est horizontale dans le modèle à "n cibles à un coup", elle présente dans ce modèle à deux composantes une pente définie par $-1/Do$ qui est d'autant plus marquée que la composante létale d'emblée est plus importante.

II.2.4 Linéaire et Quadratique

Il est actuellement admis que les courbes de survie des cellules de mammifères présentent une partie initiale incurvée ("épaulement") suivie d'une partie exponentielle (ou quasi-exponentielle). L'épaulement initial suggère l'existence de lésions sublétales dont l'accumulation conduit à la mort cellulaire. Par ailleurs, Elkind et Sutton (42), en pratiquant des irradiations fractionnées, ont montré que ces lésions sublétales se réparaient très vite, en quelques heures, par contre, elles devenaient létales si une deuxième dose d'irradiation leur était infligée immédiatement. L'existence d'une zone de plus grande sensibilité aux faibles doses ($<1\text{Gy}$) a été montrée (43).

Un des problèmes les plus importants est la pente de la partie initiale de la courbe de survie. La meilleure description des relations dose-réponse dans la région des faibles doses d'irradiation est définie par le modèle linéaire et quadratique (LQ) (44). Le formalisme de ce modèle a été primitivement décrit pour la formation d'aberrations chromosomiques par Lea et Catchside (45) mais son application pour l'effet de radiations a été plus tardive et une revue historique a été publiée par Thames et Hendry (46). Ce modèle LQ est défini par l'Equation II-6 :

$$\text{Equation II-6} \quad SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Cette expression découle de la "Dual radiation action theory" (47) et comprend une "composante linéaire" (α) et une "composante quadratique" (β) (Figure 5-A). La pente initiale (régions des faibles doses) est déterminée par la valeur α et la partie distale (régions des hautes doses) de la courbe de survie par la valeur β . La valeur d' α est d'autant plus faible (et par conséquent, la valeur de β d'autant plus élevée) que la radiorésistance des cellules est plus importante et inversement. Les valeurs courantes de α se situent entre 0,3 Gy⁻¹ (faible radiosensibilité) et 0,6 Gy⁻¹ (sensibilité élevée) et pour β entre 0,02 et 0,07 Gy⁻². Pour les doses faibles (nettement inférieures à α/β), le terme $e^{-\alpha D}$ est dominant et le taux de survie est gouverné essentiellement par le coefficient α . Ce modèle apparaît être plus approprié pour définir les courbes des survie que les modèles dérivant de la théorie des cibles (48).

Ce modèle LQ d'après certains auteurs, rend mieux compte des effets observés en clinique radiothérapique, et en particulier dans la distinction des effets précoces et tardifs et dans la reconnaissance du rôle important de la dose de fractionnement (44). De plus, les modifications apportées par Thames (49) à ce modèle permettent d'inclure l'influence de l'intervalle de temps entre les fractions successives.

Interviennent à ce niveau les valeurs du rapport α/β pour de très nombreux tissus sains et tumoraux. Ce rapport rend compte de la plus ou moins grande sensibilité d'un tissu aux modifications de la dose par fraction. Les tissus à réponse lente, au niveau desquels s'observent les effets secondaires tardifs, sont caractérisés par une sensibilité très grande au fractionnement (rapport α/β bas, de l'ordre de 2 à 3 Gy) et inversement pour les effets précoces ou les tissus à réponse rapide (rapport α/β élevé, de l'ordre de 10 Gy) (44).

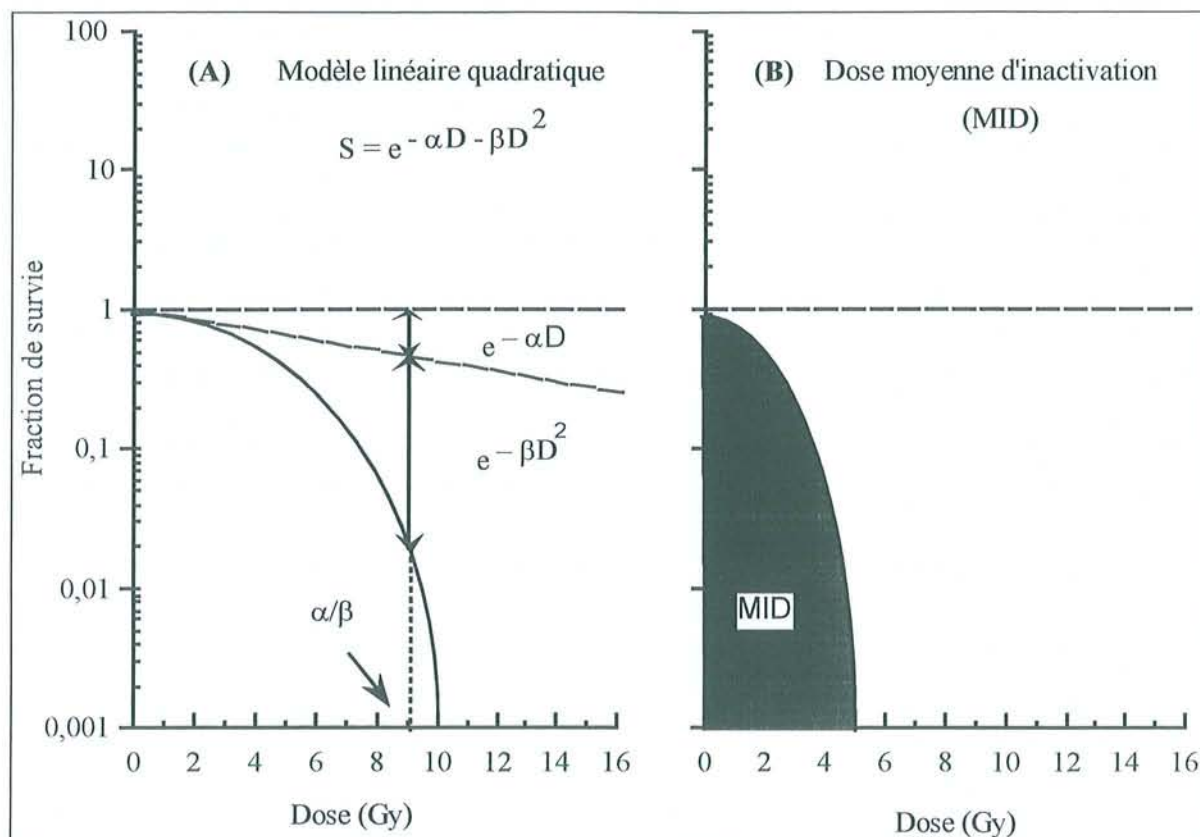


Figure 5: (A) : Le modèle linéaire et quadratique. La mort cellulaire peut être produite par deux types d'événements: des lésions directement létales qui conduisent à un taux de survie $e^{-\alpha D}$ (ou $e^{-\alpha D/D_0}$); l'accumulation de lésions sublétales représentée dans l'expression linéaire quadratique par $e^{-\beta D}$. (B) : La dose moyenne d'inactivation représentée par l'aire sous la courbe de survie et calculée à partir du modèle LQ.

Ce modèle linéaire et quadratique, bien que largement utilisé (50), présente cependant quelques limitations importantes. Il ne prend pas en compte la cinétique de la prolifération tumorale (par exemple le temps de cycle), il n'exprime pas la radiosensibilité absolue déterminant le niveau de dose totale nécessaire pour éradiquer une tumeur donnée ou tolérable par un tissu sain particulier (44). La fraction de survie à 2 Gy a été choisie de façon empirique et basée sur le fait que 2 Gy était la dose par fraction la plus souvent employée en radiothérapie clinique ; la valeur de ce choix a d'ailleurs été démontrée par Deacon *et al.*(51). Cependant, le niveau de survie à 2 Gy ne caractérise pas la radiosensibilité de toutes les cellules d'une population hétérogène, par conséquent, il existerait un doute quant à sa

prédiction dans la réponse clinique (52). Néanmoins, ce modèle LQ, comparé à d'autres plus complexes, demeure un modèle de choix.

De ce modèle LQ, Fertil *et al.* (53) ont déduit un nouveau paramètre, la dose moyenne d'inactivation (MID), dont le concept a été introduit par Kellerer et Hug en 1972 (47). Ils préconisent ce paramètre comme une mesure de la radiosensibilité intrinsèque des cellules humaines. Cette MID représente l'aire sous la courbe de survie du modèle LQ (Figure 5-B) et elle est significativement influencée par les fractions de survie obtenues entre 1 et 3 Gy (53, 54). Ce paramètre, MID, peut alors être utilisé si le choix de la SF₂ ne satisfait pas.

II.2.5 Validité des modèles et des paramètres radiobiologiques

De tous ces modèles de courbes de survie, seul le modèle linéaire et quadratique est en mesure d'évaluer la radiosensibilité cellulaire dans les régions des faibles doses par l'intermédiaire du paramètre α qui représente la pente initiale de la courbe et qui rend compte de la capacité cellulaire à réparer les dommages sublétaux (54). Par ailleurs, de ce modèle, peuvent être calculés, la fraction de survie à 2 Gy (SF₂) et la dose moyenne d'inactivation (MID), qui peuvent, dans une certaine mesure, prédire la radiosensibilité tumorale *in vitro* (44).

Fertil et Malaise (54) ont comparé les paramètres n , D_0 , α , β , MID ainsi que la SF₂ et ont montré que les paramètres n , D_0 du modèle multi-cible, ainsi que le composant quadratique β du modèle LQ, quoique couramment utilisés, sont inappropriés à l'évaluation de la radiosensibilité *in vitro* des lignées cellulaires. En effet, calculés dans la partie distale de la courbe de survie, dans les régions à hautes doses, ils ne peuvent comparer correctement les courbes de survie des différentes lignées cellulaires. A l'opposé, α et MID ainsi que SF₂, calculés à partir des données de la partie initiale de la courbe de survie, sont les paramètres les mieux adaptés pour évaluer la radiosensibilité cellulaire (53, 55). De plus, une compilation et une analyse de courbes de survie publiées a été réalisée par Fertil et Malaise (56) sur des lignées cellulaires tumorales regroupées en 6 différentes catégories histologiques a révélé une corrélation entre les valeurs de α , MID, SF₂ et la réponse clinique.

Cependant, les données cliniques et les expériences *in vitro* sur des cellules établies en lignées ou obtenues à partir de fragments tumoraux, montrent des variations considérables dans l'évaluation de la radiosensibilité intra- et inter-tumorale.

II.2.6 Extension du modèle LQ

Le modèle LQ est souvent considéré comme un modèle empirique qui décrit bien l'allure des courbes de survie. Toutefois, dans les lignées cellulaires sensibles à l'apoptose, l'influence de cette fraction de cellules sur les courbes de survie n'est pas prise compte. Ling *et al.* (57) ont décrit une modification du modèle LQ prenant en compte la fraction apoptotique radio-induite. La fraction apoptotique en fonction de la dose est décrite par l'Equation II-7 :

$$\text{Equation II-7} \quad F_a (1 - e^{-\xi D})$$

D est la dose, ξ est le coefficient d'apoptose due à l'inactivation par les radiations, F_a est la fraction apoptotique maximale.

L'Equation II-8 décrit le modèle linéaire-quadratique après incorporation de la composante apoptotique.

$$\text{Equation II-8} \quad S = [F_a e^{-\xi D} + (1 - F_a)] e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Si la fraction apoptotique F_a est nulle, on retrouve l'équation linéaire-quadratique classique.

RESUME

Les rayonnements ionisants, chargés (α , $\beta^{+/-}$) ou neutres (neutrons, X, γ), ont des énergies variant de quelques KeV à 10 MeV ce qui influence leur parcours dans les tissus.

Plusieurs modèles ont été proposés afin d'ajuster les courbes de survie expérimentales. Au modèle « une cible à un coup », trop simple, a succédé le modèle « n cibles à un coup », inadapté à l'étude des faibles doses, puis le modèle à deux composantes qui décrit correctement les courbes dose-réponse. Actuellement, les paramètres issus du modèle linéaire et quadratique (α =pente à l'origine, β =pente dans la partie distale, SF_2 =fraction de survie à 2 Gy, MID=aire sous la courbe) permettent, dans une certaine mesure, de prédire la radiosensibilité.

Chapitre III

Réponse tissulaire aux radiations ionisantes.

III Réponse tissulaire aux radiations ionisantes.

Les effets radio-induits sont toujours locaux.

III.1 Types de rayonnement

es radiations ionisantes, utilisées dans le traitement d'environ 60% des cancers, provoquent des effets secondaires souvent importants. La radiothérapie fait appel à des types de rayonnement différents (γ , X, neutrons...) et d'énergie variable. Ainsi, pour les rayons γ et X, plus l'énergie délivrée est importante ($5 < e < 25$ MeV), plus la dose maximale absorbée par le tissu biologique se situe en profondeur (100% à 0,5 - 4 cm sous la surface de la peau). Les rayonnement β^- (électrons) ont un rendement en profondeur qui présente une décroissance brutale de la dose absorbée, ce qui n'est pas le cas des rayons X. Donc en fonction du rayonnement utilisé, les effets biologiques notamment tissulaires varient.

III.2 Fractionnement

Le fractionnement utilisé en radiothérapie laisse le temps au tissu sain dont les capacités de réparation et de prolifération sont intactes, de procéder aux réparations des lésions radio-induites. L'effet différentiel ainsi obtenu permet d'augmenter la tolérance du tissu sain à l'irradiation par rapport au tissu tumoral. Ce fractionnement est habituellement de 2 Gy par séance et 5 séances par semaine.

III.3 Tolérance

Chaque tissu a sa propre tolérance aux radiations ionisantes. Ainsi, certains tissus tels que la moelle osseuse, le cristallin et les gonades sont très sensibles aux radiations. Leur tolérance, limitée à 5-12 Gy selon l'organe, impose la mise en place de protections lorsque la zone d'irradiation est proche. D'autres organes, bien que moins sensibles n'en restent pas moins délicats à irradier. Il s'agit de l'encéphale, de la moelle épinière, des reins, du foie, des poumons et de l'intestin dont la dose d'irradiation est comprise entre 25 et 40 Gy selon l'organe et le volume irradié. Enfin, la peau, la vessie, la cavité buccale et le tissu interstitiel permettent des irradiations comprises entre 40 et 80 Gy.

III.4 Lésions

III.4.1 Généralités

Les lésions immédiates, généralement réversibles, sont souvent dues à la mort des cellules à renouvellement rapide (épithélium, cellules hématopoïétiques...). On observe principalement la formation d'œdèmes, d'érythèmes, de fibroses interstitielles et des inflammations.

Les effets tardifs sont les plus invalidants car non réparables. Les cellules souches sont altérées dans les tissus à renouvellement lent alors que les complications au niveau des tissus à renouvellement rapide proviennent souvent de problèmes circulatoires. A long terme (5-10 ans) et de manière aléatoire, des cancers secondaires peuvent apparaître en territoire irradié ainsi que des leucémies aiguës secondaires.

Les effets généraux de l'irradiation sont l'asthénie et l'anorexie qui s'estompent avec le temps. Lorsque la radio-tolérance d'un organe est dépassée, elle conduit à une altération, voire un arrêt de ses fonctions. Ainsi, l'irradiation des gonades conduit à une stérilité définitive, la cataracte caractérise un dépassement de la radio-tolérance du cristallin. Une hypoplasie s'observe après l'irradiation de la moelle osseuse. Les insuffisances vont affecter les organes tels que les reins, le foie, les poumons. Le tissu épithélial et interstitiel subit une fibrose irréversible. L'irradiation de l'intestin provoque des sténoses et des fistules à long terme. Des nécroses peuvent s'observer notamment au niveau de l'encéphale et des os.

III.4.2 VADS

Dans les cancers des VADS, les effets immédiats de l'irradiation sont représentés par l'érythème cutané suite d'une desquamation sèche puis humide. Les énanthèmes, les aphtes, les infections mycosiques, les œsophagites, la dysphonie, l'hyposialie, l'acidité salivaire ou encore la perte de goût par la destruction des papilles gustatives sont des effets survenant pendant l'irradiation. Des traitements symptomatiques, basés sur l'application d'éosine et de pansements antiacides, l'administration d'antifongiques et de corticoïdes permettent d'amoinrir ces réactions sans conséquence à long terme.

Les effets tardifs sont dus à des atrophies et fibroses cutanées, mais aussi à l'hyposialies source de caries dentaires et d'ostéoradionécroses.

III.4.3 Autres tissus

Les irradiations du thorax, dont les réactions précoces sont souvent asymptomatiques (insuffisance médullaire, péricardite, œsophagite), provoquent des effets tardifs tels que des fibroses, des inflammations et des infections pulmonaires ou encore des insuffisances cardiaques.

Les irradiations de l'abdomen provoquent rapidement des diarrhées, spasmes, nausées, vomissements, ulcères qu'il est possible de prévenir partiellement par une adaptation alimentaire. Les effets tardifs sont souvent les mêmes.

Au niveau du pelvis, l'irradiation entraîne des cystalgies, diarrhées, dermites et thrombophlébites. A longue échéance, on constate des fibroses pelviennes, des télangectasies, des fistules et sténoses ainsi que des fractures.

Les méthodes actuelles d'irradiation ainsi que les moyens de prévention mis en place (soins dentaires, protections, alimentation adaptée etc..) permettent de réduire les séquelles invalidantes consécutives à un traitement par radiothérapie.

III.5 Evaluation clinique de la radiosensibilité

Lors du traitement d'un cancer, les radiothérapeutes disposent de plusieurs paramètres cliniques leur permettant d'évaluer la réponse à l'irradiation et d'employer le protocole le mieux adapté. Cette évaluation est basée sur la taille de la tumeur, sa localisation anatomique, l'histologie, la morphologie (bourgeonnante ou infiltrante) mais également sur l'âge et l'état général du patient. Les radiothérapeutes ont ainsi une idée de la radiocurabilité potentielle de différents cancers. Par exemple les carcinomes épidermoïdes du naso-pharynx sont assez peu radiocurables alors que ceux de la région amygdalienne le sont beaucoup plus (si la tumeur est localisée) (21).

La radiosensibilité tumorale ne peut pas actuellement être déterminée de manière simple. Un test prédictif du niveau de radiosensibilité tumorale permettrait d'adapter les doses d'irradiation afin d'augmenter les chances de survie et de diminuer les effets secondaires d'une irradiation. Le seul critère clinique actuellement reconnu est l'évaluation de la réponse tumorale au cours de l'irradiation (généralement à 50 Gy).

Ainsi, la radiosensibilité intrinsèque définie par Fertil et Malaise est une propriété de chaque lignée. La courbe de survie de la lignée étudiée est établie après culture cellulaire *in vitro* dans des conditions optimales puis irradiation. Les deux auteurs préconisent l'emploi des paramètres MID (53), α et SF₂ (56) de la partie initiale de la courbe de survie afin de déterminer la radiosensibilité intrinsèque. Les paramètres caractérisant la partie distale de la courbe ne permettent pas d'estimer la radiosensibilité des lignées étudiées (54, 56). A l'aide des paramètres α , MID et SF₂, Fertil et Malaise ont déterminé la radiosensibilité de plusieurs cultures primaires issues de tumeurs de différentes origines. Une échelle de radiosensibilité a été établie mettant ainsi en évidence la radiorésistance des tumeurs les moins sensibles aux radiations ionisantes.

C'est à partir de 101 courbes de survies publiées et comparées au contrôle local, que Fertil et Malaise (56) ont validé l'utilisation de la SF₂ comme facteur prédictif de la radiosensibilité tumorale. Dans la même publication, il a été démontré que le paramètre α était un bon indicateur de la radiosensibilité. Scalliet *et al.* (44) supposent qu' α serait un facteur pronostic du contrôle local en radiothérapie.

D'autres auteurs ont démontré une corrélation entre la radiosensibilité des cultures primaires et la radiocurabilité de ces mêmes tumeurs (51). Cette corrélation peut toutefois surprendre car les cultures en monocouches ne reproduisent pas les conditions tridimensionnelles des tumeurs *in vivo*. Par contre, l'utilisation de sphéroïdes comme modèle de culture a permis à Griffon *et al.* (58) de démontrer que la SCD₅₀ est liée à l'ID₅₀ et au RSV₂ (Residual Spheroid Volume at 2 Gy). Celui-ci étant lui-même lié aux paramètres α et SF₂. West *et al.* ont montré que dans les carcinomes du col de l'utérus, la radiosensibilité intrinsèque par la SF₂ permet de prédire la réponse au traitement par radiothérapie (59). Dans la même localisation, Sheridan *et al.* ont récemment montré qu'un ratio AI/MI (Apoptotic Index/Mitotic Index) important permet de prédire la survie à 5 ans (60).

Toutefois certains auteurs ont montré une absence de corrélation entre les paramètres de radiosensibilité et le contrôle local clinique ceci dans des cas particuliers de gliomes malins (61) et d'astrocytomes (62). L'utilisation de ces facteurs doit donc se faire de manière prudente.

III.6 Prolifération cellulaire

La réponse tumorale peut être influencée par la prolifération cellulaire.

III.6.1 Etat prolifératif des cellules tumorales

Begg a défini 4 types de cellules présentes dans les tumeurs (63). La fraction principale, dite proliférative, est constituée des cellules en cycle. Toutes les nouvelles cellules tumorales sont produites à partir de cette fraction. Deux autres compartiments contiennent les cellules non prolifératives. Il s'agit des cellules quiescentes en phase G_0 du cycle cellulaire, capables d'entrer en cycle sous l'impulsion d'un stimulus (réoxygénation, irradiation), et des cellules différenciées qui ne le peuvent pas. Certaines de ces cellules quiescentes sont clonogènes ce qui signifie qu'elles peuvent participer à la repopulation tumorale. Il existe enfin une quatrième fraction constituée de cellules mortes par nécrose ou apoptose.

III.6.2 Paramètres de cinétique tumorale

Plusieurs paramètres caractérisent la cinétique tumorale. Une tumeur prolifère rapidement si le temps de cycle est rapide, la fraction proliférante est importante et que les pertes cellulaires sont faibles. Ces trois facteurs influencent le temps de doublement. Il correspond au temps que met la tumeur pour doubler de volume dans la partie exponentielle de la courbe de croissance (ceci s'applique également pour des cellules en culture).

Le temps potentiel de doublement défini par Steel (64) est le temps que mettraient les cellules tumorales pour doubler s'il n'y avait pas de perte cellulaires. Il est possible d'y accéder à partir du labelling index (LI) et du temps de phase S (T_s) selon l'Équation III.1.

Équation III.1 :
$$T_{\text{pot}} = \lambda \left(\frac{T_s}{\text{LI}} \right)$$

Begg a proposé une méthode permettant d'accéder au T_{pot} des tumeurs à l'aide d'un marquage au BrdU (65). Le LI est obtenu en dénombrant les cellules marquées au BrdU avec un cytomètre en flux, le T_s étant calculé en laissant cycloser ces mêmes cellules pendant 2 à 3 heures. Les pertes cellulaires (Cell Loss Factor) sont dues à la mort et à la différenciation cellulaire mais également aux cellules qui quittent la tumeur pour donner des métastases. Elles sont évaluées selon l'Équation III.2.

Équation III.2 :
$$CLF = 1 - \left(\frac{T_{pot}}{T_d} \right)$$

Une croissance tumorale lente est généralement due à d'importantes pertes cellulaires (63). Celles-ci proviennent principalement de la mort cellulaire nécrotique et/ou apoptotique et de la différenciation.

III.6.3 Valeurs des paramètres de cinétique tumorale

Les temps de doublement varient de 4 jours à 1 an mais les valeurs moyennes se situent entre 2 et 3 mois notamment pour les carcinomes des VADS (66). Ces valeurs sont éloignées de celles des T_{pot} (environ 7 jours pour les cancers des VADS) ce qui montre l'importance des pertes cellulaires tumorales qui varient de 70 à 90 % (environ 85% dans les carcinomes des VADS). Les LI rencontrés pour les carcinomes épidermoïdes des VADS varient selon les tumeurs ($5\% < LI < 17\%$) mais médiane s'établi à environ 7% (63).

III.6.4 Repopulation

Les cellules clonogéniques qui survivent à l'irradiation peuvent repeupler la tumeur. La destruction des cellules tumorales permet notamment la réoxygénation des cellules quiescentes. La repopulation peut donc avoir pour origine une remise en cycle de cellules non prolifératives (quiescentes) ainsi qu'une diminution du taux de cellules qui entrent en quiescence (67).

Il a été montré que plus la dose est élevée, plus la repopulation est rapide (68). Cliniquement, Withers *et al.* ont montré qu'un traitement long augmente la TCD_{50} (69). La repopulation affecte donc le contrôle local lors d'une irradiation fractionnée (70).

III.7 Récidives

III.7.1 Données cliniques

Des récidives de cancers apparaissent souvent après un premier traitement anticancéreux. On estime qu'environ 15 à 20% des patients atteints d'un premier cancer des VADS développent une récidive dans les 2 à 3 ans qui suivent. Seules les plus minimes ont une chance d'être rattrapées car les traitements sont peu efficaces sur ces secondes localisations souvent

devenues résistantes. Les secondes localisations apparaissent souvent en zone irradiée, le traitement est alors adapté afin d'éviter une nouvelle irradiation. Celles situées en zone non irradiée sont traitées comme des tumeurs nouvelles où la dose totale tient compte des limites des champs d'irradiation précédents. Dans ce cas, le volume irradié se limite au volume tumoral.

III.7.2 Types cellulaires

L'apparition d'une récurrence tumorale peut s'effectuer de manière différente. Une tumeur est composée de plusieurs clones cellulaires, ayant chacun leur propre radiosensibilité. La radiosensibilité tumorale est donc la résultante de celles des clones composant la tumeur. L'irradiation va détruire les clones les plus sensibles, seuls les clones résistants pourront survivre et proliférer. La récurrence est ici due à la radiorésistance intrinsèque des clones cellulaires.

Une récurrence peut également être due à l'induction d'une radiorésistance par les traitements anticancéreux des clones cellulaires radiosensibles mais quiescents au moment de l'irradiation ou situés en territoire anoxique ou encore protégés par un environnement favorable. Cette radiorésistance peut être directement liée à l'irradiation mais également à des traitements par chimiothérapie qui peuvent modifier la sensibilité cellulaire aux radiations ionisantes.

Toutefois, certaines chimiothérapies permettent de radiosensibiliser les tumeurs (71). Les traitements, notamment la radiothérapie, modifient le génome, induisant de ce fait une adaptation au milieu.

III.7.3 Taux de cellules clonogéniques

Une cellule clonogénique est une cellule apte à proliférer. Dans une tumeur, toutes les cellules ne le sont pas. Plus leur taux est important, plus la tumeur prolifère et est difficile à éradiquer. Certains auteurs ont observé une grande hétérogénéité du nombre de cellules clonogéniques selon les types de tumeur. Ainsi les tumeurs des VADS contiendraient 3 fois moins de cellules clonogéniques que les tumeurs du col de l'utérus. Trott *et al.* (72) ont estimé ce taux à environ 1%, ce qui représente 10^5 à 10^6 cellules clonogéniques par centimètre cube. Plusieurs techniques sont utilisées pour déterminer le taux de cellules clonogéniques comme la cytométrie en flux (afin de déterminer le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle (73)), la détermination du nombre inducteur moyen (NI_{50}) (induisant une tumeur

chez 50% des animaux ayant reçus une injection de cellules tumorales (74)) ou l'ensemencement de cellules tumorales permettant d'évaluer leur nombre (75).

III.7.4 Oxygénation

Les conditions environnementales influencent également la radiosensibilité tumorale. Ainsi l'hypoxie diminue la radiosensibilité des tumeurs. Par exemple, les carcinomes de la base de la langue sont connus pour être très hypoxiques (21).

Thomlinson et Gray ont donné une explication de l'hypoxie. Les cellules de la surface tumorale sont prolifératives et consomment ainsi la majeure partie de l'oxygène distribué par les capillaires sanguins. Les cellules situées en profondeur ne disposent plus d'oxygène et se nécrosent. Entre les deux couches, une population hypoxique prend place et se maintient en survie (76). Ces cellules anoxiques sont environ trois fois plus radio-résistantes que les cellules bien oxygénées.

Cependant, en cours de traitement radiothérapeutique, l'irradiation étant fractionnée, à chaque séance, les radiations détruisent les cellules les plus radiosensibles c'est à dire les cellules prolifératives de la surface tumorale. Les cellules hypoxiques situées plus au centre de la tumeur, sont alors réoxygénées, elles retrouvent leur radiosensibilité et sont détruites lors de l'irradiation suivante (77).

Il existe 5 mécanismes par lesquels les cellules hypoxiques et donc radio-résistantes sont réoxygénées : les cellules endommagées consomment moins d'oxygène (phase assez rapide) ; les cellules mortes n'utilisent plus d'oxygène (phase lente) ; les cellules mortes disparaissent (phase lente) ; certaines cellules meurent d'hypoxie ($T_{1/2} = 5-11$ heures) ; recirculation du sang (phase rapide).

Généralement, si la tumeur est de petite taille (<3 cm), il est possible d'éradiquer la presque totalité de la masse tumorale, comme si toutes les cellules étaient bien oxygénées avec des doses de l'ordre de 70 Gy en 7 semaines (40). Toutefois, des variations de réoxygénation mesurées par l'analyse des pressions partielles en oxygène ont été observées notamment dans les adénopathies des VADS (78). Une augmentation du taux de cellules hypoxiques peut se produire lors d'une irradiation fractionnée, conduisant à une stérilisation incomplète.

RESUME

Chaque tissu a sa propre tolérance aux radiations ionisantes qui dépend du type de rayonnements, du fractionnement et de la dose employée (5 à 80 Gy). Les lésions immédiates (érythème, infections...) qui en résultent sont souvent réversibles contrairement à celles apparaissant tardivement (atrophies, fibroses...).

L'évaluation clinique de la radiosensibilité se déroule à l'aide de paramètres histomorphologiques et de l'évaluation de la réponse tumorale à 50 Gy. Il est toutefois possible d'utiliser les paramètres α et SF_2 , issus du modèle LQ, comme facteurs prédictifs de la radiosensibilité tumorale. L'intérêt récent suscité par le caractère prédictif du ratio Apoptotic Index / Mitotic Index demande à être confirmé.

La prolifération cellulaire, qui affecte la réponse tumorale, peut être estimée à partir d'une biopsie en mesurant la durée de phase S et le labelling index qui permettent de calculer le temps potentiel de doublement (habituellement quelques jours). Ces paramètres mettent en évidence l'importance de la repopulation lors des irradiations fractionnées.

La radiorésistance des récidives tumorales peut être intrinsèque (sélection de clones résistants) ou acquise (induction de mutations). Les conditions environnementales, comme l'oxygénation, sont aussi à l'origine de cette résistance.

Chapitre IV

La réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

IV La réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

Les effets tissulaires des radiations ionisantes ont principalement pour origine des modifications cellulaires qui se produisent en réponse à l'irradiation. La capacité des cellules à prévenir et/ou réparer les dommages cellulaires se traduit par une plus ou moins grande radiosensibilité.

IV.1 Régulation de l'expression génique.

Les premiers changements spécifiques après une irradiation concernent l'induction des gènes de la réponse précoce tels que ceux de familles myc, jun, fos et egr dont l'activation passe par les voies de transduction du signal MAPKs et SAPKs. Cette dernière est préférentiellement choisie en réponse à une irradiation (79). Ces facteurs de transcription vont alors activer d'autres facteurs de transcription comme AP-1, NF- κ B ou Sp1. La transcription des gènes de la réponse tardive (FGF, PDGF, TNF- α , TK, DT-diaphorase) est ainsi possible. Ceux-ci vont intervenir dans les processus de la réponse aux radiations tels que la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, la régulation du cycle cellulaire notamment lors des arrêts, la réparation des dommages radio-induits de l'ADN, la mort cellulaire programmée (80).

La Protéine Kinase C (PKC) est une protéine de 77 kDa qui joue un rôle central dans la transduction du signal de plusieurs effecteurs notamment des radiations ionisantes. Elle est d'ailleurs activée une heure après une exposition à une dose aussi faible que 0,05 Gy (81). Son activation, très précoce, vient en amont de la voie SAPK (80).

La protéine p53 est également produite rapidement après une irradiation. Le gène p53, localisé sur le bras court du chromosome humain 17, est un gène suppresseur de tumeur comportant 2300 nucléotides. Son ARNm, possède 11 exons et code pour une phosphoprotéine kinase nucléaire de 393 acides aminés. La protéine est divisée en 4 domaines : transactivation (positions 1 à 43), fixation (positions 100 à 300), oligomérisation (positions 320 à 360), fixation non spécifique à l'ADN (positions 330 à 393). La forme active de cette protéine de 53 kDa est en fait un tétramère qui se fixe sur la séquence consensus 5' Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(A/T)-G-Py-Py-Py 3' (82-84). Il agit comme un facteur de transcription en induisant ou réprimant la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires centraux tels que la transcription de gènes, le cycle cellulaire, la stabilité

génomique, la ségrégation des chromosomes, la sénescence et l'apoptose (85). La protéine p53 sauvage a également la capacité de réguler négativement l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires et viraux en s'associant notamment à la TBP (TATA box Binding Protein) (86) et à la CBF (CCAAT box Binding Factor). L'activité de p53 est régulée par des phosphorylations au niveau des résidus sérine de la protéine dont le rôle précis n'est pas encore totalement élucidé.

La protéine p53 est un élément important de la voie activée en réponse aux dommages subis par l'ADN, ce qui lui vaut le surnom de "gardien du génome". En effet, on observe une accumulation nucléaire importante de cette protéine en réponse à des lésions de l'ADN génomique probablement par diminution de sa dégradation par la voie de conjugaison à l'ubiquitine. Une seule cassure double brin est suffisante pour activer p53 (87)). La protéine p53 est alors capable de transactiver plusieurs gènes (Figure 12) dont p21^{WAF1/Cip1} impliqué dans le blocage du cycle cellulaire en G₁/S, GADD45 lié à la réparation de l'ADN ou encore Mdm2 qui inhibe l'activité transrégulatrice de p53 et permet la ré entrée de la cellule dans le cycle cellulaire après la réparation des lésions. Par ailleurs, si ces dommages sont trop importants pour être réparés, et pour éviter une dérive néoplasique des tissus concernés, p53 peut induire des gènes tels que Bax et en réprimer d'autres tels que Bcl-2, afin d'induire la mort cellulaire programmée (86).

La mutation de p53 dans les cancers humains est un événement fréquent qui souligne son rôle dans la cancérogenèse (88). Ce gène présente la particularité d'avoir un large spectre mutationnel qui touche préférentiellement 5 « hot-spots » localisés dans des régions très conservées au cours de l'évolution liées notamment à la fixation à l'ADN (88).

IV.2 Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

IV.2.1 Production des ERO

Une cellule normale produit constamment des radicaux libres qui oxydent les composés cellulaires. Ainsi on estime qu'il se produit quotidiennement entre 10 000 et 15 000 dommages oxydatifs sur l'ADN (89). Les rayonnements ionisants utilisés en radiothérapie ont pour rôle de détruire les cellules tumorales en induisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'ion superoxyde (O₂⁻) ou le radical hydroxyle (OH[•]) (90).

En effet, les radiations provoquent l'ionisation des constituants cellulaires que sont les lipides, les protéines et l'ADN selon deux voies distinctes. La première voie, indirecte, résulte de la radiolyse de l'eau qui est schématisée sur la Figure 6. Les molécules d'H₂O peuvent être soit ionisées soit excitées par les radiations. Les radicaux hydroxyles formés peuvent réagir avec les molécules voisines.

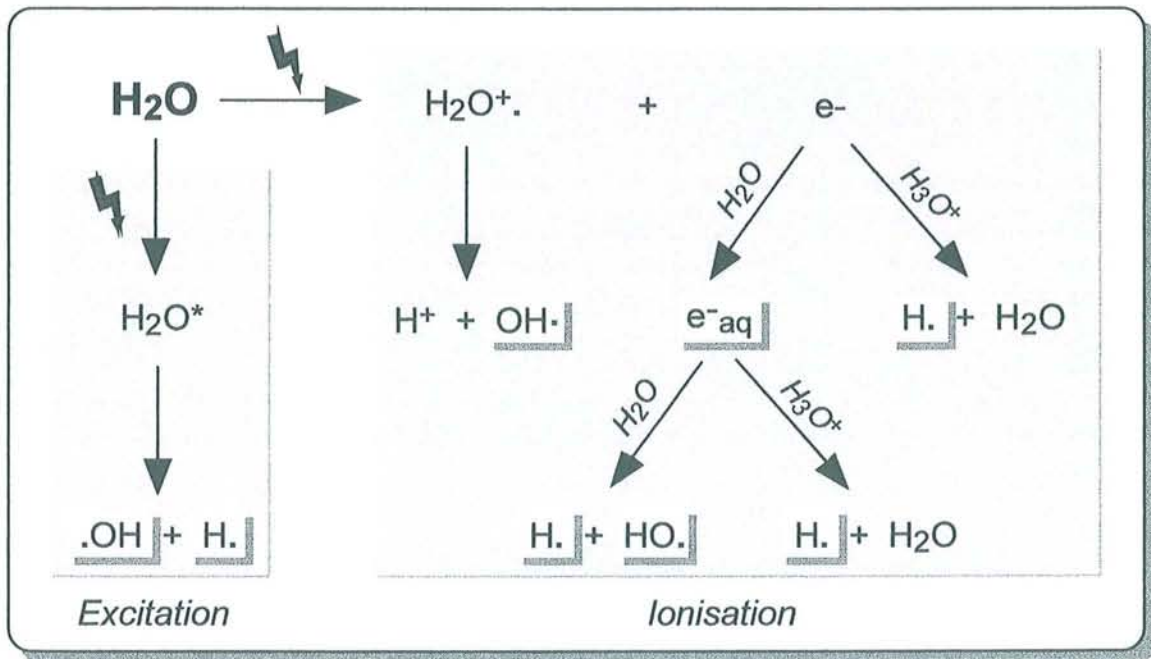
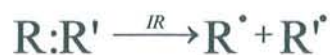


Figure 6 : Radiolyse de l'eau. D'après Dutreix *et al.*. Biophysique des radiations et imagerie médicale. Masson, 1993.

La seconde se caractérise par une action directe des radiations sur les molécules qui, une fois excitées et ionisées, retournent à leur état stable soit par émission de fluorescence (photons) soit par rupture des liaisons covalentes produisant des radicaux libres :



L'oxygène moléculaire qui est notamment la cible de ces attaques, engendre une succession de réactions produisant des ERO telles que le radical hydroxyle et l'anion superoxyde (Figure 7).

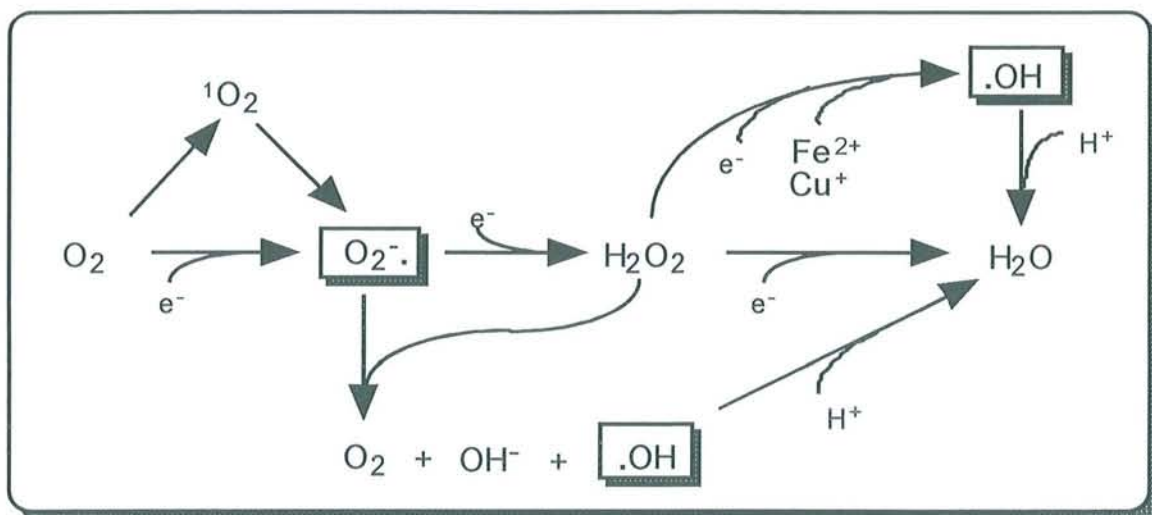


Figure 7 : Production d'espèces réactives de l'oxygène.

D'autres voies conduisant à la production d'ions superoxydes ont été mises en évidence tels que la réduction monovalente de l'oxygène par les mitochondries, l'auto-oxydation des catécholamines, l'oxygénase microsomale et hépatique ou encore l'endothélium vasculaire (90).

IV.2.2 Effets moléculaires des ERO

De par leur grande réactivité, les radicaux libres interagissent notamment avec les doubles liaisons et l'oxygène moléculaire. Ainsi, les acides gras sont particulièrement touchés par les attaques radicalaires de part leurs nombreuses doubles liaisons, ce qui induit des modifications de la fluidité et des flux transmembranaires.

Les doses utilisées en radiothérapie ne sont pas suffisantes pour altérer directement les protéines. Mais les fonctions carboxyles de certains acides aminés peuvent toutefois être sujettes aux attaques radicalaires lorsqu'elles sont conformationnellement accessibles.

L'ADN est la cible principale des radiations ionisantes et des ERO, le radical hydroxyle provoquant d'ailleurs 60 à 70 % des radiolésions (91). Plusieurs modes d'altérations sont répertoriés. Ainsi, les sucres peuvent être oxydés puis hydrolysés ce qui provoque la libération d'une base et la rupture de la liaison phosphodiester. De même, les bases sont

particulièrement sujettes aux attaques de radicaux libres. Les bases pyrimidiques sont plus sensibles aux radiolésions que les bases puriques. Il en résulte des altérations tels que des pontages intra- ou inter-brins (par exemple des dimères de thymidine) ainsi que des liaisons ADN-protéine. Les ionisations provoquent également des ruptures de l'ADN au niveau des sucres ou des liaisons phospho-diester. Ces modifications sont les plus préjudiciables pour la cellule. En effet, les ruptures simple brin dénaturent l'ADN alors que les cassures double brin induisent sa dégradation (90). Plusieurs études ont montré que la présence de cassures simple brin pourrait augmenter la probabilité d'attaque des radicaux libres à proximité et provoquer des cassures double-brin. Celles-ci, dix fois moins nombreuses que les cassures simple-brin, sont l'évènement majeur induisant la mort cellulaire (92).

La conformation structurale de l'ADN qui résulte de tous ces dommages empêche le déroulement normal de la réplication. De plus, la majeure partie de ces radiolésions est stable ce qui peut contribuer à la mort cellulaire (90).

IV.2.3 Processus de détoxification

Soumise continuellement au stress oxydatif, la cellule a mis en place des systèmes de détoxification des ERO qui complètent les systèmes de réparation de l'ADN. La cellule prévient ainsi les dommages avant qu'ils se produisent. De plus, plusieurs auteurs ont montré que l'efficacité de ces systèmes de détoxification pouvait influencer la sensibilité aux radiations ionisantes (93). Plusieurs voies d'élimination de l'ion superoxyde ont été identifiées (Figure 8).

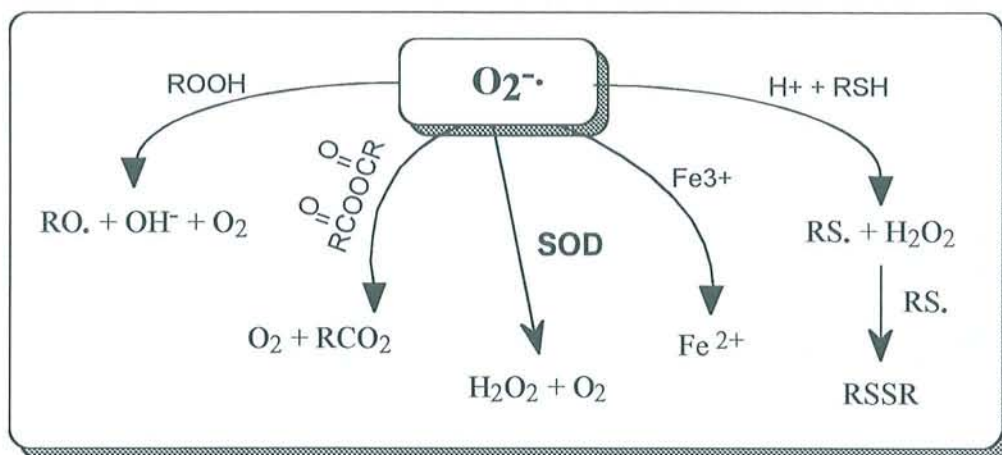


Figure 8: Voies d'élimination de l'ion superoxyde. D'après Oberley *et al.*, 1979 (93).

IV.2.3.1 Le taux de glutathion (GSH).

Le glutathion ou GSH est un tripeptide (γ -glutamylcystéine-glycine) identifié en 1888. Cette molécule très abondante dans les cellules mammifères (taux plasmatique : 10-30 mM) sert de nucléophile dans de très nombreuses détoxifications. Le maintien d'un taux constant s'effectue par une synthèse *de novo* et par un système de récupération. Ce taux est très important dans la résistance aux agents anticancéreux (94-96). En effet, si le taux de GSH est élevé, la cellule aura les moyens de neutraliser les molécules toxiques pouvant provoquer sa destruction. Certaines enzymes impliquées dans la synthèse du GSH sont des cibles thérapeutiques possibles. L'inhibition de l'une d'elles permettrait d'augmenter la sensibilité aux agents anticancéreux. Plusieurs études portent sur la buthionine sulfoximine (BSO) qui est un inhibiteur de la γ -GCS (γ glutamylcystéine synthétase), l'enzyme limitante dans la synthèse du GSH. Ainsi, en travaillant sur des cellules tumorales d'ovaire résistantes au melphalan, au cisplatine et aux radiations, il a été montré que le BSO permet une radiosensibilisation de ces cellules (97). La γ -GT serait une autre cible potentielle car elle est impliquée dans le système de récupération de la GSH.

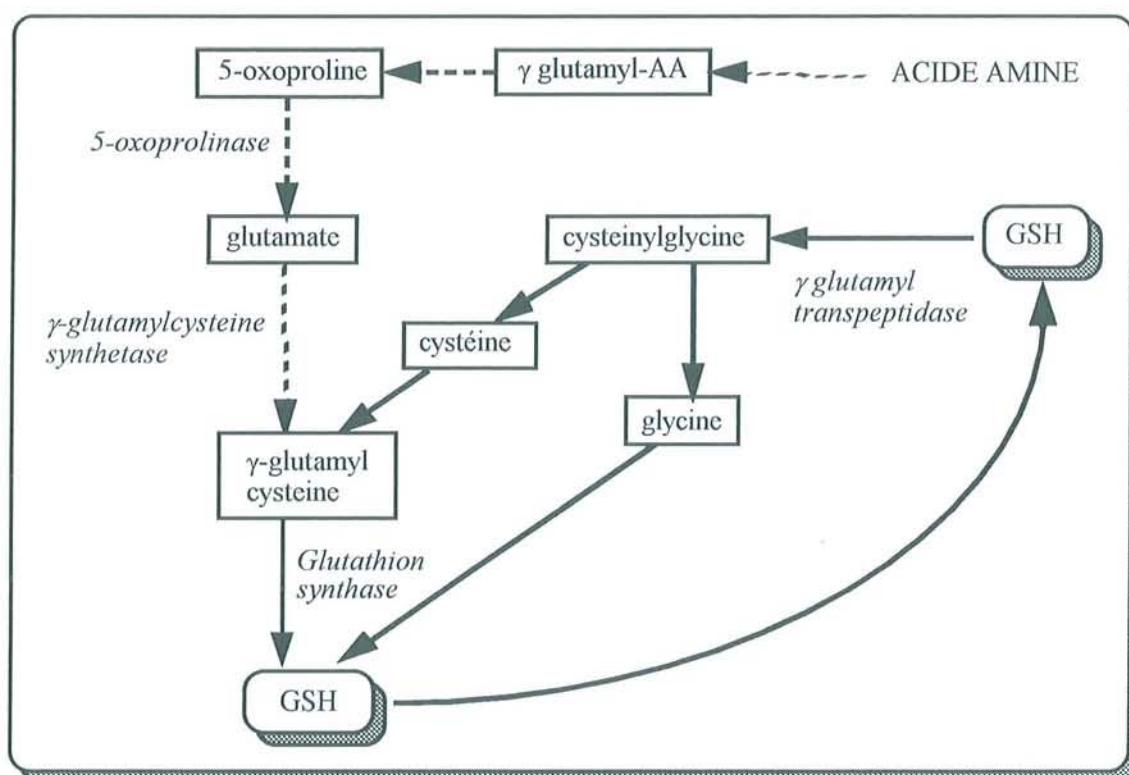


Figure 9 : Voies de synthèse (---) et de sauvetage (—) du glutathion.

IV.2.3.2 Les glutathion *S*-transférases (GST).

Les glutathion *S*-transférases (GST) sont une famille d'isoenzymes comprenant les GST- α , μ , π et θ . Elles sont codées par 5 gènes dont 4 pour les formes cytosoliques et un pour la forme microsomale (θ). Elles catalysent l'addition nucléophile du thiol réduit du glutathion sur un composé électrophile. La faible spécificité structurale des GSTs leur permet de reconnaître plusieurs fonctions chimiques mais avec une affinité assez basse (94).

L'augmentation et/ou l'expression différentielle des GSTs dans la résistance à divers traitements anticancéreux a souvent été signalée. En effet, dans les tumeurs, les taux de GST augmentent souvent (surtout la GST- π). Ainsi le taux de GST- π est élevé dans les carcinomes colorectaux, les tumeurs de l'estomac, des poumons ou encore de la vessie, comparé au taux de GST- π dans les tissus sains adjacents (98).

Chaque isoenzyme de la GST est plus particulièrement associée à un type de résistance. Ainsi, la GST- α est impliquée dans la résistance aux moutardes azotées (94). La GST- μ est liée à la résistance aux nitrosourées. La GST- π est généralement associée à la résistance aux alkylants. Toutefois, il a été montré que le complexe drogue-GSH pouvait être excrété de la cellule par une protéine ATP-dépendante, la MDR.

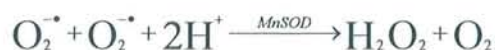
Plusieurs auteurs ont tenté d'utiliser les différentes GSTs comme facteurs prédictifs de la cancérisation. Ainsi Szarka *et al.* (99) ont montré que chez les individus présentant un risque pour le cancer colorectal, le taux de GST- μ diminuait alors que dans la population il n'y avait pas de corrélation entre la fréquence du phénotype GST- μ et le risque de cancer colorectal. Naza-Stewart *et al.* (100) ont montré que l'expression de la GST- μ dans les leucocytes de fumeurs est associée à un faible risque de cancer du poumon. Lafuente *et al.* (101) ont mis en évidence qu'une déficience de GST- μ chez les fumeurs était un marqueur de susceptibilité aux cancers du larynx et de la vessie. Mulder *et al.* (98) ont montré que le taux de GST- π permettait un pronostic de survie plus favorable dans le cancer colorectal.

Ainsi les taux de GST dans les tumeurs peuvent fournir de précieuses informations au sujet de la sensibilité aux traitements anticancéreux.

Des expériences de transfection d'ADNc de GST ont été réalisées afin de tester l'induction d'une résistance. Les résultats relativement variables obtenus sont dus à plusieurs facteurs tels que des variations dans les niveaux de GSH et GST et dans les taux de transcription, traduction et stabilité. La présence de contrôles du feed-back, d'une pompe relargant les complexes drogue-GSH ainsi que l'existence de mécanismes compétitifs de détoxification, expliquent également ces observations.

IV.2.3.3 Les superoxyde dismutases (SOD).

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme présente dans toutes les cellules aérobies. Elle catalyse la réaction :



Il existe plusieurs types de SOD dont la localisation cellulaire diffère. Ainsi, la Cu-ZnSOD est localisée dans le cytosol et dans le noyau (102). C'est surtout la MnSOD, qui se situe dans la matrice mitochondriale, qui est impliquée dans la formation d'H₂O₂.

Certains auteurs ont détecté une baisse de la quantité de MnSOD dans toutes les tumeurs étudiées, notamment dans le foie (93). Ceci s'accompagne parfois d'une diminution de la quantité de Cu-ZnSOD. Donc dans les tumeurs, l'éventuelle activité SOD détectée est principalement celle de la Cu-ZnSOD.

Une radiothérapie augmente le taux d'ions superoxyde et de radicaux libres, ce qui a pour effet d'endommager les cellules tumorales. La baisse du taux de MnSOD détectée dans les tumeurs (93) engendre donc une faible détoxification, une augmentation des dommages et la mort de la cellule. Une radiorésistance des cellules tumorales pourrait en partie s'expliquer par une augmentation du taux de MnSOD et donc une forte détoxification n'entraînant que peu de dégâts cellulaires.

Urano *et al.* (103) ont transfecté des cellules d'un fibrosarcome murin avec un ADNc de la MnSOD. La réponse à l'irradiation montre que les cellules tumorales sont un peu plus radiorésistantes que les témoins. Ils ont également vérifié qu'en conditions hypoxiques, la MnSOD ne protégeait pas les cellules des radiations.

IV.2.3.4 La glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR).

La glutathion peroxydase (GPx) est l'enzyme permettant la réduction du H_2O_2 en H_2O et O_2 par l'intermédiaire de l'oxydation de 2 GSH en GSSG. La glutathion réductase (GR) permet la réduction du GSSG en 2 GSH grâce à l'oxydation d'un NADPH en NADP^+ (Figure 10).

Ces deux enzymes utilisent le GSH donc leurs taux reflètent l'importance de la détoxification cellulaire. Malgré tout, Liebman *et al.* (104) ont montré qu'un fort taux de GPx ne protégeait pas des cellules MCF-7 des dommages causés par l'irradiation.

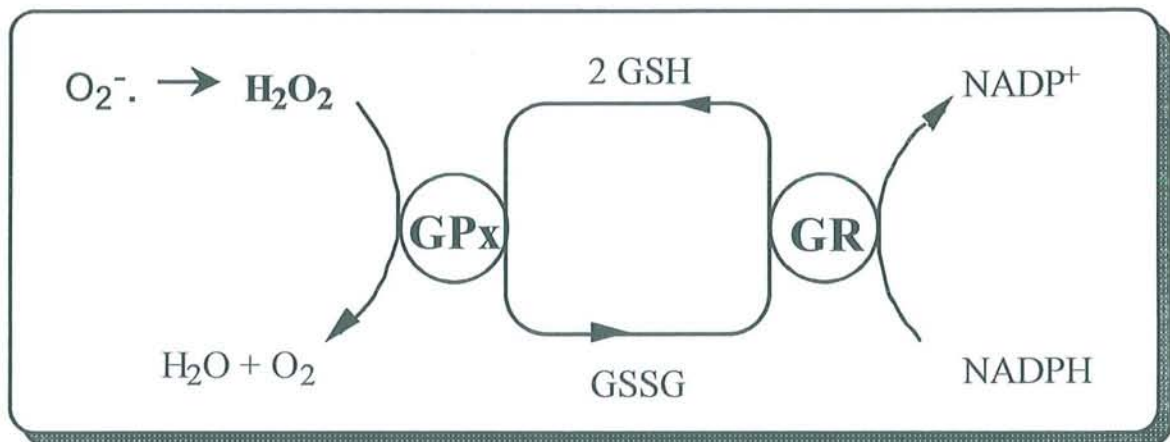


Figure 10 : Implications de la GPx et de la GR dans la détoxification des ERO. La GPx permet l'oxydation du glutathion en GSSG et la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, la GR effectue l'opération inverse pour le glutathion mais en présence de NADPH qui est oxydé en NADP^+ .

IV.2.3.5 Les métallothionéines (MT).

Les métallothionéines (MT) sont des protéines non enzymatiques qui chélatent les ions métalliques par des liaisons métal-thiolate avec des résidus cystéine. Leur rôle physiologique précis n'est pas défini, toutefois leur capacité de liaison suggère qu'elles interviennent dans le maintien de l'homéostasie des métaux tels que le cuivre et le zinc. Il a été montré qu'elles permettent la détoxification de métaux tels que le cadmium et le mercure (105).

Bien que les MTs soient conservées au cours de l'évolution, d'importantes disparités sont observées entre des différentes espèces animales et végétales. Ainsi chez l'homme, les MTs sont codées par une famille de 14 gènes portés par le chromosome 16 dont 6 sont inactifs. Ils codent pour des protéines de faible poids moléculaire (6 à 10 kDa) de 61 ou 62 acides aminés. Ces protéines ont la particularité de ne pas posséder de pont disulfure malgré les 20 cystéines organisées selon 8 motifs Cys-X-Cys réparties dans les deux domaines protéiques α et β (106). Tous les groupes sulfhydryle sont déprotonés et participent à la liaison de 7 atomes bivalents ou 12 atomes monovalents par molécule de MT. L'affinité des MTs pour les métaux est la suivante : Hg (II) = Pb (II) = Pt (II) > Bi (III) > Cu (I) = Ag (I) > Cd (II) > Sb (II) > Zn (II) > Ni (II) = Co (II).

Les protéines sont classées en 3 groupes structuraux. Le groupe I inclus les MTs de mammifères qui ont une structure primaire similaire, le groupe II rassemble les MTs qui n'ont pas d'homologie structurale avec la classe I. Les MTs du groupe III sont des dérivés non protéiques du glutathion que l'on trouve dans les plantes et certains micro-organismes. Chez les mammifères, les MTs sont classées en 4 groupes de MT-1 à MT-4. Les MTs 1 et 2, les plus étudiées et fonctionnellement identiques, sont exprimées constitutivement dans plusieurs organes (intestin, pancréas, foie, reins) et au cours du développement embryonnaire. Leur rôle dans la régénération hépatique est également prépondérant (105).

Le taux de MTs est régulé par la modulation de leur synthèse et de leur dégradation. Ainsi la demi-vie des MTs varie considérablement selon le type de MT, le tissu de production et l'inducteur. Elle se situe entre 4 et 100 heures. L'expression des MTs est inductible par une grande quantité d'agents : les métaux, les hormones, cytokines et facteurs de croissance, l'EGF, les agents alkylants notamment ceux de chimiothérapie, les solvants, le stress physique et oxydatif tels que les radiations (105). Les mécanismes moléculaires de la régulation transcriptionnelle ne sont pas totalement élucidés. Toutefois la transcription est sous le contrôle d'éléments de *cis* et de *trans* régulation. Des éléments de réponse aux métaux (MRE) et aux agents antioxydants (ARE) ont été identifiés dans la région promotrice des gènes des MTs, ce qui correspond au fait que les MTs agissent en tant que protecteur du stress oxydatif (106).

L'implication des MTs dans les processus de croissance mène à penser qu'elles peuvent être liées aux processus de cancérisation. Effectivement, une surexpression de MTs a été mise en évidence dans de nombreux tissus cancéreux (thyroïde, testicules, sein, ovaires, vessie) par

rapport aux tissus sains (105). Il semble d'ailleurs que les MTs soient exprimées préférentiellement dans les cellules en division localisées à la périphérie des tumeurs. Il a été montré que les MTs pouvaient intervenir dans la résistance à certains agents anticancéreux tels que le cis-platine, le 5-fluoro-uracile et les radiations ionisantes. Le contenu important en thiol des MTs peut représenter une cible pour les espèces réactives de l'oxygène produites après irradiation. En effet, les MTs sont des transporteurs efficaces de radicaux hydroxyles et d'ions superoxydes ce qui permet d'atténuer les dommages aux lipides membranaires et aux acides nucléiques.

IV.3 Le cycle cellulaire après irradiation

Les radiations ionisantes engendrent des perturbations au niveau de toutes les phases du cycle cellulaire. Chacune d'entre elles est associée avec au moins un point de contrôle (checkpoint) qui autorise ou non le passage à la phase suivante. De par leur position stratégique, les arrêts en G_1/S et G_2/M sont les plus visibles et donc les mieux connus.

IV.3.1 Rappels

Le cycle cellulaire, d'une durée approximative de 24 heures (entre 10 et 40 heures), est une succession de phases de repos et de synthèse d'ADN. Il est composé de 4 phases :

- G_1 (gap 1) : les cellules à $2n$ chromosomes préparent la synthèse de l'ADN puis évaluent, en fin de G_1 , la possibilité de passer en phase S. La phase G_1 présente d'importantes variations de durée : d'une heure jusqu'à de très longues périodes.
- S (synthèse d'ADN) : l'ADN est répliqué. Ce processus dure environ 6 à 8 heures.
- G_2 (gap 2) : les cellules préparent la mitose pendant environ 4 heures puis évaluent, en fin de G_2 , la possibilité d'y entrer.
- M (mitose) : pendant une heure, les cellules se divisent. Elles comportent alors $4n$ chromosomes.

Deux possibilités s'offrent alors aux cellules, soit elles repassent en G_1 et débutent un nouveau cycle, soit elles sortent du cycle et entrent dans un état quiescent appelé G_0 . Ainsi les cellules d'un tissu ne sont pas toujours engagées dans un cycle bien qu'elles gardent leur capacité à se multiplier sous l'effet d'un stimulus pour sortir de cette phase G_0 . Toutefois, aucun caractère

biochimique ou morphologique ne permet de les distinguer des cellules en phase G_1 ; par conséquent cette distinction n'est pas admise par tous.

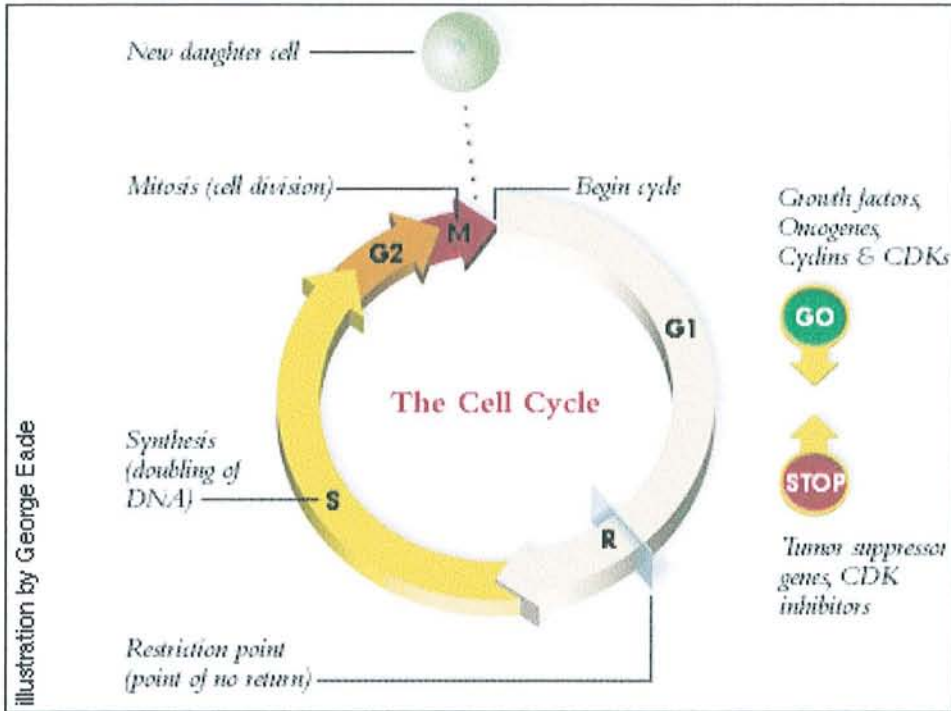


Figure 11 : Les phases du cycle cellulaire avec les points de contrôle en G_1/S et G_2/M .

IV.3.2 La régulation des phases du cycle cellulaire

La progression dans les différentes phases, est sous la dépendance de cyclin dépendant kinase (Cdk) dont l'activité kinase se met en place lors de la complexation avec des cyclines exprimées de manière transitoire lors du cycle cellulaire (107). Les différentes cyclines et Cdk identifiées se lient entre elles selon plusieurs combinaisons. Les complexes ainsi formés, qui s'expriment temporairement, régulent la progression du cycle cellulaire notamment au niveau des transitions G_1/S et G_2/M . Ainsi les complexes formés par les cyclines D et E contrôlent la phase G_1 et la transition G_1/S . Les cyclines A et B sont impliquées dans les phases G_2 et M ainsi que la transition G_2/M . Quant aux cyclines C, G et H qui sont moins connues, elles ne semblent pas restreintes à une phase particulière du cycle cellulaire. Le Tableau 5 résume les fonctions et localisation des quelques complexes Cdk-cycline plus particulièrement liés à la réponse aux radiations ionisantes.

Tableau 5 : Localisation et fonctions des principaux complexes Cdk-cyclines impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire après irradiation.

Cdk	Cyclines	Phases	Localisations	Fonctions
Cdk 1	Cyclines B	G2/M	Cytoplasme	. Déclenche la mitose. . Phosphorylation de substrats dont l'histone H1 (activité H1K) ce qui permet la formation de chromosome métaphasiques. . A la fin de la métaphase, la cycline B est dégradée, cdk1/cdc2 perd l'activité kinase et la mitose s'achève.
	Cycline A	G2/M et S	Noyau	. Déclenche la mitose.
Cdk 2	Cycline A	G2/M et S	Noyau	. Régulation de la réplication (inhibition de l'activité de E2F par phosphorylation en fin de phase S). . Activité maximale quelques heures avant la synthèse d'ADN.
	Cycline E	G1 et S	Noyau	. Permet la transition G1/S par phosphorylation de Rb.
Cdk 4	Cyclines D	G1	Noyau	. Permet la transition G1/S par phosphorylation de Rb. . Pas d'activité H1K.
Cdk 6	Cyclines D	G1	Noyau	. Permet la transition G1/S par phosphorylation de Rb. . Faible activité H1K.
Cdk 7	Cycline H	toutes	?	. Phosphorylation de cdk1, 2 et 4 pour l'activation de l'activité H1K. . Appelé cdk-activating kinase.

IV.3.2.1 Point de contrôle G₁/S

La cible principale de l'activité kinase des complexes Cdk-cycline est Rb. C'est une protéine de 105 kDa codée par le gène suppresseur de tumeur de susceptibilité au rétinoblastome. Elle permet un arrêt réversible du cycle en G₁ (108). En début de phase G₁, Rb non phosphorylée, est liée au facteur de transcription E2F. Rb empêche donc la progression du cycle en phase S (109, 110). La phosphorylation de Rb par Cdk2, Cdk4 et Cdk6 permet la libération de E2F. Celui-ci enclenche alors la transcription de gènes nécessaires à la synthèse de l'ADN en phase S tels que thymidine kinase, la dihydrofolate réductase ou l'ADN polymérase. En fin de phase S, le complexe Cdk2-cycline A phosphoryle E2F qui perd alors son activité transcriptionnelle (111). La régulation des phases G₁ et S et la transition sont résumées sur la Figure 12.

IV.3.2.2 Point de contrôle G₂/M

Le système clé du passage en G₂/M est un complexe multiprotéique, le MPF (Maturation Promoting Factor), composé de p34^{cdc2} (homologue de Cdk1) et de la cycline B1 (112). Cette transition nécessite l'activation de l'activité kinase H1 (HIK) de Cdk1 qui est régulée par une série de phosphorylations de Cdk1 et par la synthèse de cycline B1 (113). Le taux de cycline B1, régulé aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et de la stabilité de l'ARNm, est faible en G₀ et G₁ alors qu'il augmente pendant les phases G₂ et M. La localisation cellulaire (cytoplasmique puis nucléaire en G₂/M) de la cycline B1 contribue aussi à sa régulation (112).

Quant à la phosphorylation de Cdk1, elle débute par celle de la thréonine 161 par le complexe Cdk7-cycline H encore appelé CAK (Cdk-Activating Kinase) (114). La liaison de Cdk1 à la cycline B1 s'effectue en même temps que les phosphorylations de la thréonine 14 et de la tyrosine 15 respectivement par les kinases WEE1 et MYT1 (115). Ces phosphorylations empêchent l'acquisition précoce de l'activité kinasique du complexe. L'activité enzymatique de ce MPF encore inactif est générée par la protéine cdc25C qui enlève les 2 phosphates en position 14 et 15 (116). Le MPF activé permet alors la phosphorylation d'une série de protéines nécessaires au déclenchement de la mitose. La Figure 13 illustre la régulation et la transition G₂/M.

IV.3.3 Sensibilité des phases du cycle cellulaire aux radiations ionisantes

Il a été montré que la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes diffère en fonction des phases du cycle cellulaire. Les cellules sont plus radiorésistantes en phases G₁ et S et plus radiosensibles en phases G₂ et M (117). Ainsi les cellules hautement différenciées, qui ne se divisent pas, ne peuvent "exprimer" la mort différée, ce qui explique, par exemple, la radiorésistance clinique de l'hypophyse adulte ou celle des neurones dont le renouvellement est nul. A l'opposé, les cellules en division ont des difficultés à distribuer leur chromatine de façon égale entre les deux cellules filles à cause des cassures de la molécule d'ADN provoquées par les radiations ionisantes, aboutissant ainsi à leur disparition. Cependant, le rôle joué par l'activité mitotique dans la mort cellulaire après une irradiation se manifeste aussi dans le phénomène des réparations des lésions potentiellement létales (PLD) (118). Ces lésions entraînent la mort des cellules engagées dans un cycle, mais peuvent être réparées lorsque celles-ci sont en repos mitotique, ce qui réduit la mortalité des cellules tumorales ou normales ayant une faible activité mitotique (119).

IV.3.4 L'arrêt en G₁/S

Un arrêt à la transition des phases G₁ et S est observé après irradiation. Celui-ci est sous la dépendance de p53^{wt} (112) bien que ce concept semble remis en cause (120) particulièrement dans les cellules tumorales. Les dommages radio-induits de l'ADN provoquent l'accumulation de la protéine p53 qui est l'élément central de la régulation de l'arrêt en G₁/S. L'action inhibitrice de p53 sur la progression du cycle cellulaire passe par l'activation transcriptionnelle du gène WAF1/CIP1 qui code pour la protéine p21 (CDKN1A). Celle-ci se complexifie avec les kinases Cdk2, 4 et 6 ce qui inhibe l'activité des cyclines A, D et E (121). L'absence des complexes Cdk-cycline se répercute à deux niveaux. Premièrement, Rb ne peut pas être phosphorylé, E2F reste inactif et ne peut pas transcrire les gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN. La transition G₁/S est donc bloquée. Deuxièmement, p21 lié à une Cdk se complexifie avec le PCNA qui n'est plus disponible pour l'activation de la polymérase δ nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN par le processus Nucleotide Excision Repair (voir chapitre IV.4.1). La réplication de l'ADN est donc inhibée.

La régulation de l'arrêt radio-induit en G₁/S passe également par d'autres voies. Ainsi, le gène gadd45 est transcrit par l'intermédiaire de p53. Il a été montré que la protéine produite, p19, s'accumule et se complexifie avec une Cdk permettant la liaison au PCNA. Cette voie, semblable à celle de p21, renforce l'inhibition de la réplication de l'ADN (122).

La durée de l'arrêt en G₁/S semble être régulée par le couple p53-MDM2. Il existe en effet un rétro-contrôle entre ces deux protéines car p53 stimule l'expression de MDM2 alors que MDM2 inhibe l'activité de transactivation de p53. Ce phénomène permettrait de moduler finement l'activité de p53. La protéine MDM2 agit aussi directement en se fixant à Rb ce qui libère E2F. Son activité transcriptionnelle est stimulée par MDM2 auquel il se lie à son tour. Ainsi la durée de l'arrêt en G₁/S peut être modulée par MDM2 (122). Les voies conduisant à l'arrêt en G₁/S sont résumées sur la Figure 12.

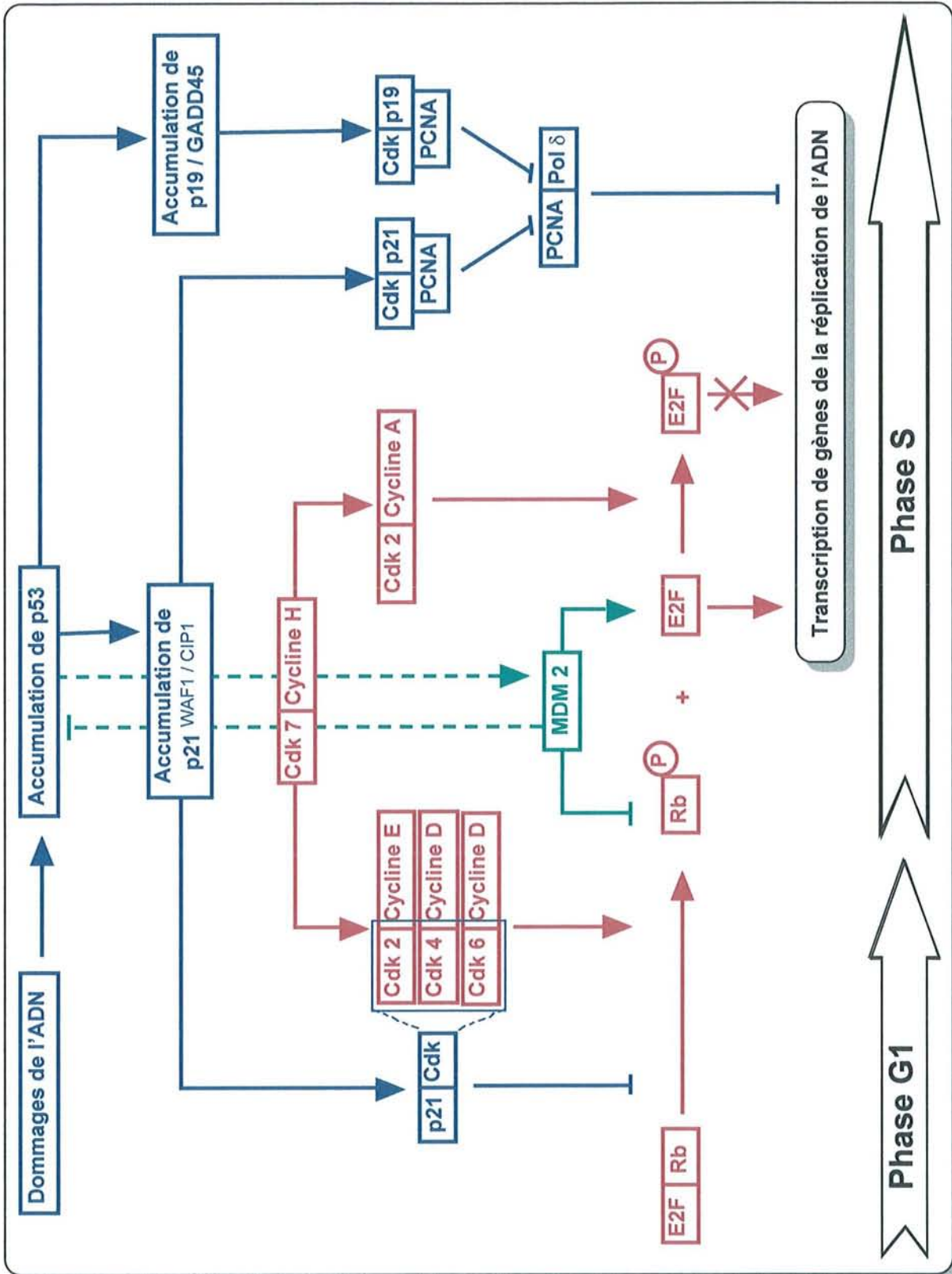


Figure 12 : Transition G₁/S normale (en rouge) et arrêt après irradiation (en bleu). La régulation mdm2/p53 est représentée en vert.

L'importance de l'arrêt en G_1/S sur la sensibilité aux radiations ionisantes est encore vivement débattu. L'hypothèse la plus courante stipule que cet arrêt permet à la cellule de réparer les dommages radio-induits de l'ADN et donc d'éviter leur fixation lors de la phase S suivante. Effectivement, plusieurs auteurs ont montré que des cellules p53 mutées qui n'ont pas d'arrêt en G_1/S après une irradiation sont plus résistantes que des cellules p53^{wt}. Mais d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence un tel effet notamment dans le cas des cancers des VADS (123) et du colon (124). En fait, il semble y avoir des variations selon le système cellulaire utilisé.

Ainsi, des cellules p53^{wt} irradiées à des doses "cliniques" peuvent mourir soit par apoptose (cellules hématopoïétiques) soit suite à un arrêt irréversible en G_1/S (fibroblastes) (125). Des cellules p53 mutées ne peuvent déclencher ni la mort par apoptose p53-dépendante (voir chapitre IV.5) ni la mort consécutive à un arrêt irréversible en G_1/S ce qui peut conduire à une radiorésistance.

De plus, l'arrêt en G_1/S n'est pas le seul à pouvoir moduler la sensibilité aux radiations ionisantes. L'arrêt radio-induit en G_1/S semble donc avoir moins d'importance sur la radiosensibilité que ce qui avait été supposé.

IV.3.5 L'arrêt en G_2/M

L'arrêt en G_2 est dose-dépendant (112). Après irradiation, l'activité H1K de Cdk1 est inhibée ce qui empêche le passage en mitose. Les cellules sont donc bloquées au checkpoint G_2/M . Ceci résulte d'altérations au niveau du taux de cycline B1 et des phosphorylations successives de Cdk1. Toutefois, les mécanismes conduisant à l'arrêt radio-induit en G_2 ne sont pas totalement identifiés. Ainsi, la diminution du taux de cycline B1 après irradiation, principalement due à la déstabilisation de l'ARNm (112), ne se produit pas systématiquement et dépend du type cellulaire. Par exemple on ne la retrouve pas dans tous les carcinomes épidermoïdes. Malgré tout, cette déplétion pourrait être à l'origine de la prolongation de l'arrêt radio-induit en G_2 (126).

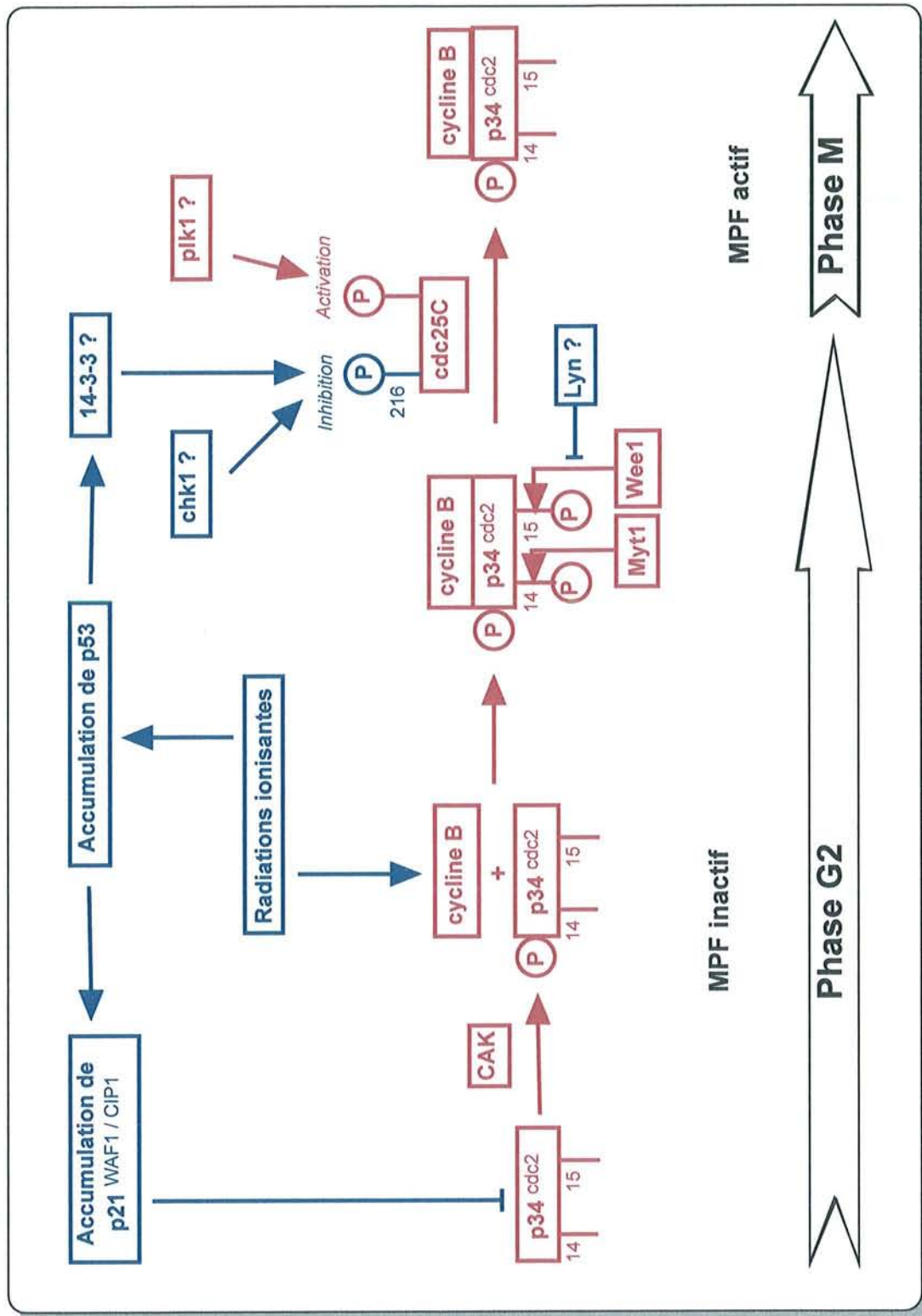


Figure 13 : Transition G₂/M normale (en rouge) et arrêt après irradiation (en bleu).
D'après Hwang *et al.*, 1998 (112).

Le second mode de régulation du point de contrôle G₂/M concerne l'inhibition de l'activation de cdc25C ce qui conduit à une phosphorylation persistante de Cdk1, le MPF reste donc inactif et bloque la progression en phase G₂. Il semble que la phosphorylation du résidu sérine 216 de cdc25C par la kinase chk1 ainsi que par des protéines kinase de la famille 14-3-3 (superfamille des kinases SRC) joue un rôle important. Ainsi inactivée, cdc25C ne peut procéder à la déphosphorylation du MPF inactif. Il a également été montré que l'inhibition de la phosphorylation de Cdk1 au niveau de la tyrosine 15 peut être régulée par l'activation de la protéine Lyn (112).

Il est habituel de décrire l'arrêt en G₂/M comme indépendant de p53. Toutefois, certaines kinases de la famille 14-3-3 sont activées par les dommages de l'ADN par l'intermédiaire de p53. De même, p21^{WAF1/CIP1} qui est sous le contrôle de p53, peut inhiber Cdk1, mais faiblement (127). Une autre étude a montré que Cdk1 est capable de phosphoryler p53 *in vitro* conduisant à son activation en réponse à une irradiation. L'inhibition de Cdk1 consécutive à une telle irradiation pourrait alors conduire non seulement à l'arrêt en G₂/M mais également à une régulation négative de l'apoptose dépendante de p53. Toutes ces données suggèrent que p53^{wt} intervient dans le blocage en G₂/M mais de façon secondaire (112).

La redondance des systèmes de contrôle semble indiquer l'importance du passage G₂/M dans la sensibilité aux radiations ionisantes notamment au niveau du maintien de l'intégrité du génome avant la mitose. En effet, l'abrogation artificielle de ce point de contrôle par la caféine ou des analogues, conduit à une radiosensibilisation des cellules. Une corrélation a ainsi été mise en évidence entre la durée de l'arrêt en G₂/M et la radiorésistance (128, 129).

Bien que les mécanismes ne soient pas totalement élucidés, l'arrêt radio-induit en G₂/M est régulé par des modifications de phosphorylation de Cdk1 et sa durée est contrôlée par le taux de cycline B1. Les voies conduisant à l'arrêt en G₂/M sont résumées sur la Figure 13.

IV.4 Mécanismes de réparation des radiolésions de l'ADN

L'action létale des radiations est principalement due aux dommages de l'ADN. Les cassures double-brin représentent l'évènement majeur de la mort cellulaire dont on sait qu'elle est due à la présence d'une cassure double brin non réparée 24 heures après irradiation (130). Toutefois ceci varie selon le type cellulaire. Les mécanismes de réparation mis en jeu diffèrent selon le type de lésion induit par les radiations ionisantes au niveau de l'ADN.

IV.4.1 Réparation des bases

Les bases endommagées par le radical hydroxyle ainsi que les dommages endogènes sont efficacement réparés par le système Base Excision Repair (BER). Le BER (voir Figure 14) est une succession de quatre étapes enzymatiques (DNA glycosylase+AP lyase, endonucléase ou désoxyribophosphodiesterase, polymérase, ligase) qui permet la réparation des bases puriques et pyrimidiques uniques, perdues ou endommagées par les radicaux libres. Le BER permet également la réparation des cassures simple brin mais sans que la première étape (glycosylase/lyase) ait lieu car la cassure est déjà présente. De même, les sites modifiés au niveau des sucres et des phosphates sont excisés par une endonucléase sinon la polymérisation de l'ADN ne peut pas être réalisée par l'ADN polymérase (90).

La réparation par le système BER, de plusieurs sites endommagés et distants d'au moins 5 à 7 bases, peut aboutir à l'induction de cassures double-brin létales pour la cellule. S'il y a moins de 5 bases entre les sites endommagés, la cellule ne répare que l'un d'eux, l'autre ne l'est pas.

Un cas particulier concerne les lésions dues aux O⁶-méthylguanine, directement mutagènes, qui sont réparées par le transfert du groupe méthyle sur une enzyme spécifique, la O⁶-méthylguanine méthyltransférase (MGMT). Le taux intracellulaire de MGMT est directement lié à la sensibilité aux agents alkylants (131).

Un autre système appelé "Nucleotide Excision Repair" (NER) ou excision-resynthèse, permet d'exciser un ou plusieurs nucléotides endommagés par des pontages intra ou inter-brins lors d'une irradiation UV (dimères de thymidine) et lorsque se forment des lésions dues à certains médicaments (mitomycine C, psoralène, cis-platine) ou agents cancérigènes (hydrocarbures polycycliques, amines aromatiques) (131).

Dans tous les cas, c'est le changement de conformation de l'ADN dû aux dommages qui active les enzymes constitutives des systèmes de réparation (132).

Aux doses d'irradiation habituellement létales pour la cellule (quelques Gy), le nombre de sites sur l'ADN qui sont endommagés par les radiations est faible comparé au "bruit de fond".

Toutefois, ces dommages radio-induits de l'ADN, dont la plupart résulte d'attaques de radicaux libres, seront sujets à une réparation par un processus BER ce qui, tout en protégeant les cellules, influence la mutagénicité et la cytotoxicité des radiations ionisantes (90).

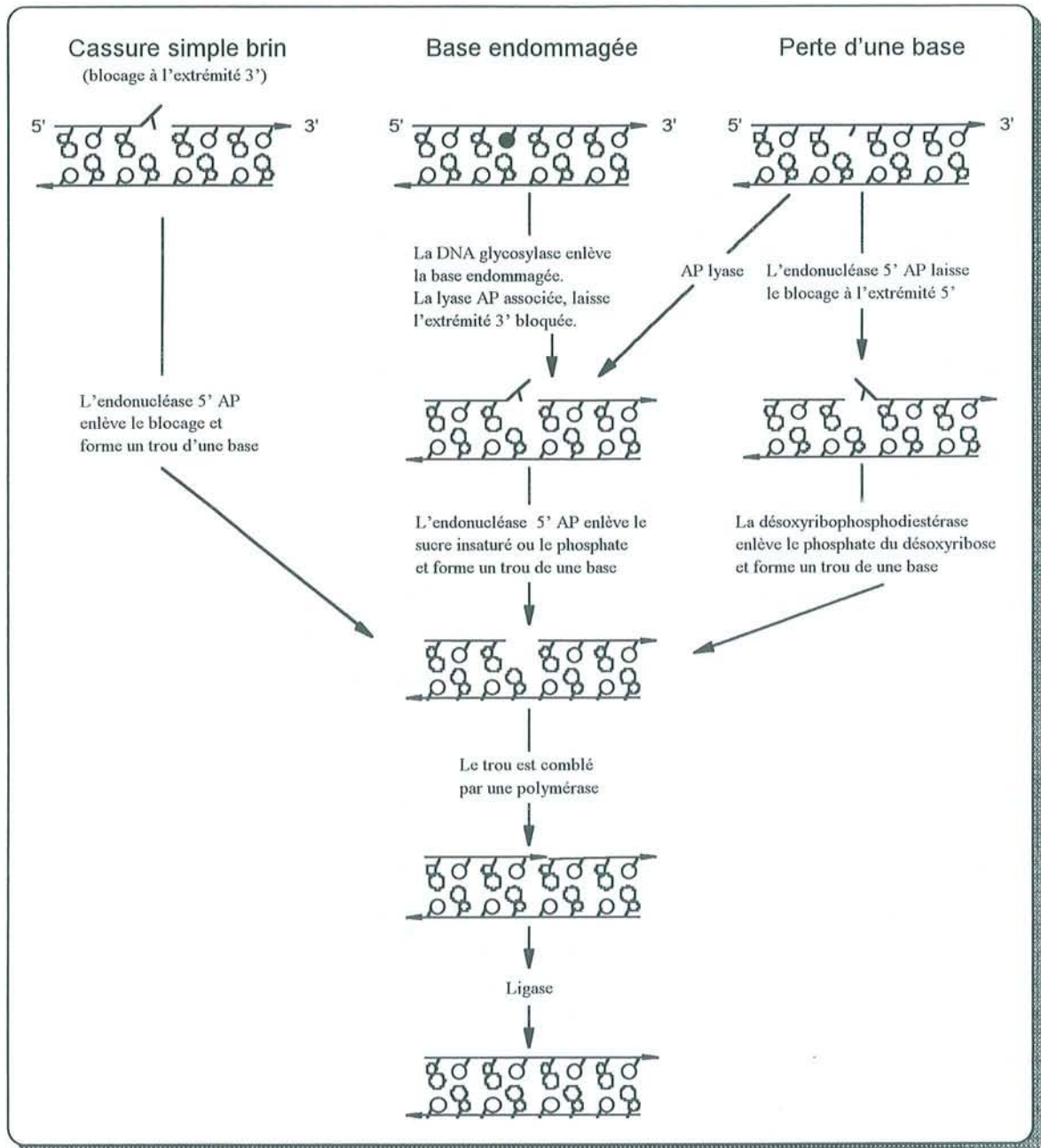


Figure 14 : Système Base Excision Repair. D'après Wallace *et al.*, 1998 (90).

IV.4.2 Réparation des cassures

Bien que pouvant être induites indirectement lors de la réparation d'altérations simples ou multiples de l'ADN, les cassures double-brin se produisent aussi directement. Ainsi, on estime

qu'une irradiation de 1 Gy engendre environ 1 000 cassures simple brin et 25 à 40 cassures double-brin par cellule diploïde quel que soit son type (133). La majorité de ces cassures est réparée par des systèmes enzymatiques constitutifs mais induits par des senseurs qui détectent les lésions de l'ADN (132).

Les cassures simple brin, efficacement et rapidement réparées (quelques minutes) (133), ne représentent pas les lésions les plus létales pour la cellule. Ces dommages qui peuvent être réparés par le système BER (90) (voir chapitre précédent et Figure 3-9), sont aussi reconnus par une enzyme, la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) qui se fixe sur les extrémités et les protège de la dégradation jusqu'à la ligation (131).

L'induction des systèmes de réparation fait nécessairement appel à des "senseurs" qui ne sont pas identifiés de manière certaine. Toutefois, la quantité importante de molécules de PARP par noyau (10^5) ainsi que son renouvellement rapide après irradiation en font un candidat potentiel pour la détection des dommages radio-induits. Sa liaison à l'ADN entraînerait son automodification, elle serait alors capable de "recruter" des protéines effectrices telles que p53, p21, DNA-PK en se liant de manière non covalente à un motif protéique de 22 acides aminés (134). La fixation aux cassures et l'autoactivation de la PARP protégerait également les cellules de la recombinaison illégitime.

Les cassures double brin radio-induites sont certainement les lésions les plus létales pour la cellule. La complexité de ces dommages, qui dépend de la nature des radiations utilisées, nécessite des systèmes de réparation plus complexes qu'une simple ligation des extrémités libres (133, 135). Ainsi, plusieurs systèmes enzymatiques contribuent à leur réparation. Outre les processus minoritaires par Recombinaison Homologue (HR) et Single Strand Annealing (SSA), le système Non Homologous End-Joining (NHEJ) est le mode principal de réparation des cassures double brin dans les cellules de mammifères (135).

La réparation par NHEJ fait appel au complexe enzymatique de la DNA-PK. Il est composé des sous unités Ku 70 et 80 qui sont des protéines nucléaires très abondantes. Leur grande affinité pour les cassures double brin de l'ADN, sans spécificité de séquence (135), permet la fixation de la DNA-PKcs (450 kDa), la sous unité catalytique, et son activation par autophosphorylation (132, 135). Ce complexe DNA-PK empêche la dégradation de l'ADN par les exonucléases nucléaires ; de plus, sa liaison à d'autres protéines permet de stabiliser sa structure afin de faciliter la ligation des extrémités libres par le complexe XRCC4/DNA ligase

IV (135). Activé par les cassures double brin, le complexe DNA-PK permet alors la phosphorylation et donc l'activation de plusieurs facteurs de transcription dont la p53 (131).

Il a été suggéré que des différences dans l'organisation de la chromatine pouvaient influencer les systèmes de reconnaissance et/ou de réparation des dommages de l'ADN, expliquant ainsi les variations de radiosensibilité intrinsèque (133). Ainsi, la radiosensibilité est probablement liée à la cinétique de réparation des cassures double brin (133) alors que l'effet cellulaire létal attribué aux radiations ionisantes dépend principalement de cassures double brin non réparées 24 heures après l'irradiation (130, 136).

Il est à noter qu'une déficience génétique de l'un de ces gènes de réparation provoque des maladies caractérisées par une hypersensibilité aux radiations ionisantes. C'est notamment le cas de l'*Ataxia Telangectasia* due à l'inactivation du gène ATM. Le produit de ce gène appartient à la superfamille des phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) tout comme la DNA-PKcs et est impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN (137).

Dans tous les cas, l'absence ou un déficit de réparation de lésions radio-induites de l'ADN contribuent à la carcinogénèse ou à la mort cellulaire selon les sites touchés.

IV.5 La mort cellulaire

Le but ultime d'une irradiation en radiothérapie est la destruction des cellules tumorales. Avant la description de l'apoptose par Kerr *et al.* en 1972 (138), les radiobiologistes pensaient que les cellules irradiées mourraient uniquement de manière différée par mort post-mitotique.

IV.5.1 Mort différée

La mort post-mitotique, caractéristique des populations cellulaires proliférantes, est définie comme étant l'impossibilité d'une prolifération illimitée. Certes, dans les heures qui suivent l'irradiation, la cellule peut mourir et disparaître mais cette mort immédiate ne se produit habituellement que pour des doses extrêmement élevées, très supérieures aux doses tolérées en radiothérapie oncologique. De manière générale, la cellule poursuit son existence immédiate en assurant ses fonctions métaboliques, mais lorsqu'elle atteint la mitose, les dommages létaux radio-induits au niveau de l'ADN l'empêchent de se diviser (139). Une autre possibilité est la réussite d'une ou de plusieurs divisions et la naissance de cellules filles apparemment normales, mais la probabilité d'atteindre plusieurs générations ultérieures

diminue rapidement et ceci, au bout de 4 à 5 générations (40). La perte de l'aptitude à la prolifération indéfinie de la cellule irradiée définit ici la mort différée. Au contraire, une cellule irradiée, considérée comme survivante lorsque sa descendance a dépassé la 5^{ème} génération, garde son pouvoir de prolifération et sa capacité à former une colonie (ces cellules sont dites "clonogéniques"). Cela n'exclut pas la présence dans ces cellules d'anomalies chromosomiques compatibles avec la survie.

Cette "mort différée" a des conséquences cliniques car la vitesse de régression tumorale après irradiation est en relation avec l'activité mitotique et proliférative de la tumeur.

IV.5.2 Concept actuel

L'apoptose est le second mode de mort cellulaire. Il a en effet été montré que l'irradiation de cellules lymphocytaires entraînait la mort sans qu'une mitose soit nécessaire.

Depuis, de nombreux travaux ont été consacrés aux mécanismes de l'apoptose et il apparaît désormais que pour de nombreux types cellulaires, incluant des lignées tumorales, les radiations tuent les cellules non seulement par l'intermédiaire des dommages chromosomiques létaux mais aussi et surtout en déclenchant leur apoptose. Celle-ci peut se produire en l'absence de lésions génomiques létales. Les cassures double brin induisent une apoptose rapide (140), dès les premières heures après irradiation, et ont une efficacité supérieure aux cassures simple brin (141). Les aberrations chromosomiques résultant de la réparation défectueuse des cassures double brin induisent une réponse apoptotique plus tardive survenant après une ou plusieurs mitoses (142).

Les radiations ionisantes induisent donc deux types de morts cellulaires (résumées par la Figure 15) habituellement appelées mort mitotique (ou reproductive) et mort interphasique faisant référence à l'apoptose (143).

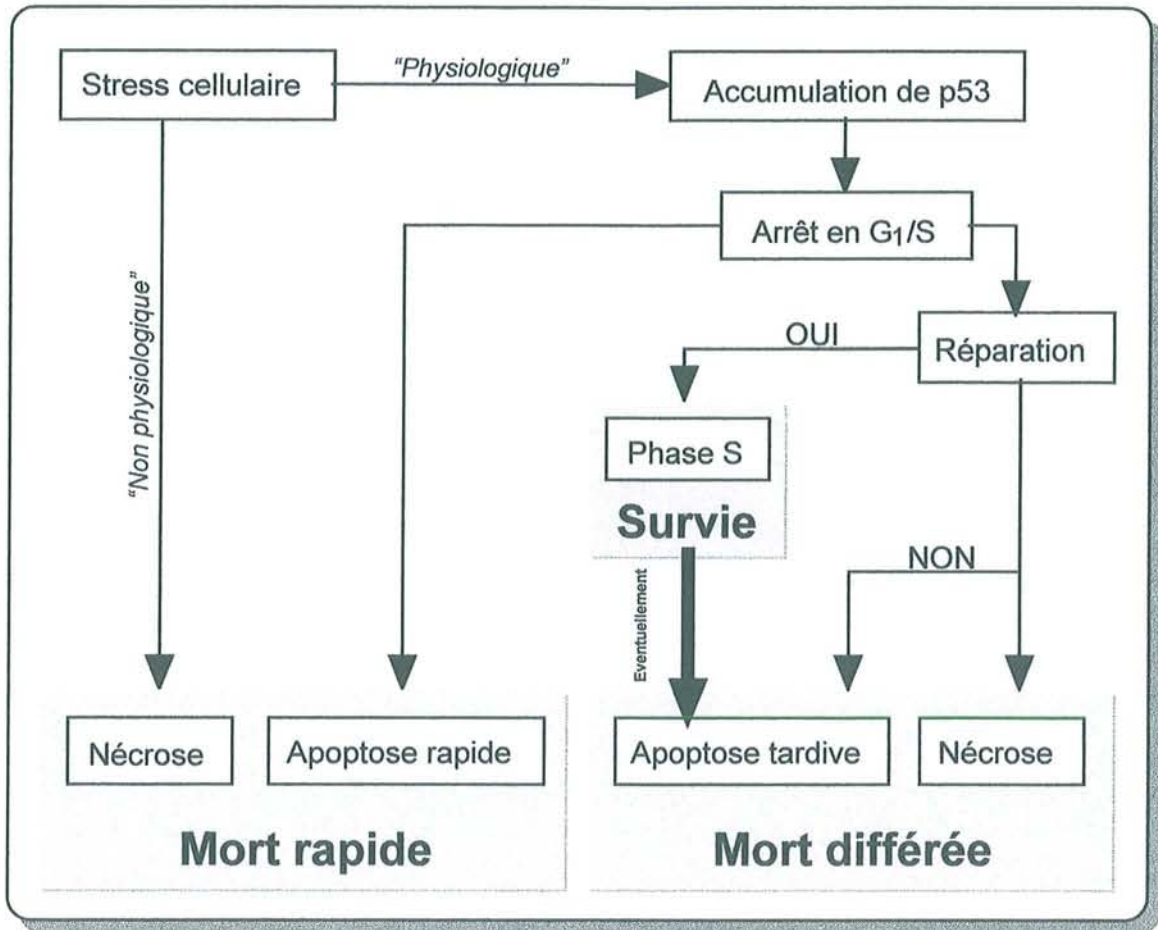


Figure 15 : Les différents types de morts cellulaires radio-induites et les voies d'induction.

IV.5.3 Nécrose

La nécrose se produit lorsque les cellules sont exposées à des variations extrêmes des conditions physiologiques normales (hyperthermie, irradiation, hypoxie...) qui entraînent des dommages cellulaires notamment au niveau de la membrane plasmique. Les échanges ioniques ne sont plus contrôlés et la cellule n'a plus la capacité de maintenir son homéostasie. L'eau entre donc librement dans la cellule. Le gonflement des organites intracellulaires, et notamment les mitochondries, est typique de ce type de mort. La lyse de lysosomes provoque la libération du contenu enzymatique hydrolytique dans la cellule participant ainsi à sa destruction. Lors de la lyse, le contenu cytoplasmique est libéré dans le milieu extracellulaire.

In vivo, la mort cellulaire par nécrose est souvent associée à une réponse inflammatoire provoquée par la libération d'enzymes lysosomales (139, 144).

IV.5.4 Apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire déterminé génétiquement. C'est un phénomène lent nécessitant un enchaînement de réactions parfaitement régulées (144). Elle peut se produire dans des conditions physiologiques normales. La cellule est un participant actif à sa propre mort : on parle aussi de "suicide cellulaire" (139).

Ce type de mort, identifié par Kerr, Wyllie et Currie en 1972 (138) est impliqué dans des fonctions physiologiques contribuant au maintien de l'homéostasie en programmant la destruction des cellules (132). Elle existe durant l'embryogenèse, le développement du système nerveux ou l'atrophie tissulaire endocrino-dépendante (143). L'apoptose peut également être induite par des agents exogènes tels que les radiations ionisantes, l'hyperthermie ou encore les molécules anti tumorales (144).

IV.5.4.1 Description physiologique

L'apoptose affecte des cellules isolées et se manifeste morphologiquement par la formation de petits fragments cytoplasmiques sphériques ou ovoïdes, appelés vésicules ou corps apoptotiques, qui peuvent contenir des résidus du noyau (145). Structurellement, l'apoptose se déroule en trois phases principales (Figure 16).

La première phase est caractérisée par la survenue brusque d'altérations nucléaires et cytoplasmiques (145). Alors qu'à l'état normal, la chromatine se présente sous l'aspect d'amas de volume variable distribués irrégulièrement contre la membrane interne du noyau, celle de la cellule apoptotique se condense pour former un croissant homogène plus ou moins volumineux (144) caractéristique des cellules en apoptose précoce et est appelée margination. La chromatine subit alors un clivage internucléosomique dû à une endonucléase Ca^{2+} , Mg^{2+} dépendante, caractérisé par l'apparition, lors d'une électrophorèse en gel d'agarose, de fragments d'ADN de 180 ou de multiples de 180 paires de bases correspondant à la distance séparant les nucléosomes. Ces fragments peuvent être détectés par d'autres méthodes telles que le TdT mediated digoxigenin-dUTP nick and end labelling (TUNEL) ou encore par la technique du pic sub-G₁ en cytométrie en flux (146, 147). Dans le cytoplasme, les organites se rapprochent et s'agglomèrent. L'activation d'une transglutaminase de type II entraîne la

formation d'un réseau protéique insoluble qui prévient la rupture lysosomiale et préserve l'intégrité des organelles. Alors que la membrane plasmique reste imperméable aux colorants vitaux, la cellule prend un aspect arrondi tandis que les desmosomes sont détruits et que les espaces intercellulaires s'élargissent (85, 144).

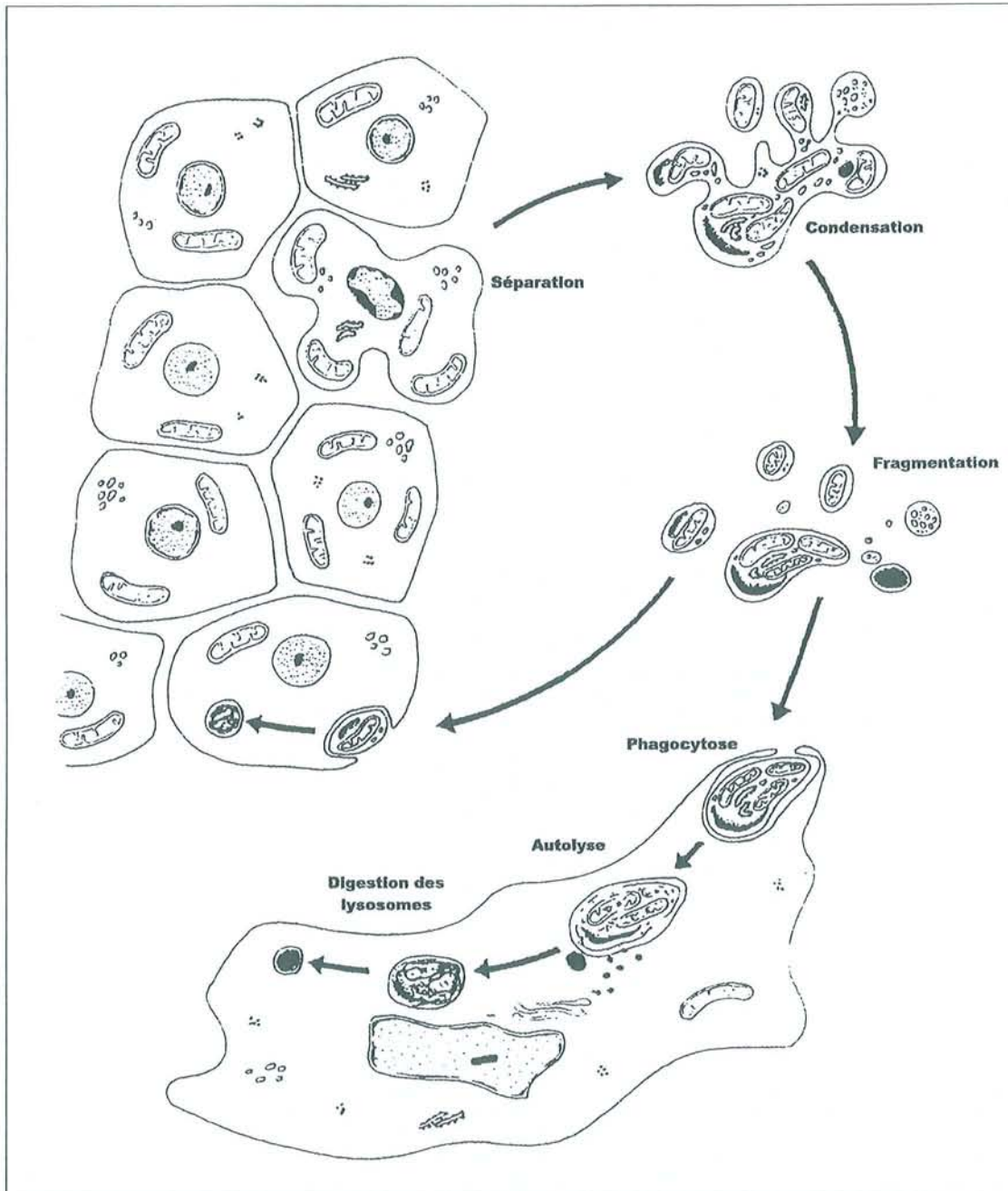


Figure 16 : Aspects morphologiques de l'apoptose (d'après Kerr *et al.*, 1972 (138)).

La deuxième phase, qui peut chevaucher la première, est marquée par l'apparition de vésicules cytoplasmiques traduisant d'importantes modifications du cytosquelette (85). A ce stade, la cellule voit son volume considérablement diminuer et sa densité augmenter (145). Ce phénomène est accompagné d'une altération des glycoprotéines de la membrane cytoplasmique. On observe notamment la perte des molécules d'acide N-acétylneuraminique favorisant la reconnaissance et la phagocytose de la cellule apoptotique par les macrophages et les cellules adjacentes (144). De manière concomitante, on constate une perte rapide de l'asymétrie des phospholipides membranaires. Ainsi les phosphatidylsérines présentes au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique sont extériorisées au niveau du feuillet externe. Cette étape du processus apoptotique permettant, là aussi, la reconnaissance puis la phagocytose des cellules, est mise à profit pour détecter la présence d'apoptose dans une population cellulaire. On utilise pour cela de l'annexine V marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), une protéine se fixant spécifiquement sur les phosphatidylsérines (148).

La troisième étape est marquée par la dégradation des corps apoptotiques. Une fois phagocytées, ces vésicules sont lysées à l'intérieur des phagosomes : la lyse n'est pas due à un mécanisme lysosomique mais à l'incapacité pour la membrane vésiculaire de maintenir l'homéostasie ionique. Les lysosomes interviennent au niveau de la dégradation terminale des corps apoptotiques phagocytés, qui sont finalement détruits sous la forme de vésicules lysosomales résiduelles. La mort apoptotique ne s'accompagne d'aucune réaction inflammatoire lymphocytaire et ne modifie pas l'architecture des tissus contrairement au phénomène nécrotique (139, 145). *In vitro*, les vésicules s'accumulent dans le milieu de culture pendant cette phase. Elles perdent alors leur intégrité membranaire et peuvent être détectées au moyen de colorants d'exclusion. La présence dans ce cas de débris cellulaires est caractéristique d'un processus de nécrose secondaire (85).

IV.5.4.2 Comparaison apoptose/nécrose

L'induction de l'apoptose *in vitro* et encore plus *in vivo* s'accompagne toujours de nécrose que celle-ci soit induite de manière directe ou qu'elle soit secondaire au processus apoptotique.

Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose.

Apoptose	Nécrose
<i>Caractéristiques morphologiques</i>	
<ul style="list-style-type: none"> . Agrégation de la chromatine à la membrane nucléaire . Condensation cellulaire . Bourgeonnement des membranes (corps apoptotiques) . Organites longtemps intacts . Mitochondries longtemps fonctionnelles 	<ul style="list-style-type: none"> . Perte de l'intégrité membranaire . Gonflement de la cellule . Floculation de la chromatine . Mitochondries et autres organites rapidement altérés . Noyau longtemps intact . Lyse cellulaire
<i>Caractéristiques biochimiques</i>	
<ul style="list-style-type: none"> . Processus régulé impliquant de nombreux gènes . Processus actif ATP-dépendant . Fragmentation prélytique de l'ADN (évènement précoce de la mort) 	<ul style="list-style-type: none"> . Perte de régulation de l'homéostasie ionique . Processus passif sans besoin énergétique . Fragmentation postlytique de l'ADN
<i>Signification physiologiques</i>	
<ul style="list-style-type: none"> . Mort de cellules individuelles . Induction par des stimuli physiologiques . Phagocytose par les cellules adjacentes et macrophages . Pas de réponse inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> . Mort de groupes de cellules . Phagocytose par les macrophages . Réponse inflammatoire significative

Il est important de faire la différence entre ces deux types de mort cellulaire car ils constituent deux phénomènes totalement opposés. La Figure 17 permet de visualiser les différences morphologiques entre l'apoptose et la nécrose. En effet, contrairement à l'apoptose, la nécrose est une mort passive d'un groupe de cellules entier survenant rapidement. Elle est causée par des conditions non physiologiques extrêmes. Il est à noter que la plupart des agents capables d'induire l'apoptose, provoque une nécrose lors d'expositions à de fortes doses (85, 144). Le Tableau 6 récapitule les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des deux phénomènes.

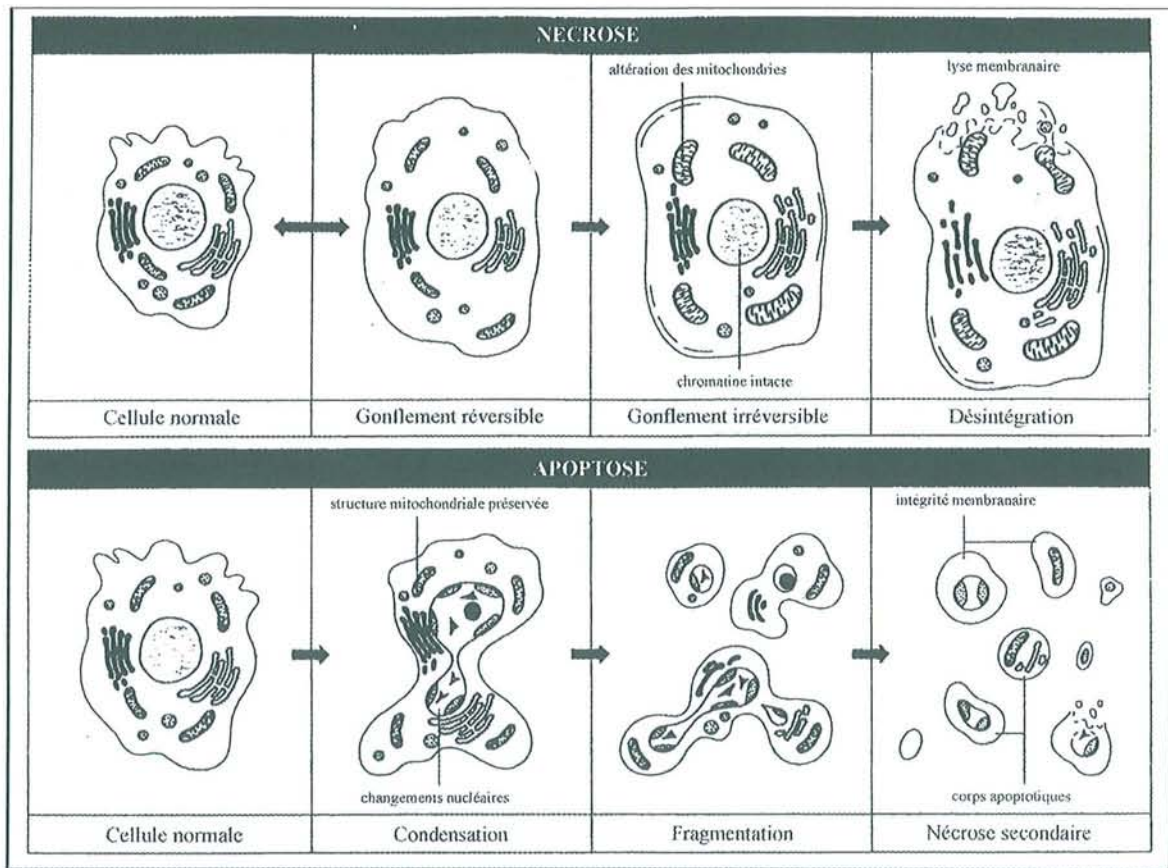


Figure 17 : Comparaison morphologique de la nécrose et de l'apoptose.

IV.5.4.3 Régulation de l'apoptose.

A la vue des études réalisées, il apparaît que le signal apoptotique peut être transduit par plusieurs voies qui varient selon le stimulus de départ. Les gènes qui contrôlent l'information apoptotique sont nombreux et les mécanismes qui les régulent ne sont qu'en partie élucidés. Lors d'une irradiation, la membrane plasmique et l'ADN sont les deux cibles principales initiatrices de processus apoptotiques (bien que peu étudié, il semble aussi que le rôle des mitochondries soit important). L'ensemble des voies de régulation de l'apoptose radio-induite est résumé sur la Figure 18.

IV.5.4.3.1 La voie dépendante de p53.

Lorsque des cellules sont irradiées, l'ADN subit des dommages (voir chapitre IV.4) qui induisent l'accumulation de p53^{wt} qui lui-même transactive la synthèse d'autres protéines

telles que p21 (inhibiteur universel de Cdk) ou Bax qui est un membre de la famille Bcl-2 dont d'autres représentants sont à l'inverse, réprimés tels que Bcl-2 ou Bcl-X_L.

Bcl-2, (*B-cell lymphoma/leukemia 2*), est le prototype d'une famille de 9 gènes contrôlant la mort cellulaire programmée. Situé sur le chromosome 18, ce proto-oncogène est surexprimé dans un grand nombre de cancers suite à une translocation chromosomique t(14 ; 18) (q32 ; q21), Bcl-2 se trouvant alors sous l'influence du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines. La protéine Bcl-2 fait 24-26 kDa et possède 239 aminoacides dont 19 constituent une "queue" hydrophobe appelée séquence d'insertion. Celle-ci conditionne l'ancrage non spécifique de la protéine à différents sites membranaires, membranes mitochondriales externes, réticulum endoplasmique et membrane périnucléaire (149).

La protéine Bcl-2 a pour rôle de maintenir la survie cellulaire mais elle ne stimule pas la prolifération. De nombreuses expériences ont montré que Bcl-2, par ailleurs inhibé sous l'action de p53, empêchait la mort cellulaire programmée de cellules soumises à des stimuli inducteurs d'apoptose tels que les radiations U.V. et γ , des agents chimiothérapeutiques ou encore les glucocorticoïdes. De plus, Bcl-2 inhibe la peroxydation lipidique engendrée par des espèces réactives de l'oxygène. L'action antiradicalaire de Bcl-2 pourrait expliquer une partie de ses effets anti-apoptotiques (150). Bcl-2 semble aussi réguler la concentration cytosolique en ions Ca²⁺ probablement en inhibant leur libération du réticulum endoplasmique. Ceci aurait pour conséquence d'empêcher l'activation des endonucléases calcium-dépendantes chargées de dégrader l'ADN génomique lors du processus apoptotique (139).

Il semblerait que l'état de phosphorylation conditionne l'activité de ces protéines. Parmi les 9 membres de la famille Bcl-2, on distingue les gènes pro-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1, Mcl-1, A1) et les gènes anti-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_S) qui sont capables de se dimériser entre eux selon différentes combinaisons (151). Les cibles des protéines de la famille Bcl-2 ne sont pas toutes connues mais il semblerait que ce soit la proportion respective des différents homo et hétérodimères formés qui soit déterminante pour engager une cellule vers l'apoptose ou la survie. Le terme de "rhéostat cellulaire" a été proposé pour rendre compte de cette situation. Ainsi, le ratio Bcl-2/Bax a été pris comme référence pour déterminer l'orientation vers la survie ou vers l'apoptose mais cette corrélation n'est pas toujours vérifiée (152). En outre, ce système est sous la dépendance de p53 qui est capable de réprimer l'expression de Bcl-2 tout en augmentant celle de Bax. Le rhéostat cellulaire pencherait ainsi en faveur de la mort cellulaire programmée, ce qui explique l'action pro-

plasmiques, est hydrolysée par les sphingomyélinases neutre et acide activées par les radiations ionisantes. Il a été montré que la PKC (Protéine Kinase C) régule cette voie en inhibant la formation de céramides (155). Les céramides peuvent également être produits par la céramide synthase dont l'activité enzymatique augmente en réponse aux dommages radio-induits (156). Un équilibre s'établit donc entre ces deux voies de transduction du signal. Le processus apoptotique dépendant des céramides emprunte alors la voie JNK/SAPK (c-jun Kinase/Stress-Activated Protein Kinase) qui conduit à l'activation de la caspase-3 sans que les intervenants ait été identifiés pour l'instant (80, 155). Bien que l'action des céramides sur la libération des protéines mitochondriales soit décrite, les détails ne sont pas encore connus. Il a été montré que cette voie est indépendante de p53 et de la présence de cassures de l'ADN (155, 157).

IV.5.4.3.3 La voie Fas/FasL

La liaison de Fas (Apo-1/CD95) à FasL (FasLigand) conduit à la formation d'un complexe avec la procaspase-8 par l'intermédiaire de la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain). La caspase-8 activée induit alors une cascade d'activation de caspases, notamment celle de la protéine Bid qui interagit sur la libération du cytochrome c depuis les mitochondries. Tout comme pour d'autres effecteurs, l'accumulation de Fas et de FasL après irradiation a été rapporté mais son importance reste controversée car elle semble avoir peu d'influence dans le déclenchement de l'apoptose radio-induite. Récemment, il a été suggéré que p53 pouvait réguler la disponibilité de Fas lors de son transport depuis le cytoplasme (157) expliquant de ce fait l'absence d'apoptose Fas dépendante lorsque p53 est muté.

IV.5.4.3.4 Les caspases

Toutes ces voies aboutissent à l'activation d'un régulateur "cytoplasmique commun" qui semble être un groupe de protéines : les caspases (143). Les caspases sont un groupe de 14 protéases à cystéine synthétisées sous forme de proenzymes inactives qu'un signal apoptotique permet de convertir en enzymes matures. Les caspases diffèrent dans la longueur et la séquence de leur prodomaine N-terminal, mais on les distingue aussi par leur processus d'activation et la présence d'un module d'interactions protéiques (CARD, DED). Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 7. Toutes les caspases ont une affinité commune pour les substrats comportant un résidu aspartate en première position. L'activation des caspases mène donc au clivage de substrats nécessaires au processus apoptotique.

Tableau 7 : Caractéristiques des caspases (CARD : Caspase Recruitment Domain, DED : Death Effector Domain). D'après Zhivotovsky *et al.*, 1999 (143).

Prodomaine N-term	Long		Court
Domaine	CARD	DED	
Procaspases	1, 2, 4, 9	8, 10	3, 6, 7, 11, 12
Activation	Autoprotéolyse par oligomérisation		1 - Clivage initial 2 - Autoprotéolyse

Après irradiation, la libération de protéines mitochondriales telles que le cytochrome c, considéré comme un point de non retour dans l'activation de l'apoptose, permet l'activation de la procaspase-9 grâce à sa liaison avec la protéine Apaf-1 dans le complexe apoptosome (voir Figure 18). Il a été proposé que ce relargage du cytochrome c serait le facteur déclenchant de l'apoptose induite par les espèces réactives de l'oxygène générées par les radiations ionisantes au niveau de la membrane mitochondriale (158).

Le relargage des protéines mitochondriales est contrôlé par des protéines de la famille bcl-2. Ainsi Bcl-2 et Bcl-X_L exercent une action antiapoptotique alors que l'activation est assurée par les membres proapoptotiques que sont Bax, Bad et Bid. La caspase-9 activée initie à son tour une cascade d'activations des caspases -3, -6 et -7 qui ne sont pas absolument nécessaires à l'induction de l'apoptose radio-induite. Le même fait a été montré à propos de l'activation de la caspase-8, notamment associée à la voie Fas/FasL (143). Cet enchaînement basé sur l'activation de la caspase-9 semble être le point commun des différentes voies de la mort cellulaire programmée radio-induite (143). D'une manière générale, l'activation de plusieurs caspases semble être nécessaire à la perpétuation du signal apoptotique induit par les radiations ionisantes.

IV.5.5 Relations entre l'apoptose et la radiosensibilité

La propension des cellules à mourir selon un processus mitotique ou apoptotique conditionne l'importance des relations entre l'apoptose et la radiosensibilité. En effet, si la cellule meurt principalement par mort mitotique, l'inhibition d'une ou de plusieurs voies apoptotiques n'a

que peu d'influence sur sa radiosensibilité. Pour les cellules qui meurent plus facilement par apoptose, c'est l'influence des voies p53-dépendantes et indépendantes qui s'exprimera.

Il a été proposé d'utiliser l'expression des protéines impliquées dans les processus apoptotiques en tant que marqueurs de radiosensibilité. Le ratio Bcl-2/Bax corrèle avec la radiosensibilité dans certaines tumeurs (sein, leucémie aiguë lymphoblastique) mais pas avec d'autres (ovaire, rein, testicule) (143). De même, il a été montré qu'une déficience enzymatique dans l'une des voies, par exemple l'inactivation des sphingomyélinases, pouvait entraîner un phénotype résistant non-apoptotique (143). Le même fait a été montré entre des déficiences, notamment en caspase-9, et l'augmentation de la radiorésistance. Mais à l'heure actuelle, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'activation et/ou l'inhibition des caspases et la radiosensibilité tumorale clinique. De même, une étude réalisée par Brachman *et al.* sur 24 lignées de cancers de VADS montre que la radiosensibilité n'est pas corrélée avec l'état mutationnel de p53 (123). Une étude de Slichenmyer *et al.* n'a pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'état du gène p53 et la sensibilité à l'apoptose radio-induite de carcinomes colo-rectaux (124). Mais dans d'autres modèles cellulaires (cellules lymphoïdes, hématopoïétiques, épithéliales), l'absence d'une protéine p53 sauvage entraîne une radiorésistance due à l'absence d'induction d'apoptose. Il semble donc que la perte de fonction de p53, et donc d'apoptose p53-dépendante, ait des conséquences variables sur la radiosensibilité selon la capacité d'origine de la lignée à induire la mort cellulaire programmée. Mais d'une manière générale, du fait qu'il existe une voie p53-indépendante, l'état de p53 n'est plus considéré comme un indicateur de la réponse - tout du moins apoptotique - aux radiations ionisantes.

Malgré tout, il est connu que les tumeurs qui répondent bien aux irradiations entrent facilement en apoptose, ce qui suggère que le taux d'apoptose radio-induite pourrait servir de test prédictif de la radiosensibilité intrinsèque de plusieurs types tumoraux (143). Ainsi Sheridan *et al.* ont récemment montré qu'un ratio AI/MI (Apoptotic Index/Mitotic Index) important permet de prédire la survie à 5 ans (60) pour les carcinomes du col de l'utérus.

RESUME

L'irradiation provoque la modification de l'expression génique de nombreuses protéines telles que des facteurs de transcription (jun, fos...), de la PKC, de p53. Ce gène suppresseur de tumeur joue d'ailleurs un rôle prépondérant dans la réponse à l'irradiation puisque son inactivation est observée dans 50% des cancers des VADS. Il est impliqué dans l'arrêt en G₁/S, la réparation et l'apoptose.

Des espèces réactives de l'oxygène (O₂⁻, OH[•]) sont également produites directement ou par radiolyse de l'eau et altèrent les lipides et surtout l'ADN. Des systèmes de détoxification (glutathion, GST, MnSOD, MT...) permettent d'éviter un excès de lésions consécutives à l'irradiation.

La progression dans les 4 phases du cycle cellulaire, de radiosensibilité variable, est régulée par des cyclines et cdk. L'irradiation induit des arrêts aux transitions G₁/S et G₂/M permettant la réparation des radiolésions.

Lorsque les bases sont endommagées, elles sont réparées par le système Base Excision Repair. Les cassures simple brin sont prises en charge par la PARP alors que les cassures double brin, qui représentent l'évènement létal majeur, sont réparées par la DNA-PKcs.

Les cellules irradiées lors d'une radiothérapie meurent de manière différée principalement par nécrose et apoptose. La nécrose est une mort rapide et violente qui se produit en réponse à des variations brutales et non physiologiques des conditions environnementales. Par opposition, l'apoptose est une mort physiologique lente déterminée génétiquement. Des voies membranaires (céramide), nucléaires (p53) et mitochondriales (cytochrome c) permettent son induction liée ou non à p53. La famille des caspases représente l'effecteur final. La relation avec la radiosensibilité, si elle peut sembler évidente, dépend toutefois de la capacité des cellules à induire et à mourir par apoptose.

Chapitre V

Intérêts des sphéroïdes en radiobiologie.

Ce chapitre est basé sur la publication suivante :

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C., Guillemin F. *Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy*. Crit Rev in Oncol. Soumis

V Intérêts des sphéroïdes en radiobiologie

V.1 Introduction

Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires sont des agrégats de cellules tumorales poussant à partir d'un ou de plusieurs clones cellulaires. Ce modèle *in vitro* a une structure tridimensionnelle qui mime celle des micro-tumeurs ou des métastases et certaines de leurs propriétés. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires présentent en leur centre, une aire nécrotique plus ou moins développée selon le diamètre du sphéroïde, le type cellulaire et due à des gradients d'oxygène, de pH et de nutriments (Figure 19). Il a été démontré que les sphéroïdes conservent des caractéristiques de la tumeur d'origine à savoir une certaine différenciation cellulaire ou encore la capacité à synthétiser du matériel extra cellulaire comme le collagène, la laminine, des glycosaminoglycanes (159). Sutherland et Rofstad ont même décrit des différenciations pseudo-glandulaires de sphéroïdes issus d'adénocarcinomes coliques et de carcinomes ovariens (160). Ces caractéristiques font des sphéroïdes un puissant modèle particulièrement adapté à l'étude des radiations ionisantes notamment de la réponse tumorale à la radiothérapie.

La sensibilité aux radiations ionisantes est contrôlée par plusieurs paramètres parmi lesquels les communications et les contacts intercellulaires (161), l'oxygène (162), la réparation des radio-lésions (163) et l'induction d'apoptose (162) sont connus pour être d'un intérêt majeur. Bien que déterminant la sensibilité tumorale *in vivo*, certains de ces paramètres ne peuvent pas être facilement et correctement étudiés en culture cellulaire monocouche à cause de l'absence d'organisation structurale tridimensionnelle. La similitude des courbes de survie obtenues après l'irradiation de tumeurs et de sphéroïdes a amené Sutherland à montrer l'intérêt des sphéroïdes dans l'étude de la radiobiologie (164, 165).

SIMILITUDES AVEC LES TUMEURS

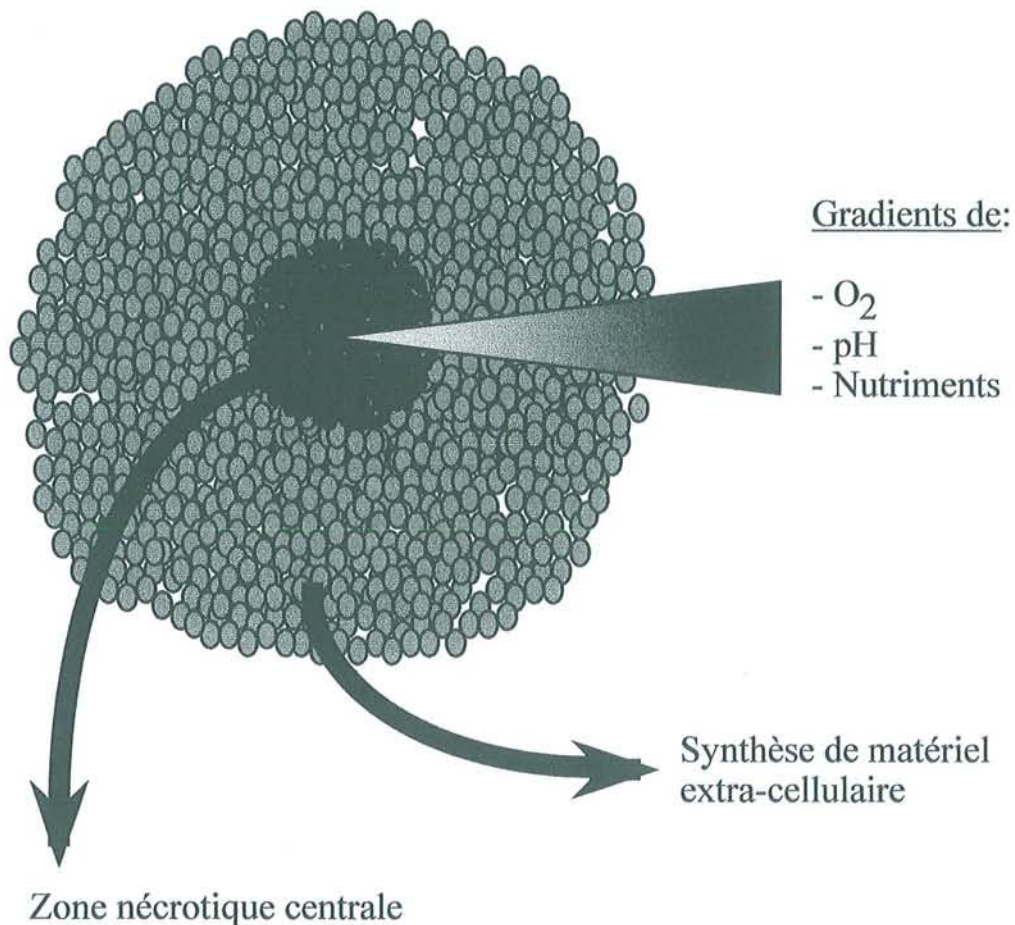


Figure 19 : Structure et particularités du sphéroïde. Des gradients se mettent en place ce qui provoque l'apparition d'une nécrose centrale.

V.2 Paramètres affectant la sensibilité des sphéroïdes aux radiations ionisantes.

V.2.1 Communications et contacts intercellulaires

La stabilité de l'organisation tridimensionnelle des sphéroïdes est rendue possible par l'établissement de contacts membranaires intercellulaires comme les microprojections et la production de matrice extracellulaire ainsi que par des communications intercellulaires telles

que des desmosomes, et des « gap junctions ». L'organisation multicellulaire rencontrée dans les sphéroïdes a été positivement corrélée à la résistance aux radiations ionisantes (166). Ce qui a été montré pour les radiations (161) a été confirmé pour l'hyperthermie (167), la thérapie photodynamique (168) et la chimiothérapie basée sur les inhibiteurs de topoisomérase II (169). Il a été proposé que l'augmentation de la survie cellulaire observée dans les sphéroïdes, comparé aux cultures cellulaires en monocouche, pouvait refléter une augmentation de la capacité cellulaire à réparer les dommages sub-létaux plutôt qu'une inactivation de la cytotoxicité des radiations. Ceci a d'ailleurs été montré dans les sphéroïdes issus de neuroblastomes et carcinomes des VADS (170, 171). Dans des lignées de mélanomes, il a été montré que la réparation des dommages sub-létaux après irradiation est directement influencée par la vitesse de croissance des sphéroïdes (172, 173) ce qui diffère d'une culture en monocouche.

Les contacts intercellulaires et les communications qui se mettent en place dans les sphéroïdes sont multifactoriels. Il a été proposé que les jonctions intercellulaires générées par les modifications membranaires ainsi que les « gap junctions » qui y sont liées, pouvaient augmenter les mécanismes de transduction au niveau membranaire (transduction de la membrane jusqu'au cytosquelette) et au niveau nucléaire (transduction de la matrice nucléaire jusqu'à la chromatine). Par conséquent, l'enroulement de l'ADN peut être affecté (168) et modifier les mécanismes de réparation de l'ADN. Une hypothèse concernant la taille des boucles d'ADN, a été proposée pour expliquer la diminution des dommages de l'ADN dans les sphéroïdes irradiés (174). Récemment, il a été montré que l'augmentation des communications intercellulaires par « gap junctions » n'était pas absolument nécessaire à l'augmentation de la radiorésistance des sphéroïdes (175).

V.2.2 Oxygène

Les cellules hypoxiques dans les tumeurs humaines sont résistantes aux radiations (162). Comme décrit précédemment, la croissance des sphéroïdes est associée au développement d'une région centrale hypoxique (176) comportant une faible PO₂ (177). Celle-ci n'est pas liée à l'épaisseur de la couche de cellules viables (178). La régulation de l'oxygénation des sphéroïdes est liée à la présence de cellules quiescentes dont l'activité mitochondriale diminue ainsi qu'à la période importante nécessaire à ce que ces cellules entrent de nouveau dans le cycle cellulaire (179).

Tout comme *in vivo*, la fraction hypoxique des sphéroïdes est résistante aux radiations ionisantes (180-182). Lorsque des sphéroïdes sont soumis à une irradiation fractionnée afin de simuler une radiothérapie, une réoxygénation est observée comme *in vivo* (183). Malgré tout, cette réoxygénation n'est pas constamment observée ce qui suppose qu'elle n'est pas le déterminant majeur de la sensibilité tumorale à l'irradiation fractionnée (184, 185).

L'augmentation de la sensibilité aux radiations par l'augmentation de l'oxygénation des tumeurs a été démontrée expérimentalement en utilisant du tétrachlorodécaoxyde sur des sphéroïdes (186). Plus récemment, il a été montré que l'augmentation de la PO₂ liée à l'exposition au paclitaxel permet une radiosensibilisation de xénogreffes (187). Ceci pourrait expliquer que même en l'absence d'arrêt du cycle cellulaire lié au paclitaxel, une radiosensibilisation soit observée dans des sphéroïdes issus de lignées de carcinomes ovariens (188) et des VADS (189). Dans un tel cas, le modèle sphéroïde montre son utilité en ne considérant que l'influence de la PO₂ sans tenir compte de l'effet antiangiogénique du paclitaxel qui a été montré *in vivo* (187). Des données obtenues à partir du modèle sphéroïde pourraient expliquer le fort taux de réponse clinique observé dans les carcinomes de poumon non à petites cellules de patients traités avec une association paclitaxel-radiothérapie (190).

L'utilisation de sphéroïdes ayant une région centrale hypoxique montrent leur utilité lors du screening préclinique de molécules de chimiothérapie. Ainsi ce modèle a récemment été utilisé pour évaluer *in vitro* l'activité potentielle de molécules cytotoxiques spécifiques des zones hypoxiques et dérivées de la tirapazamine (191).

Une autre voie de modulation de l'oxygénation cellulaire peut être envisagée à travers le contenu cellulaire en thiols. Ainsi la radiosensibilisation de sphéroïdes a été rapporté par l'intermédiaire d'agents chimiques ciblant le contenu cellulaire en thiols (192). Toutefois, aucune application clinique de ce concept n'a été rapportée.

V.2.3 Réparation des dommages

L'existence de cellules non prolifératives ou quiescentes dans les sphéroïdes est connue (160). Dans les sphéroïdes, il a été montré que les cellules quiescentes sont plus résistantes que les cellules prolifératives de par leur capacité à initier la réparation des dommages potentiellement létaux (PLD) avant d'entrer dans le cycle (193, 194). Il a été proposé que la réparation des PLD dans la population de cellulaire quiescente puisse être impliquée dans la

radiorésistance de sphéroïdes issus de glioblastome (195) de rat et de mélanome humain (196).

En plus des PLD, la radiosensibilité cellulaire est influencée par la capacité des cellules à réparer les dommages sub létaux (SLD) après irradiation. La plus grande capacité de réparation des tissus normaux constitue d'ailleurs le concept original du fractionnement en radiothérapie clinique.

Il a été montré que la réparation des SLD est plus importante dans les sphéroïdes que dans les cultures en monocouche (197). Les réparations après une irradiation fractionnée ont été montrées avec des sphéroïdes de tumeurs cérébrales d'origine murine et humaine (171, 198, 199) mais également avec des mélanomes, des carcinomes des VADS et du poumon (171). Ceci résulte probablement de processus de réparation mais aussi d'une redistribution dans les phases du cycle cellulaire et d'une repopulation (200).

V.2.4 Induction d'apoptose

L'apoptose est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire radio-induite. Les défauts d'induction de l'apoptose sont connus pour causer une résistance aux drogues antitumorales et aux radiations ionisantes. Plusieurs études ont rapporté que les contacts intercellulaires (201) et les communications au niveau de la matrice extracellulaire (202) peuvent causer l'inhibition de l'apoptose et par conséquent la résistance aux traitements anticancéreux. Avant que le concept d'apoptose soit établi (203, 204), les contacts cellulaires avaient déjà été décrits comme une cause possible de la résistance aux radiations ionisantes (205). Récemment, l'absence d'induction d'apoptose dans la radiorésistance a été montrée dans un variant radiorésistant d'une lignée cellulaire de neuroblastome sélectionnée après une irradiation fractionnée (206). Comme mentionné précédemment, les contacts cellulaires et les communications intercellulaires sont présents de manière constitutive dans les sphéroïdes ce qui peut influencer la résistance à l'induction d'apoptose. Ceci a été montré dans des sphéroïdes exposés à des agents de chimiothérapie comme le paclitaxel (207). La relation entre la résistance à l'induction d'apoptose et la radiorésistance des sphéroïdes apparaît comme étant plus complexe depuis qu'il a été montré que l'apoptose induite par l'hypoxie a une influence importante sur la proportion de cellules radiobiologiquement hypoxiques (208).

V.3 Conditions expérimentales utilisées pour les études de radiobiologie

La formation des sphéroïdes repose toujours sur le même principe : permettre l'agrégation des cellules entre elles et éviter leur adhésion au support de culture. Les techniques utilisées se basent sur les observations de Holtfreter qui en 1944 a étudié la morphologie cellulaire des embryons d'amphibiens à l'aide d'agrégats cellulaires poussant sur couche d'agar (209).

V.3.1 Techniques de culture

Plusieurs techniques sont employées mais deux se sont imposées de part leur simplicité. La plus ancienne est la culture en flacon spinner (spinner flask) ou culture « dynamique » qui a été développée par Sutherland et ses collaborateurs dans les années 70 (164). Un flacon spinner estensemencé avec des cellules qui restent en suspension dans le milieu de culture grâce à un mouvement d'agitation. Les cellules adhèrent entre elles et forment des microsphéroïdes. Le mouvement d'agitation permet d'éviter l'agrégation des sphéroïdes entre eux ainsi que leur adhésion contre les parois. Cette technique qui fait appel à des flacons spinner siliconnés pour éviter les problèmes d'adhésion et de prolifération cellulaire contre les parois, permet de cultiver à long terme une grande quantité de sphéroïdes d'aspect relativement sphérique et de taille homogène. Ces aspects sont importants pour les études de radio/chimio sensibilité ou de cytotoxicité qui nécessitent des quantités importantes de sphéroïdes afin de réduire les erreurs de mesure. L'utilisation de flacons spinner permet également un suivi et contrôle poussé de paramètres physico-chimiques tels que le pH ; la concentration en nutriments, glucose ; le taux d'oxygénation etc.

Contrairement à la méthode en flacon spinner, la culture « liquid overlay » décrite par Yuhas en 1977, est une méthode statique (210) où les sphéroïdes reposent sur une surface non-adhésive. Elle consiste à couler une fine couche d'agar ou d'agarose au fond de la boîte afin de prévenir l'attachement des cellules au support de culture. Les cellules adhèrent alors entre elles et forment des sphéroïdes. Afin de prévenir l'agrégation des sphéroïdes entre eux due à l'absence de mouvement, il est généralement nécessaire d'individualiser les sphéroïdes dans des puits après la période d'initiation de la culture ce qui permet leur suivi individuel en réponse au traitement. Il est également possible d'utiliser de faibles concentrations d'agarose (211). Le principal avantage de cette technique peu onéreuse, est d'offrir un screening rapide et facile de la capacité à former des sphéroïdes de cellules issues de biopsies et de lignées cellulaires (212).

Les deux méthodes décrites précédemment sont souvent combinées (213-215). L'initiation est réalisée en culture liquid overlay ce qui facilite l'agrégation des cellules entre elles, puis les sphéroïdes sont transférés dans un flacon spinner pour réaliser une culture en masse sans que les sphéroïdes s'agrègent. Les sphéroïdes cultivés selon ces deux techniques complémentaires n'ont pas les mêmes propriétés de croissance et d'oxygénation donc leur réponse aux traitements peut varier (216). Il est donc nécessaire de définir précisément le type d'étude envisagé et d'avoir conscience des limites du modèle.

La sélection d'une population de sphéroïdes de taille homogène peut être réalisée directement à l'aide d'une pipette pasteur sous le contrôle d'un microscope inversé. Sutherland *et al.* préconise l'emploi d'une colonne de sédimentation pour filtrer entre deux tamis cellulaires des populations importantes issues de cultures en flacon spinner (217). En effet, de nombreuses études se basent notamment sur les effets de l'oxygène lors de la réponse aux traitements anticancéreux, pour lequel, le volume des sphéroïdes est un paramètre déterminant.

Les cellules ne forment pas systématiquement des sphéroïdes et aucune relation n'a pu être mise en évidence avec leur origine histologique. De plus, le milieu de culture semble avoir une influence puisque pour former des sphéroïdes, certains types cellulaires nécessitent un apport hormonal (218, 219), en interleukine II ou encore de l'insuline (219).

Simultanément, d'autres méthodes de culture se sont développées. Il est en effet possible d'utiliser un rocker ou des bouteilles rollers mais ces méthodes sont peu employées car leur utilisation se révèle plus délicate que les flacons spinner. Une méthode originale employée par Desoize *et al* consiste à placer des cellules dans une plaque 96 puits et à lui appliquer une agitation orbitale ce qui force les cellules à s'agréger. La bonne reproductibilité de la méthode permet d'obtenir des sphéroïdes dont le nombre de cellules est connu (213).

Une autre méthode permet de contrôler la taille des sphéroïdes. Elle est basée sur l'utilisation de poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm), un polymère thermosensible qui permet l'adhésion et la prolifération des cellules (220). Un changement de température dénature le polymère et décolle la monocouche qui se replie sur elle même pour former un sphéroïde (220). L'intérêt principal de cette technique réside dans le fait qu'elle permet l'utilisation de fibroblastes habituellement récalcitrants à la formation de sphéroïdes (comme les fibroblastes ou les cellules de muscle lisse). Afin de permettre la formation de sphéroïdes par un plus

grand nombre de types cellulaires, ceux-ci peuvent être inclus directement dans un gel d'agar ou de méthyl cellulose (221), formant alors des sphéroïdes. Mais les difficultés de manipulation rendent leur utilisation délicate et sont de ce fait peu utilisés. Afin de mimer au plus proche les comportements des tumeurs, des cocultures qui associent deux ou plusieurs types de cellules ont été développés. Desoize *et al.* (213) utilise des cellules MCF-7 sensibles et résistantes qui simulent l'hétérogénéité tumorale en réponse aux traitements anticancéreux induisant un phénotype MDR. D'autres cocultures comportant des fibroblastes ont été utilisées pour se rapprocher de la structure tumorale *in vivo*.

V.3.2 Conditions de croissance

Il est bien connu que la réponse aux radiations ionisantes est fortement dépendante de l'état d'oxygénation des cellules. On estime ainsi que des cellules en hypoxie totale sont trois fois plus radiorésistantes que les mêmes cellules cultivées dans des conditions normales (222-224). Au niveau tumoral le même effet est mis en évidence. Cet aspect peut être simulé avec un modèle de culture tridimensionnelle. En effet, les sphéroïdes imitent la structure histologique et la différenciation des nodules tumoraux situés à proximité des zones vascularisées (212) ce qui présente un grand intérêt en radiobiologie.

La structure histologique d'un sphéroïde présente trois couches cellulaires qui se mettent progressivement en place : la couche externe qui prolifère rapidement, la couche interne quiescente et une zone centrale nécrotique qui apparaît lorsque le sphéroïde croît. La Figure 20 montre les principales phases de développement d'un sphéroïde.

Le développement des sphéroïdes peut être découpé en trois phases principales (215, 225). La première montre une prolifération exponentielle du volume des sphéroïdes. Celui-ci se forme à partir de l'agrégation de quelques cellules clonogéniques (aptées à proliférer). Les liaisons qui unissent ces cellules sont faibles et les micro-sphéroïdes sont donc fragiles. Dans les heures qui suivent, l'augmentation du nombre de cellules renforce la structure générale. La seconde phase voit un ralentissement de la vitesse de croissance qui devient linéaire. Des liaisons intercellulaires telles que des desmosomes ou des gap junctions se mettent en place ce qui a pour effet de rendre la structure du sphéroïde plus compacte. Pendant cette phase, deux couches cellulaires se mettent en place. La couche externe est proliférative car elle est au contact du milieu nutritif. La couche interne est essentiellement non proliférative. Ceci est dû à la mise en place de gradients oxygènes et nutritifs. En effet, plus les cellules sont situées loin

de la surface, moins l'oxygène et les nutriments du milieu sont disponibles. Simultanément le pH, l'osmolarité ainsi que la production de catabolites suivent une évolution similaire à celle des tumeurs. Ces déficits engendrent une nécrose centrale qui apparaît lorsque le diamètre atteint 200 à 500 micromètres et varie selon le type cellulaire, les conditions de culture (agitée ou statique) et les concentrations en nutriments (226). La troisième phase est caractérisée par un ralentissement de la croissance du sphéroïde jusqu'à atteindre un plateau. Le diamètre maximal d'un sphéroïde est de l'ordre de 2 à 4 millimètres mais il est très variable selon les lignées et le mode de culture.

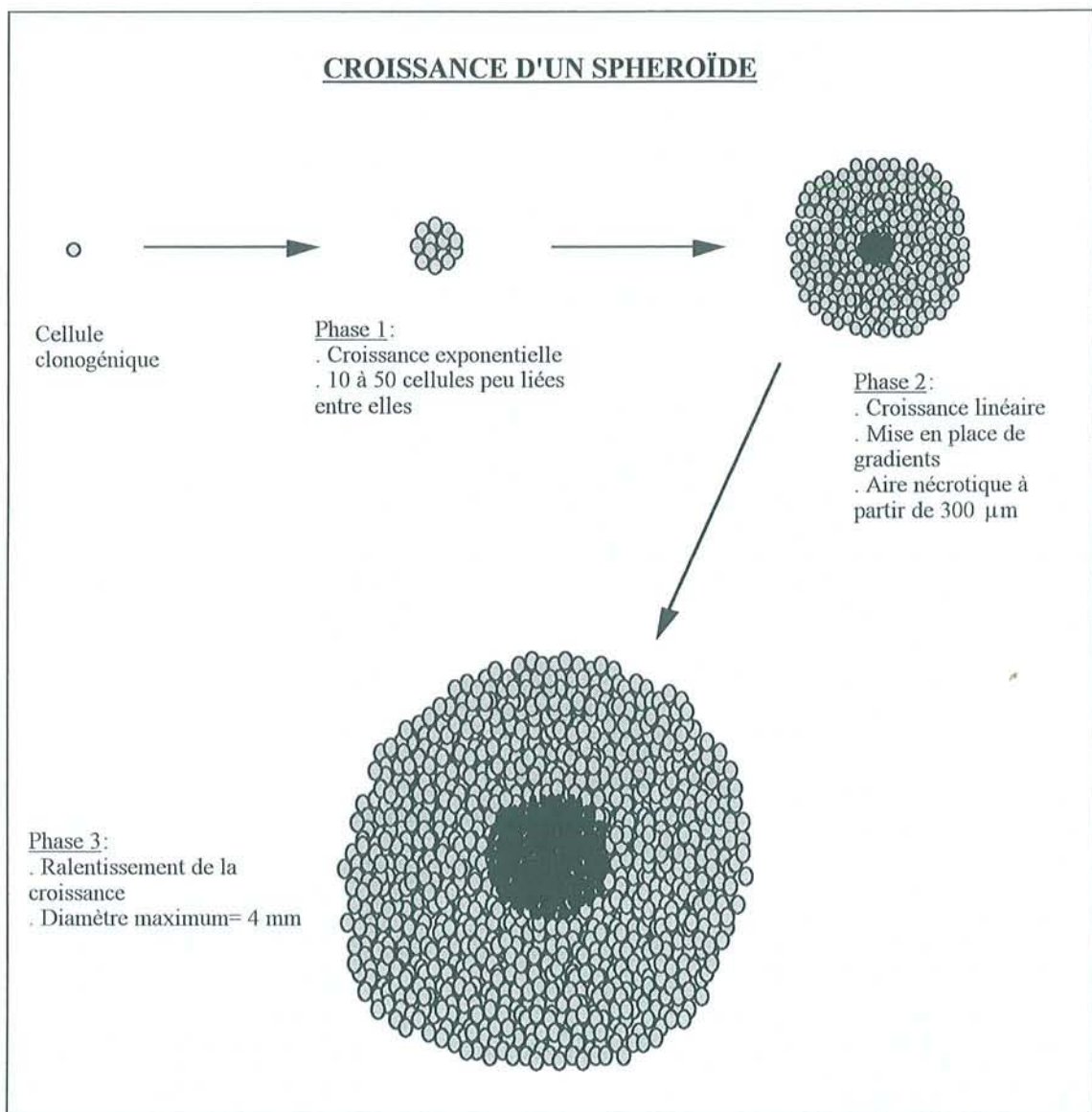


Figure 20 : Cinétique de croissance des sphéroïdes.

Il a été montré que le temps de doublement des sphéroïdes reflète le taux de croissance des tumeurs dont ils sont issus. Ce temps de doublement est par ailleurs considérablement allongé par rapport à la culture en monocouche (210).

V.3.3 Les essais basés sur les sphéroïdes

Le sphéroïde représente un puissant modèle d'étude à partir duquel il est possible d'analyser la réponse complète au niveau du sphéroïde entier mais aussi la réponse individuelle de sous populations cellulaires. En effet, l'analyse de la sensibilité des sphéroïdes aux radiations ionisantes est basée sur un ensemble de techniques issues de deux stratégies différentes : le sphéroïde entier ou dissocié. L'ensemble de ces données permet d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu lors d'un traitement anticancéreux tel qu'une irradiation.

V.3.3.1 Méthodes basées sur la dissociation des sphéroïdes

La dissociation est réalisée avec de la trypsine ou un cocktail enzymatique à base de collagénase, Dnase, pronase. Habituellement, l'action enzymatique est couplée à une action mécanique d'agitation ou de pipetage. Le taux de dissociation varie selon le type cellulaire. Ainsi les sphéroïdes Colo26 se désagrègent en totalité (Coutier *et al.*, communication personnelle) et les V79 à 80% (227), mais les EMT6 ne montrent que 20% de dissociation (228). Les agrégats résiduels sont éliminés par filtration ou sédimentation. Les techniques de dissociation sont également mises à profit pour isoler séquentiellement des populations cellulaires situées à différentes profondeurs ce qui permet d'analyser leur radiosensibilité (229). L'utilisation de sphéroïdes dissociés permet de calculer les paramètres de radiosensibilités après ajustement (fitting) des courbes dose-réponse expérimentales selon le modèle linéaire et quadratique. Les paramètres α et β représentent les pentes respectivement des parties proximale et distale de la courbe. Une fois ajustée, il est possible de calculer les paramètres SF₂ et MID qui représentent la fraction de survie à 2 Gy et la dose d'inactivation moyenne (l'aire sous la courbe).

Outre les contraintes enzymatiques et mécaniques, la dissociation peut induire des artefacts car l'environnement des cellules tumorales change énormément. Par exemple, ceci peut être

associé à une réoxygénation cellulaire et induire une entrée de cellules quiescentes (phase G₀) dans le cycle cellulaire. Ainsi la capacité de réparation et la radiosensibilité peuvent varier.

V.3.3.1.1 Essais clonogéniques

Les essais clonogéniques sont le test de référence pour déterminer la réponse aux radiations ionisantes. Il se base sur la capacité des cellules tumorales à proliférer après traitement. Des cellules irradiées ne meurent pas immédiatement et un temps de culture d'environ deux semaines est nécessaire pour que cette mort se produise.

V.3.3.1.2 Essais colorimétriques

Les essais colorimétriques sont une alternative aux essais clonogéniques. Ils présentent plusieurs avantages comme permettre le test d'un grand nombre de paramètres et ce, de façon semi-automatisable. Le test MTT développé par Mossman (230) est basé sur la capacité d'une enzyme mitochondriale à réduire le sel de tétrazolium (MTT) en cristaux de formazan de couleur pourpre. L'intensité de la densité optique permet alors de déterminer la viabilité cellulaire. Le test SRB, basé sur le contenu en protéines représentatif de la prolifération cellulaire, est plus précis et plus reproductible que le test MTT car il est indépendant du métabolisme. Il a été montré que les paramètres de radiosensibilité déterminés avec ces tests colorimétriques corrélaient avec ceux déterminés par essais clonogéniques notamment pour les faibles doses d'irradiation (231).

V.3.3.1.3 Cytométrie en flux

Ces dernières années, l'utilisation de la cytométrie en flux couplée au triage ont fait progresser l'analyse des cellules issues des sphéroïdes. Pour cela, il est nécessaire de marquer les cellules à l'aide de fluorochromes non toxiques tel que le Hoechst 33342 ou l'acridine orange qui pénètrent lentement dans les sphéroïdes et restent localisés dans les cellules après dissociation (221). Les populations cellulaires sont alors séparées selon l'intensité du marquage représentatif de leur position précise dans le sphéroïde. Les paramètres étudiés simultanément sont nombreux. Ils concernent l'analyse du cycle cellulaire, du pH, des flux calciques, l'induction d'apoptose ou encore la présence de protéines impliquées dans les phénomènes de résistances par marquage immunochimique. Les populations cellulaires triées peuvent être remises en culture afin de réaliser les essais clonogéniques ou colorimétriques pour déterminer la sensibilité aux traitements anticancéreux. Ainsi l'influence du gradient

d'oxygène sur la radiosensibilité des cellules issues de sphéroïdes peut être étudiée (221). De même, il est connu que les cellules en phase S sont radiorésistantes or les cellules en cycle sont nombreuses à la périphérie des sphéroïdes ; leur influence sur la radiosensibilité globale des sphéroïdes peut ainsi être précisée. Durand *et al.* (192, 232) ont montré ainsi que plus la population cellulaire est située profondément, plus elle est résistante après une irradiation. De plus, la fraction de survie de ces cellules suit une courbe sigmoïde ce qui montre qu'il existe une phase de transition entre l'oxygénation et l'hypoxie. De même, ces courbes sigmoïdes sont déplacées lorsque l'oxygénation du milieu de culture augmente. La cytométrie en flux est également utilisée pour suivre la pénétration, l'accumulation et le devenir de molécules anticancéreuses (233, 234). Il a ainsi été montré que les radiosensibilisants comme la buthionine sulfoximine (BSO) ou les radioprotecteurs comme l'amifostine (WR2721) agissent en modifiant l'état d'oxygénation des sous populations proches de l'hypoxie (221). La cytométrie en flux a également été utilisée pour montrer que le modèle sphéroïde permet de mimer la repopulation cellulaire tumorale notamment lors d'une irradiation fractionnée (221).

V.3.3.2 Méthodes basées sur l'analyse de sphéroïdes entiers

V.3.3.2.1 Numération des sphéroïdes et détermination de leur taille

Le sphéroïde entier est utilisé lorsque l'on veut simuler la réponse tumorale au plus juste. Ces techniques imposent un suivi pendant plusieurs semaines du nombre total de sphéroïdes et du volume moyen de chacun d'entre eux. Exprimés selon la dose de radiations ou le temps, il est possible de déterminer plusieurs paramètres qui caractérisent la réponse des sphéroïdes aux radiations ionisantes. Le suivi du volume permet d'évaluer le retard de croissance (growth delay). Lorsque des doses importantes sont appliquées (plusieurs dizaines de Gy), il est nécessaire d'attendre une reprise de croissance suffisante pour estimer le GD (habituellement entre 5 et 10 fois le volume initial). Les paramètres ID_{50} et RSV_2 sont déterminés lors de l'estimation du volume en fonction de la dose. L' ID_{50} (Inhibition Dose at 50%), équivalent à l' IC_{50} en culture cellulaire monocouche, représente la dose de radiation nécessaire pour réduire le volume du sphéroïde de 50% à un temps donné après l'irradiation. Le RSV_2 , introduit par Griffon *et al.* (58) permet d'estimer le volume résiduel après une irradiation de 2 Gy, dose communément administrée en radiothérapie. Il est à rapprocher de la SF_2 .

L'estimation du nombre de sphéroïdes contrôlés à un temps donné (plusieurs semaines) en fonction de la dose permet d'obtenir des courbes de survie similaires à celles obtenues avec des cellules en monocouche. Le modèle linéaire-quadratique permet donc de les ajuster et de calculer les mêmes paramètres mais spécifiques des sphéroïdes. Plusieurs auteurs ont montré la validité et l'intérêt de ces paramètres dans l'estimation de la réponse aux radiations ($SF_{2\text{ sph}}$ (235)). Ce type de représentation permet d'accéder également à la SCD_{50} (Spheroid Cure Dose at 50%) qui est l'équivalent de la TCD_{50} chez l'animal. Il représente la dose nécessaire pour contrôler 50% des sphéroïdes.

Alors que l'intérêt des sphéroïdes est communément reconnu, ce modèle *in vitro* est peu utilisé comme outil de développement en cancérologie préclinique. Leur utilisation sous forme non dissociée apporte certes des informations proches de la réalité clinique mais reste fastidieuse. Ceci est certainement dû à deux contraintes principales : la culture, qui est moins facile en trois dimensions qu'en monocouche et l'analyse, qui impose un comptage et un suivi réguliers. En effet chaque point expérimental résulte du suivi de plusieurs sphéroïdes. Un compteur automatique des sphéroïdes qui suit les principes d'automatisation des lecteurs de plaques de culture multipuits est actuellement en cours de développement dans notre laboratoire. Un automate couplé à un ordinateur, déplace des plaques multipuits contenant les sphéroïdes et calcule leur volume par analyse d'image. Le suivi plus fréquent ainsi que le comptage précis et rapide des sphéroïdes permettent de réduire les variations expérimentales. De plus, le procédé ne nécessite presque pas d'intervention humaine. L'utilisation de ce compteur, couplé à une optimisation des procédés de culture devrait permettre le développement de l'utilisation des sphéroïdes en cancérologie préclinique.

V.3.3.2.2 Mesures d'oxygène

Comme décrit précédemment, l'oxygène est un paramètre de grande importance dans la réponse aux radiations ionisantes. La mesure de la pression partielle d'oxygène peut être effectuée par des méthodes polarographiques utilisant des micro-électrodes sensibles à l' O_2 (184). La détermination de la tension d'oxygène est réalisée dans une chambre de mesure permettant la circulation des gaz et de milieu pré-chauffé. Un sphéroïde est placé au fond de la chambre et est maintenu par une micropipette insérée verticalement. L'électrode placée sur un micromanipulateur est manœuvrée en position avec l'aide de deux microscopes orthogonaux (236). Le profil de la pression partielle d'oxygène est déterminé à partir des valeurs et de la position de la microélectrode.

Cette méthode est utilisée par plusieurs auteurs pour analyser l'influence des méthodes de culture (237) et de l'apport de nutriments sur la croissance des sphéroïdes liée à l'oxygénation (238). Il a été montré que la pression d'oxygène peut varier considérablement selon les lignées cellulaires (239). Donc, la mesure de la pression partielle d'oxygène et sa consommation mènent à une meilleure compréhension de la réponse des sphéroïdes à l'irradiation (240). il est également possible de travailler sur ces problèmes en calculant de manière théorique la diffusion de l'oxygène (240, 241).

V.4 Le sphéroïde comme un modèle de la radiosensibilité tumorale in vivo

Plusieurs études ont été réalisées pour analyser la capacité du modèle sphéroïde à prédire la radiosensibilité tumorale in vivo. Les premiers résultats des groupes de Sutherland et Durand (165, 225, 242) montrent que les cellules qui dérivent des tumeurs humaines expriment différents niveaux de réponse aux radiations et ouvrent de nouveaux champs d'investigation en montrant que la radiosensibilité *in vitro* peut être utilisée comme prédiction de la réponse aux radiations. Ce concept, évalué à l'origine sur des xénogreffes de tumeurs humaines, a été développé dans des études pour lesquelles la radiosensibilité de sphéroïdes formés à partir de biopsies de tumeurs humaines était comparée à la réponse clinique (51, 56). Malgré tout, peu de données sont disponibles à cause du manque d'études cliniques prospectives.

Différentes origines tumorales ont été étudiées comme le cerveau, le colon, les VADS, le poumon, le mélanome ou encore l'ovaire. Comme observé dans les xénogreffes de tumeurs humaines, des différences de radiosensibilité dépendantes du type tumoral ont été mises en évidence pour les sphéroïdes.

V.4.1 Les carcinomes des VADS

La radiosensibilité des sphéroïdes cultivés à partir de carcinome épidermoïde de la langue et de neuroblastome a été étudiée et comparée avec celle de la même lignée cellulaire poussant sous forme de xénogreffe sur des souris nudes. Il a été montré que ces deux modèles reflètent le comportement clinique de ce type de tumeurs (243). Plus récemment, la réponse aux radiations de quatre lignées de carcinome épidermoïde des VADS a été caractérisée et analysée lors d'une association avec des taxanes (paclitaxel, docetaxel) (188, 189). Malgré tout, aucune étude prospective de détermination de la radiosensibilité d'échantillons cliniques de carcinomes des VADS n'a été rapportée.

V.4.2 Les autres types

D'autres études ont été effectuées sur des tumeurs d'origines diverses (cerveau (243-246), colon (247), poumon (243, 248), mélanome (243, 245, 249, 250), ovaire (58, 250, 251)). En règle générale, la radiosensibilité des sphéroïdes est similaire à celle des xénogreffes correspondante. Mais seul le mélanome a fait l'objet d'une étude clinique prospective montrant que la radiosensibilité des sphéroïdes est similaire à celle des xénogreffes et est liée à la réponse tumorale clinique (249, 250).

V.5 Conclusion

Le sphéroïde tumoral multicellulaire est donc un modèle original et puissant pour les études de radiothérapie. Son intérêt principal est une similarité structurale avec les tumeurs qui implique la présence de gradients (d'oxygène, de nutriments, de pH) et un effet de contact. La similarité de la réponse aux radiations avec les xénogreffes de tumeurs font du sphéroïde un modèle alternatif dans l'étude des radiations ionisantes. Finalement, malgré la qualité de ce modèle, seule l'utilisation de nouvelles technologies d'analyses pourra permettre le développement de leur utilisation notamment en oncologie préclinique.

RESUME

Les sphéroïdes sont des agrégats tridimensionnels de cellules tumorales issus d'un ou de plusieurs clones cellulaires. Ce modèle qui mime la structure des micro tumeurs et certaines de leurs propriétés, présente des gradients d'oxygène, de pH et de nutriments induisant en son centre une aire nécrotique.

La croissance des sphéroïdes, cultivés de manière dynamique ou statique, se déroule en 3 phases et permet d'atteindre des diamètres de 2 à 4 mm. Les analyses s'effectuent sur des sphéroïdes entiers (dose-réponse, pO_2) et dissociés (essais clonogéniques et colorimétriques, CMF).

Leur radiosensibilité, affectée par l'oxygénation, la réparation des dommages, les communications intracellulaires et l'induction d'apoptose, est similaire à celle des tumeurs dont les cellules sont issues notamment pour les carcinomes des VADS.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les travaux présentés ici concernent l'étude de l'hétérogénéité cellulaire impliquée dans la réponse aux radiations ionisantes.

Les expérimentations ont été réalisées sur des lignées cellulaires dont l'une a été clonée après irradiation fractionnée. Les paramètres de prolifération cellulaire ont été caractérisés puis la réponse à l'irradiation a été suivie au niveau de l'induction d'apoptose et de nécrose en relation avec les arrêts du cycle cellulaire aux transitions G_1/S et G_2/M . La détoxification des espèces réactives de l'oxygène a également été étudiée en suivant l'expression de gènes qui y sont liés. Ceci permet de rechercher des corrélations entre ces processus et les paramètres de radiosensibilité déterminés selon le modèle linéaire et quadratique.

Les cultures cellulaires en monocouche présentent de nombreux avantages pour la mise en œuvre de ces analyses. Toutefois, elles ne représentent pas nécessairement la réalité tumorale. C'est pourquoi, parallèlement, l'utilisation d'un modèle tridimensionnel, le sphéroïde, a été entreprise. Cette partie du travail s'est, dans un premier temps, focalisée sur la standardisation du mode de culture puis par la suite, sur le développement d'un prototype de compteur-analyseur automatique de sphéroïdes dont l'industrialisation est en cours. Cet automate n'a pas pour l'instant été utilisé lors d'essais biologiques.

Chapitre VI

Matériels et méthodes.

VI Matériels et méthodes

VI.1 Lignées cellulaires.

KB (ATCC CCL17) et FaDu (ATCC HTB43) sont des lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale et du pharynx qui nous ont été fournies par le Pr. Hanauske (Université de Munich) du groupe de travail PTMG (Preclinical Therapeutic Model Group) de l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture 25 ou 75 cm² (Dutcher, Brumath, France) selon les spécifications décrites par Griffon *et al.* (188). En résumé, les cellules sont cultivées en monocouche dans un incubateur maintenu à 37°C, 5% de CO₂ et 90% d'humidité. Le milieu de culture est du RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplémenté par 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté (Dutsher, Brumath, France), 200 UI/l de pénicilline/streptomycine, 200 mmol/l de glutamine. Tous les additifs proviennent de Gibco, Cergy Pontoise, France.

L'entretien consiste, chaque semaine, à décoller les cellules de leur support à l'aide de trypsine à 1% (Gibco, Cergy Pontoise, France) pendant 5 minutes à 37°C. Après lavage et resuspension du culot cellulaire dans du milieu frais, les cellules sont comptées sur un hématimètre de Thoma et la viabilité est estimée par marquage au bleu trypan (Gibco, Cergy Pontoise, France). Les cellules KB et FaDu sont respectivement réensemencées à 0,5.10⁴ et 10⁴ cellules/ml afin de maintenir une croissance exponentielle. Le milieu de culture est renouvelé une fois entre chaque repiquage.

VI.2 Traitement des cellules, clonage cellulaire

Les clones issus de KB ont été isolés selon les modalités décrites par Webb *et al.* (252). Brièvement, des cellules KB ont été irradiées de manière fractionnée à 2 Gy par jour sur une période de 5 jours soit une dose totale de 10 Gy. L'irradiation gamma est réalisée à l'aide d'une unité de cobalt (⁶⁰Co) Théatron 780C à (Theratronics, Ottawa, Canada) à 2,0 Gy.min⁻¹. La fraction survivante, appelée KB^m, est mise en culture pendant 2 semaines.

L'isolement de clones cellulaires est réalisé par dilution limite. Les cellules sont trypsinées, comptées précisément puis une dilution est réalisée de manière à n'avoir, en théorie, que 2,5 cellules/ml de milieu. Vingt plaques de 96 puits sont ensemencées avec 200 µl de milieu

(contenant théoriquement 0,5 cellule). Le fait de n'avoir que « 0,5 cellule par puits » permet de diminuer le nombre de puits contenant plus d'une cellule qui sont source d'erreurs. Le développement de clones cellulaires dans les plaques multipuits est régulièrement suivi et seuls les puits contenant un clone unique sont sélectionnés. Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont trypsinées et amplifiées par repiquages successifs dans des plaques 6 puits puis dans des boîtes de culture 25 cm² (Dutsher, Brumath, France).

Le clonage de KB^m par dilution limite a permis d'isoler 13 clones notés KB^{m1} à KB^{m13}. Ils sont maintenus en culture jusqu'à stabilisation avant d'être analysés et congelés dans l'azote liquide avec un milieu de congélation contenant 50% de DMSO (diméthylsulfoxyde) (Sigma, S^t Quentin Fallavier).

VI.3 Détermination de la radiosensibilité

La sensibilité aux radiations ionisantes de chaque lignée cellulaire est déterminée par essais clonogéniques en double couche d'agar (Bacto Agar, Difco, Detroit, MI) selon la méthode appliquée par Griffon *et al.* (231). Brièvement, les cellules sont ensemencées dans de l'agar semi-solide (0,3%) sur une couche d'agar solide à 0,5%. La densité d'ensemencement varie entre 800 et 2500 cellules par puits de plaque 6 puits selon l'efficacité de clonage. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont irradiées selon la procédure décrite au chapitre précédent à des doses comprises entre 0 et 8 Gy (2, 4, 6 et 8 Gy) et mises à incuber pendant 2 semaines à 37°C, 5% CO₂, 90% d'humidité. Les colonies sont comptées de manière semi-automatique par analyse d'image avec le logiciel Inspector (Matrox, Canada). Seules les colonies dont le diamètre est supérieur à 50 µm sont prises en compte. Chaque point expérimental est issu de trois mesures (triplicate) répétées au moins trois fois. Les résultats sont normalisés par rapport aux témoins non irradiés.

Les courbes dose-réponse expérimentales sont ajustées selon le modèle Linéaire-Quadratique (Équation VI.1). Les paramètres radiobiologiques α , β , SF₂ (Surviving Fraction at 2 Gy) et MID (Mean Inactivation Dose) (Équation VI.2) sont calculés selon Thames *et al.* (49).

Équation VI.1 :
$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Équation VI.2 :
$$MID = \int_0^{\infty} S dD$$

VI.4 Détermination du Temps potentiel de doublement, de la durée de la phase S et du Labelling Index.

Les conditions sont adaptées de la méthode publiée par Marchal *et al.* (253). Les cellules en phase exponentielle de croissance sont incubées avec 200 $\mu\text{mol/l}$ de Bromodésoxy Uridine (BrdU) (Sigma, S^t-Quentin-Fallavier, France) pendant 20 minutes à 37°C dans du RPMI 1640. Après deux lavages avec du PBS préchauffé, (Life technologie, Cergy-Pontoise, France), les cellules sont incubées pendant 3 heures dans du milieu RPMI 1640 permettant à celles-ci de cycliser. Les cellules sont alors trypsinées, lavées et fixées avec 2 ml d'éthanol à 70% sous agitation lente avant de les stocker à -20°C.

Après centrifugation, les noyaux sont préparés par hydrolyse acide en utilisant 1 ml d'HCl 0,1N pour 2.10^6 cellules, puis 2,5 ml d'HCl 2N pendant 15 minutes à température ambiante. Les noyaux sont lavés trois fois avec du PBS et le culot est resuspendu dans 200 μl d'une solution de marquage contenant 1 μl de sérum normal de lapin, 1 μl de Tween et 198 μl de PBS. Dix microlitres d'anticorps monoclonal de souris anti-BrdU (Dako F744) sont ajoutés à la suspension et l'ensemble est incubé 1 heure à température ambiante. Les noyaux sont lavés avec du PBS et après centrifugation, le culot est resuspendu avec la même solution de marquage. Dix microlitres de sérum de lapin anti-souris dont les immunoglobulines sont conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Dako F313) sont ajoutés à la suspension et incubés à température ambiante pendant 1 heure. Après 2 lavages, le culot est resuspendu dans 200 μl de PBS et 10 μl d'iodure de propidium (IP) à 500 $\mu\text{g/ml}$ sont ajoutés pour le marquage de l'ADN.

Les noyaux sont analysés avec un cytomètre en flux Orthocyte (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France) équipé d'une lampe au Xénon et d'un bloc filtre pour l'excitation à 488 nm. Les intensités de fluorescence verte de la FITC (proportionnelle au contenu en BrdU) et rouge de l'IP (proportionnelle au marquage de l'ADN) sont détectées après sélection par un filtre passe bande de 520/530 nm et par un filtre passe haut de 575 nm. Les données sont analysées avec le logiciel Multi2D (Phœnix Flow System, San Diego, USA) et permettent de déterminer le Labelling Index (LI) et la durée de la phase S déterminée selon Begg *et al.* (65). Le temps potentiel de doublement (T_{pot}) est calculés selon Équation III.1: $T_{\text{pot}} = \lambda \left(\frac{T_s}{\text{LI}} \right)$.

Le paramètre λ est un facteur de neutralisation des variations de distribution dans le cycle cellulaire estimé à 1 pour les cellules en culture.

VI.5 Analyse du cycle cellulaire et des arrêts après irradiation

L'analyse du cycle cellulaire est réalisée sur une suspension cellulaire contenant 10^6 cellules/ml en utilisant un cytomètre en flux Orthocyte selon la méthode décrite par Liebman *et al.* (254). Après irradiation, les cellules sont trypsinées à différents temps, lavées avec du PBS et resuspendues dans 2 ml de citrate de sodium à 0,1%, avec 0,1% de Triton X100 et 50 $\mu\text{g/ml}$ d'iodure de propidium pour isoler et marquer les noyaux cellulaires. Les échantillons sont gardés dans la solution de marquage à 4°C pendant au moins 24 heures avant d'ajouter de la RNase (50 $\mu\text{g/ml}$) et d'être analysés. Les phases du cycle cellulaire sont déterminées en utilisant l'algorithme de Dean et Jett. Les résultats sont exprimés selon une proportion relative de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire comparées aux contrôles non traités à $t = 0$ heure.

VI.6 Temps de doublement

La croissance des cellules est suivie par un test de viabilité au bromure de 4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) ce qui permet d'identifier la phase exponentielle de croissance. Cette phase, dont la croissance est régulière, est utilisée pour déterminer le temps de doublement des lignées et des clones.

Le MTT (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) est un composé jaune pâle en solution aqueuse, qui est métabolisé par les cellules vivantes et transformé en sel de formazan de coloration brune (Figure 21).

Le principe de ce test est basé sur la réduction mitochondriale du MTT par les succinate deshydrogénases, couplées au système des cytochromes oxydases en deux points de la chaîne (Mosmann, 1983). Ainsi, seules les cellules dont l'activité mitochondriale respiratoire est intacte sont capables de réduire métaboliquement le MTT dont le produit de transformation absorbe la lumière vers 540 nm. Cet essai a été comparé dans la littérature aux essais clonogéniques (essais de référence en culture cellulaire) et une corrélation significative a été constatée entre les deux méthodes (231, 255-257). L'utilisation du MTT permet donc d'estimer la proportion de cellules vivantes par rapport à un témoin à un instant donné.

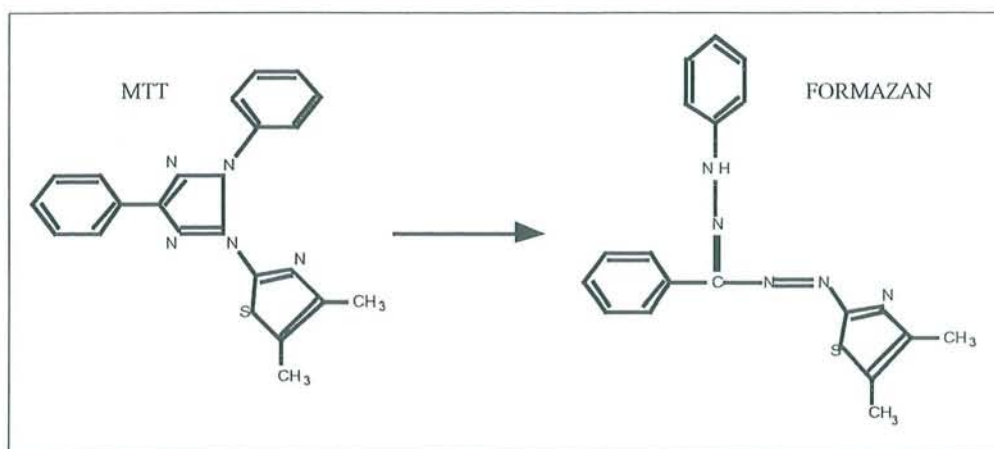


Figure 21 : Structure chimique du MTT et de son produit de transformation

Cet essai a été réalisé en plaques 96 puits dans lesquelles des cellules de la lignée KB et des clones KB^{m1} à KB^{m13} ont étéensemencées. Expérimentalement, le temps de doublement varie en fonction de la densité d'ensemencement. Donc, afin d'effectuer une moyenne des temps de doublement, 5 densités d'ensemencement ont été utilisées : 500, 1000, 1500, 2000, 2500 cellules/ml. Après 7 jours de culture, chaque puits reçoit 50 µl d'une solution de MTT (5 mg/ml) dans du PBS. Après 3 heures de contact nécessaires à la métabolisation du colorant, l'intégrité cellulaire est détruite par addition de 50 µl de sodium dodécylsulfate (SDS) à 25% et agitation. L'absorbance est lue à 540 nm sur un lecteur de microplaques Titertek Multiskan® MCC/340 (Flow Laboratories, Les Ulis, France).

Le blanc a été déterminé à partir de puits contenant du milieu RPMI, de la solution de MTT et du SDS mais sans cellule. Chaque point expérimental résulte de la moyenne de 3 expérimentations différentes à raison de 6 puits par densité cellulaire testée. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance multipliées par mille. La linéarité du test colorimétrique au MTT à 540 nm en fonction du nombre de cellules par puits a été vérifiée.

Les courbes de croissance sont tracées dans un tableur et les valeurs qui n'entrent pas dans la phase exponentielle de croissance (phase de latence et phase plateau) sont éliminées. Une régression exponentielle est alors appliquée aux points expérimentaux restants. L'équation de cette courbe est de type : $y = b \times e^{ax}$. Le temps de doublement dans cette partie de la courbe

est donc donné par : $T_d = \frac{\ln 2}{a}$. Ce calcul est réalisé pour les différents ensemencements de chaque lignée ce qui permet d'obtenir une moyenne du temps de doublement ainsi que l'écart-type correspondant.

VI.7 RT-PCR semi-quantitative

VI.7.1 Extraction d'ARN

Toutes les manipulations d'acides nucléiques décrites ci-dessous nécessitent le port de gants, et l'utilisation de matériels et consommables exempts de DNase et RNase.

Les ARN totaux (ARNtx) sont extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (258). Brièvement, $1-5 \cdot 10^6$ cellules sont mises en contact avec 1 ml de TRIzol (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) qui est un mélange de phénol et d'isothiocyanate de guanidium. La solution est homogénéisée, laissée 5 min à température ambiante (à cette étape, il est possible de conserver la solution à $-20^\circ/-80^\circ\text{C}$ ou dans l'azote liquide) puis centrifugée 15 min à 12000 g et 4°C pour éliminer les débris dus à la lyse cellulaire. Au surnageant transféré dans un autre tube, sont ajoutés 0,2 ml de chloroforme pour précipiter les protéines. Après 15 min de centrifugation à 12000 g et 4°C , la phase supérieure contenant les ARN totaux est prélevée sans toucher à l'interface protéique. Ceux-ci sont précipités par ajout d'isopropanol en volume équivalent puis lavage à l'éthanol à 70 % après 10 min de centrifugation à 12000 g et 4°C . Le culot d'ARN mis à sécher dans un bain sec à 37°C est redissous dans 50 μl d'eau.

La quantité et la qualité sont analysés par la mesure de l'absorbance d'un aliquot de la solution d'ARN dilué 200 fois dans l'eau. Une unité de DO à 260 nm correspond à 40 mg/ml d'ARNtx. Donc la concentration en ARN est donnée par : $(\text{ARNtx}) = \text{DO}_{260} \times 200 \times 40$ (en mg/ml).

La qualité peut être estimée par la mesure du ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ qui doit être supérieur à 1,8. La DO à 280 nm qui correspond à l'absorption du noyau aromatique de certains acides aminés est un indicateur de la présence de protéines.

La pureté est analysée par migration de 0,5-1 μg d'ARNtx sur un gel d'agarose à 1% selon les conditions décrites au chapitre VI.7.3. Deux bandes correspondant aux ARN ribosomiques 18S et 28S sont visibles (Figure 22). Une contamination en ADN est caractérisée par la présence d'un « smear » au niveau des puits.

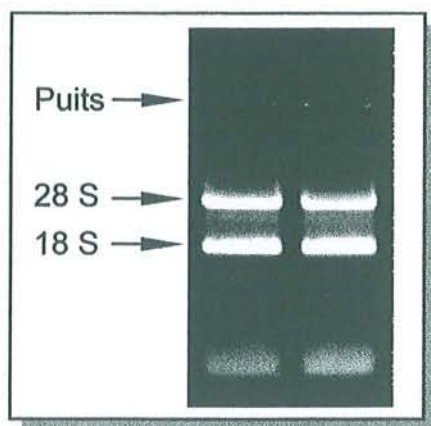


Figure 22 : Exemple de migration d'ARN totaux après extraction et présence des ARNr 18S et 28S.

VI.7.2 Transcription inverse

Afin de procéder à l'amplification des gènes p53, GST- π , GST- μ , MnSOD, MT2A et β 2-microglobuline qui est le gène de référence, une transcription inverse est réalisée par une méthode non dirigée.

La synthèse des ADNc est effectuée avec 1 μ g d'ARNtx qui sont dénaturés avec 500 ng d'amorces aléatoires (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) dans un volume réactionnel de 11 μ l pendant 10 min à 70°C puis placés à 4°C. Ce volume est complété à 20 μ l avec du tampon Tris-HCl 50 mmol/l à pH 8,3, KCl 75 mmol/l, MgCl₂ 3 mmole/l, désoxynucleotides triphosphate 0,5 mmol/l (Pharmacia Biotech, Orsay, France), dithiothreitol 10 mmol/l (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) et 200 unités transcriptase inverse Superscript II[®] (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante puis 50 min à 42°C, suivi par 15 min à 70°C. La superscript II est une enzyme recombinante qui n'a plus d'activité RNase donc 2,5 unités de RNase H (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) sont ajoutées dans les échantillons et incubés pendant 20 min à 37°C puis conservés à -20°/-80°C.

VI.7.3 PCR semi-quantitative

Les amplifications sont réalisées de deux façons, soit à l'aide d'un thermocycleur PHC-3 (Techne, France), soit avec un thermocycleur Rapidcycler (Idaho Technology, Pantin, France).

La RT-PCR semi-quantitative fait appel à une co-amplification du gène d'intérêt (p53, GST- π , GST- μ , MnSOD, MT2A) et d'un gène de référence (β 2-microglobuline). Les interactions et les compétitions rendent donc nécessaire l'optimisation des conditions d'amplification. Cinq paramètres sont à prendre en compte dans l'ordre suivant : la température d'appariement, la concentration en MgCl₂, le ratio d'amorces, le nombre de cycles et la quantité d'ADNc.

Les réactions de PCR « classique » sont réalisées avec 1 μ l d'ADNc dans un volume de 20 μ l contenant 2 μ l de tampon PCR 10x, X mmol/l (à optimiser) de MgCl₂, 0,2 mmol/l de dNTP (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), X mmol/l (à optimiser) d'amorces 5'- et 3'-, et finalement 1 unité de Taq polymérase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France).

Les PCR « capillaires » sont réalisées dans des tubes capillaires avec 1 μ l de solution d'ADNc dans un volume final de 10 μ l. Le tampon de PCR contient 50 mmol/l de Tris-HCl (pH=8,3), 500 μ g/ml de sérum albumine bovine (BSA), 40 mg/ml de rouge de crésol, et 20 mg/ml de sucrose. Le mélange réactionnel contient également 0,2 mmol/l de dNTP, 0,5 mmol/l de chaque amorce 5'- et 3'-, X mmol/l (à optimiser) de MgCl₂ et 0,4 unités de Taq polymérase.

L'optimisation de la PCR semi-quantitative du gène de la GST- π par rapport à l'expression du gène de référence de la β 2-microglobuline est présentée (Figure 23).

Les 2 premiers paramètres sont optimisés sans co-amplification. Cinq températures d'appariement sont testées pour les amorces des 2 gènes. Après dépôt sur un gel d'agarose 1% et quantification, l'intensité maximale d'amplification est atteinte avec une température d'appariement de 56°C. Lorsque les 2 températures optimales ne sont pas identiques, un compromis est réalisé en retenant une température intermédiaire.

De la même façon, 5 concentrations de MgCl₂ sont testées en utilisant la température d'appariement de 56°C préalablement déterminée. L'amplification maximale pour les 2 gènes est atteinte pour une concentration de 2 mmol/l. L'optimisation du ratio d'amorces permet de minimiser les problèmes de compétition en adaptant leurs proportions respectives ou encore d'augmenter le signal de l'un des gènes. Ici, une proportion équivalente d'amorces (ratio 1/1) produit le signal le plus important pour la co-amplification. Le nombre de cycles optimal, déterminé lors d'une série de 5 co-amplifications est compris entre 25 et 30 cycles. Il correspond à la fin de la phase linéaire d'amplification, juste avant que le plateau soit atteint. Une seconde détermination plus fine permet de fixer le nombre de cycles d'amplification à 29. Le dernier paramètre concerne le volume optimal d'ADNc à utiliser afin d'éviter les

problèmes de saturation. Ce volume de 1 μl correspond à la fin de la phase linéaire d'amplification.

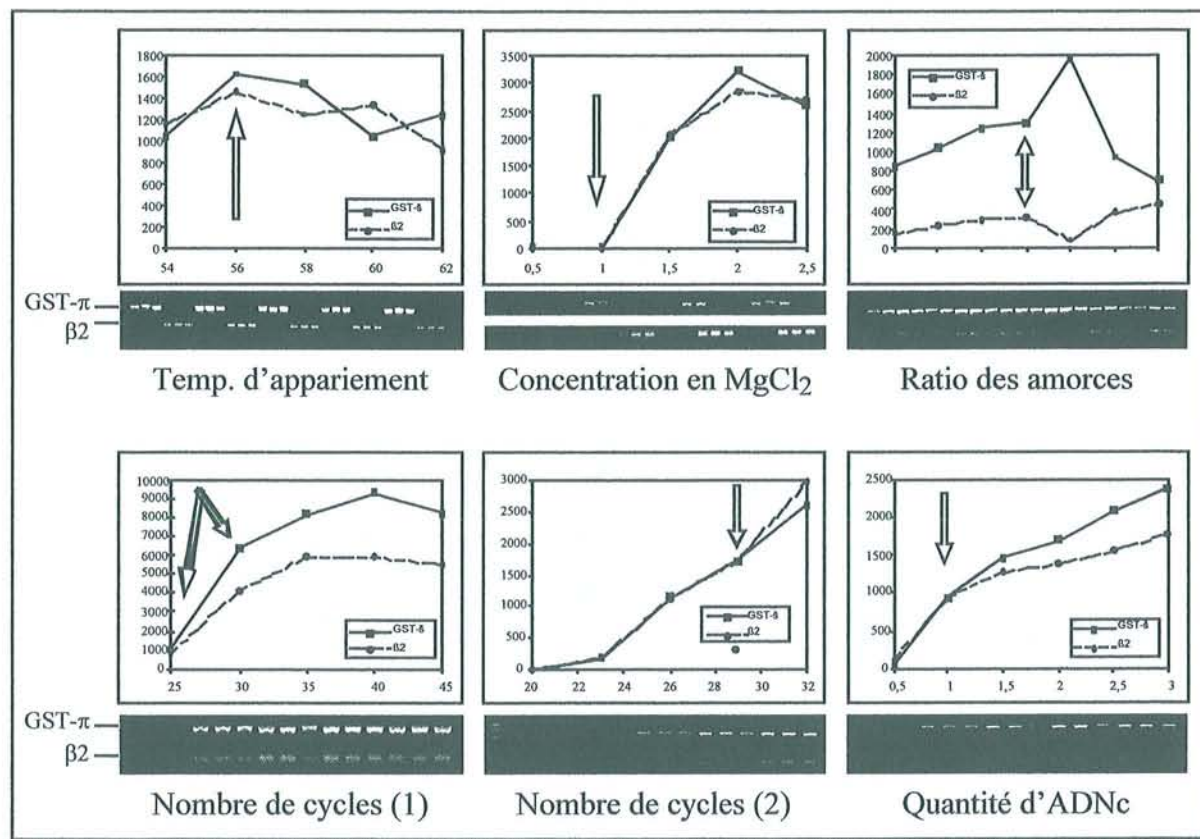


Figure 23 : Optimisations de la co-amplification du gène de la GST- π et de la $\beta 2$ -microglobuline.

Les paramètres optimisés sont résumés au Tableau 8. Les ratio et les quantités d'ADNc ne sont pas indiqués car leurs valeurs sont toutes de 1/1 et de 1 μl pour toutes les amplifications. Les amorces p53 (259), GST- μ (260), GST- π , MnSOD (261), MT2A (262) et $\beta 2$ -microglobuline (263) sont fournies par Gibco (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Les amplifications par PCR capillaire ne comportent que les cycles d'amplification alors que les PCR « classiques » débutent par un cycle de 5 min de dénaturation à 94°C, 1 min à la température d'appariement préalablement déterminée et 1 min à 72°C puis se terminent par 5 min de synthèse à 72°C.

Tableau 8 : Conditions de co-amplification des gènes étudiés. Les colonnes en grisé comportent les paramètres optimisés.

Gènes	PCR	MgCl ₂	Dénat.	App.	T° app.	Synth.	Cycles	Amorces
p53	classique	2 mmol/l	1'	1'	57°C	1'	33	3'- TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC -5'
	capillaire	4 mmol/l	0"	0"	55°C	15"	32	5'- CAC GGA TCT GAA GGG TGA AA -3'
GST-π	classique	2 mmol/l	30"	30"	56°C	30"	29	3'- CCC TTT ATC TGG TGC CAC AT -5'
	capillaire	4 mmol/l	0"	0"	56°C	15"	29	5'- CTG TTT CCC GTT GCC ATT GAT -3'
GST-μ	classique	1,5 mmol/l	1'	1'	60°C	1'	25	3'- GGG TAG TTA GTT CAT CCC GTC -5' 5'- CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC -3'
MnSOD	capillaire	4 mmol/l	0"	0"	56°C	15"	32	3'- TAA CTT GAA GTC ACG TCC GAC TTC -5' 5'- CTG AAG GTAGTA AGC GTG CTC CC -3'
MT2A	classique	1,5 mmol/l	45"	45"	56°C	45"	30	3'- GCG TCC ACG TCC TCA GTG GCC G -5' 5'- GCA GCA GCT GCA CTT GTC CGA C -3'
β2-microglob.	class./cap.	5 mmol/l	-	-	58°C	-	32	3'- AGT AGA AAA AGT CAC CCC CA -5' 5'- ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG -3'

VI.7.4 Analyse des produits de PCR

Un gel d'agarose (Life Technologie, Cergy-Pontoise, France) est préparé dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) à 0,5X (Life Technologie, Cergy-Pontoise, France) dans de l'eau stérile, apyrogène exempt de DNase et RNase (Fresenius France Pharma, Sèvres, France). Avant la polymérisation du gel, du bromure d'éthidium à 1 mg/ml est incorporé au gel afin de permettre la visualisation des acides nucléiques. Les produits de PCR capillaire sont déposés directement sur le gel, alors qu'un tampon de dépôt est ajouté aux produits de PCR « classique ». Les produits d'amplifications des gènes p53 (640 paires de bases), MnSOD (180 pb), MT2A (330 pb) et GST- π (621 pb) sont déposés sur un gel à 1%, ou 2% pour GST- μ (178 pb). Les produits de PCR sont alors séparés par électrophorèse dans un champ électrique de 100 V pendant 30 minutes à 2 heures selon la taille des fragments amplifiés.

Un système d'analyse d'image Gel-Doc 1000 (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) est utilisé pour visualiser et analyser les produits d'amplification par trans-illumination ultra-violette à 302 nm. L'analyse densitométrique est réalisée sur l'image du gel acquise par l'intermédiaire d'une caméra. Pour chaque échantillon, le ratio d'expression relatif (RER) est calculé en triplicate et représente l'intensité de fluorescence de la bande du gène d'intérêt sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence (ici la β 2-microglobuline (120 pb)). Les résultats présentés sont la moyenne \pm erreurs standards de 3 expérimentations indépendantes.

VI.8 Analyses statistiques.

Les données obtenues à partir des niveaux d'expression de GST- μ , GST- π , p53, MnSOD et MT2A ainsi que les paramètres de radiosensibilité sont analysés avec le test non-paramétrique U de Mann-Whitney. Les analyses de régression entre les Ratio d'Expression Relatifs (RER) de GST- μ , GST- π , p53, MnSOD, MT2A et les paramètres de radiosensibilité sont réalisés selon le test ANOVA. Un niveau de significativité de 5% ($p < 0,05$) est utilisé pour toutes les analyses.

VI.9 Western-Blots

La détection des protéines p53, GST- π , MnSOD et MT2A est réalisée par immuno-blot. Il s'agit de transférer sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) les protéines

séparées sur un gel de polyacrylamide. La protéine cible est alors détectée par un anticorps spécifique qui lui-même est mis en évidence par une réaction immuno-colorimétrique.

VI.9.1 Extraction et dosage de protéines

L'extraction des protéines est réalisée à 4°C et en présence d'antiprotéases (Sigma, S^t-Quentin-Fallavier, France) pour éviter leur dégradation. Les cellulesensemencées à 0,5 ou 1.10⁴ cellules/ml selon les lignées, sont cultivées pendant 3 à 4 jours puis sont irradiées à 2 ou 4 Gy en phase exponentielle de croissance. A chaque temps de la cinétique (0, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 heures), les boîtes sont placées 5 min à 4°C pour stopper les processus métaboliques, lavées avec du PBS froid puis les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir. L'utilisation de trypsine est à proscrire car elle détruit les protéines membranaires de surface. Après 5 min de centrifugation à 1500 rpm et 4°C, le culot cellulaire sec est congelé à -20°/-80°C jusqu'à extraction des protéines. Cette congélation permet également une fragilisation des membranes. Les cellules sont mises en contact avec 250 µl tampon de lyse froid (Tableau 9) additionné de 2,5 µl de Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Tableau 10) (tous les produits sont fournis par Sigma, S^t-Quentin-Fallavier, France) pour environ 10⁶ cellules et sont régulièrement agitées pendant 20 à 30 min en gardant la solution à 4°C. Après 15 min de centrifugation à 10000 g à 4°C, le surnageant est prélevé et conservé à -20/-80°C jusqu'à utilisation.

Tableau 9 : Composition du tampon RIPA.

Produits	Concentrations	Quantité (100ml)
NaCl	100 mM	0,58 g
Tris	20 mM	0,24 g
Triton X100	1%	1 ml
Désoxycholate de Na	0,50%	0,5 g
SDS	0,10%	4 ml
Na-EDTA	1 mM	0,033 g

Le dosage des protéines est réalisé avec le kit Bio-Rad (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) basé sur la méthode de Bradford. Deux cents microlitres de réactif B et 25 µl de réactif A', préparé

par mélange du réactif A et de la solution S, sont ajoutés aux 5 µl d'échantillons déposés en duplicate dans les puits d'une plaque 96 puits. Les échantillons provenant de culture cellulaire peuvent éventuellement être dilués 5 à 10 fois car ils sont souvent trop concentrés. La plaque est agitée quelques secondes puis après une attente de 15 min, la lecture est réalisée à 690 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Titertek Multiskan[®] MCC/340 (Flow Laboratories, Les Ulis, France). La concentration en protéines est estimée en reportant la valeur de la moyenne des 2 absorbances des échantillons sur une courbe étalon de BSA (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 1,0 et 1,4 mg/ml). Les échantillons sont aliquotés par tubes de 50 µg de protéines et congelés.

Tableau 10 : Composition du « PIC » (Protease Inhibitor Cocktail) 500 x.

Produits	Quantité (mg/ml)
PMSF	5
Leupeptine	0,1
Soybean tryp I	1
Aprotinine	0,1
TPCK	1

VI.9.2 Gels de polyacrylamide

Les gels sont réalisés à l'aide d'un système Mini-Protean II (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France). Les plaques de verre sont nettoyées à l'éthanol puis montées sur leur support selon les recommandations du fournisseur.

Les propriétés de séparation du gel varient selon le degré de réticulation du gel (qui dépend du ratio acylamide/bisacrylamide et qui est ici de 19:1) ainsi que de la concentration (qui permet de faire varier la densité de ce gel). Ici, seule la concentration du mélange acylamide / bisacrylamide (Life Technologie, Cergy-Pontoise, France) varie en fonction de la protéine à mettre en évidence. Le Tableau 11 indique la composition du gel de séparation (run) selon la concentration voulue. Les produits sont mélangés dans un tube 15 ml (Dutsher, Brumath, France) mais le TEMED et l'ammonium persulfate (APS) (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) qui sont des catalyseurs de polymérisation sont ajoutés en dernier. La distance de migration optimale se situe au milieu du gel, donc la concentration en polyacrylamide a été ajustée en

fonction du poids moléculaire des protéines p53 (53 kDa), GST- π (23 kDa), MnSOD (26 kDa) et MT2A (7 kDa) à détecter. Ces concentrations sont respectivement de 10 %, 12,5 % et 15 % pour les MT2A et MnSOD.

Le mélange est coulé immédiatement entre les plaques avec une pipette puis de l'éthanol à 50% est déposé à la surface du gel pour permettre une polymérisation correcte à l'abri de l'oxygène. Après 30 à 45 min, l'éthanol est éliminé et la surface du gel est rincée à l'eau puis séchée avec un papier filtre. Le second gel, dit de concentration (ou stacking), est alors coulé. Sa composition ionique provoque la concentration des protéines ce qui leur permet de débiter correctement la migration en entrant simultanément dans le gel de séparation. La composition de ce gel est indiquée au Tableau 11. Les conditions de préparation sont identiques à celles du premier. Le peigne est mis en place et retiré après la polymérisation (environ 15-30 min).

Tableau 11 : Composition des gels de polyacrylamide (2 gels).

Produits	Gel de séparation			Concentr.
	10%	12,5%	15,0%	
Acryl./bisacryl. 40% (19:1)	3,0 ml	3,75 ml	4,5 ml	1,0 ml
Eau	4,6 ml	3,85 ml	3,1 ml	4,1 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8/6,8		3,0 ml		2 ml
Glycérol 50%		1,2 ml		0,8 ml
SDS 20%		96 μ l		64 μ l
TEMED		5 μ l		5 μ l
APS		100 μ l		100 μ l

VI.9.3 Traitement des échantillons

Les aliquots sont décongelés et 10 μ g de protéines sont prélevés puis complétés à 10 μ l avec du tampon de lyse RIPA. Un volume (10 μ l) de tampon de Laemli 1X (190 μ l de Laemli + 10 μ l de β -mercaptoéthanol) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) est ajouté aux 10 μ l d'échantillon. Les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 min puis les tubes sont immédiatement placés à 4°C pour éviter un repliement des protéines. Les échantillons sont alors déposés sur le gel mis à migrer à 100 V pendant 1,5 h dans un tampon tris-glycine-SDS (TGS) à pH 8,3 (Tableau 12) (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France).

Tableau 12 : Composition du tampon TGS de migration.

Produits	Concentrations
Tris	25 mM
Glycine	192 mM
SDS	0,1 % (m/v)

Dix microlitres d'un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) sont également déposés ainsi qu'un extrait cellulaire constituant un témoin positif exprimant la protéine à détecter (p53 : cellules CAL51 exposées au 5-FU ; GST- π : cellules A549 V3 exposées à la doxorubicine ; MnSOD et MT2A : cellules HepG2).

VI.9.4 Transfert

La membrane PVDF découpée avec des gants aux dimensions du gel, est activée dans du méthanol pendant 30 sec puis rincée dans de l'eau pendant 2 min. La membrane ainsi que le gel qui a fini de migrer sont alors équilibrés dans du tampon de transfert 1x (Tableau 13) (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) pendant 15 min. La porosité de la membrane PVDF est choisie en fonction du poids moléculaire de la protéine. Ainsi, la détection de p53 s'effectue sur une membrane 0,45 μm (Milipore, Bedford, USA) alors qu'une porosité de 0,2 μm (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France) est nécessaire pour GST- π , MnSOD et MT2A.

Tableau 13 : Composition des tampons de transfert 10x et 1x.

<i>Tampon de transfert 10x</i>			<i>Tampon de transfert 1x</i>	
Produits	Concentrations	Quantités	Produits	Quantités
Tris	480 mM	58,2 g	Tp Transfert 10x	100 ml
Glycine	390 mM	29,3 g	Méthanol	200 ml
SDS	0,38%	15 ml (25%)	Eau	700 ml

Le transfert s'effectue avec un blotter Trans-Blot SD Cell (Bio Rad, Ivry-sur Seine, France). Les éléments sont disposés dans l'ordre suivant : un papier filtre (Bio Rad, Ivry-sur Seine,

France) humecté avec du tampon de transfert, la membrane PVDF traitée, le gel, un second papier filtre humecté de tampon de transfert. A chaque nouvelle couche, les bulles sont chassées en faisant rouler un tube propre. Le transfert est réalisé à 40 mA par membrane pendant 30 min.

Afin de vérifier la qualité du transfert, la membrane est colorée pendant 3 min dans du rouge Ponceau 0,1 % dans 5 % d'acide acétique glacial (Sigma, S¹-Quentin-Fallavier, France) puis lavée à l'eau distillée. Les protéines apparaissent, il est alors possible de repérer les marqueurs de PM. Cette coloration n'altère pas la détection des protéines par les anticorps.

VI.9.5 Marquage

Avant de procéder au marquage, la membrane est saturée pour éviter les fixations aspécifiques. Pour cela, la membrane est agitée pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon NaCl-tris-tween (TBST) à pH 7,5 (Tableau 14) auquel est ajouté un mélange de protéines. Il s'agit généralement de BSA (Sigma, S¹-Quentin-Fallavier, France) ou de lait (Régilait écrémé).

Tableau 14 : Composition du tampon TBST.

Produits	Concentrations	Quantités (l)
NaCl	500 mM	29,2 g
Tris	20 mM	2,4 g
Tween	0,50%	0,5 ml/l

L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire est effectuée pendant 1 à 2 h dans des sachets plastique soudés, sous agitation à température ambiante ou préférentiellement toute la nuit à 4°C dans le tampon de saturation. La membrane est rincée rapidement dans du TBST puis lavée 3 fois pendant 10 min sous agitation à température ambiante. La même procédure est appliquée pour l'incubation avec l'anticorps secondaire (le contact est réalisé pendant 1 h à température ambiante). Un dernier lavage est réalisé avec du TBS seul pour éliminer les traces de Tween présentes sur la membrane qui peuvent interagir avec les produits de chimie

luminescence (Enhanced Chimie Luminescence) utilisés pour la révélation. Les conditions de détection des protéines sont résumées sur le Tableau 15.

Tableau 15 : Conditions de détection des protéines étudiées.

Protéines	Membrane	Saturation	Ac I	Dilut ^o 1	Ac II	Dilut ^o 2
P53	0,45 μ m	BSA2%Lait 0,6%	DO7 (Dako)	1/4500	PC260 (Dako)	1/4500
GST- π	0,22 μ m	BSA2%Lait 0,6%	Bio25Pi (Biotrin)	1/400	PC999 (Dako)	1/2000
MnSOD	0,22 μ m	Kit (Boehringer)	Don Pr. Dauça	1/4000	Kit (Boehringer)	1/7500
MT2A	0,22 μ m	Kit (Boehringer)	Don Pr. Dauça	1/250	Kit (Boehringer)	1/7500

Les anticorps sont monoclonaux excepté celui de la MT2A qui a été réalisé dans le laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement du Pr Dauça de l'Université Henri Poincaré - Nancy I. Les western-blots des protéines MnSOD et MT2A ont été réalisés en collaboration avec ce même laboratoire.

VI.9.6 Révélation

Un kit de chimiluminescence ECL (Amersham, Les Ulis, France) est utilisé selon les spécifications du fournisseur. Le principe repose sur l'émission de lumière à partir du luminol qui est un substrat de la horseradish peroxidase (HRP) couplée aux anticorps secondaires. Brièvement, 2 solutions mélangées en quantités égales sont déposées sur la membrane pendant 1 minute. La membrane est égouttée sur du papier Wathman 3M, entourée de Saran puis placée sur un film photographique (Amersham, Les Ulis, France) dans une cassette avec des écrans intensificateurs (Amersham, Les Ulis, France). Le film est révélé après 1 à 3 min d'exposition.

VI.10 Détection de l'apoptose

VI.10.1 Marquage à l'Acridine Orange - Bromure d'éthidium et détection par cytométrie en flux.

Cette méthode simple et rapide utilisable sur cellules non fixées, consiste à employer un mélange d'acridine orange (fluorescence verte) et de bromure d'éthidium. Trois populations cellulaires sont mises en évidence, les cellules viables, les mortes et les apoptotiques (264).

Les cellules obtenues après trypsination et récupération du surnageant où se trouvent des cellules apoptotiques décollées, sont centrifugées pendant 10 min à 10000 rpm et resuspendues dans du PBS. Elles sont numérotées avec un hématimètre de Thoma et 500 μ l de suspension contenant au moins $5 \cdot 10^5$ cellules sont placés dans un tube à hémolyse. Ces cellules sont incubées avec 5 ml d'une solution de marquage d'AO-BET 100x (AO=3 μ g/ml ; BET=10 μ g/ml soit respectivement 0,03 μ g/ml et 0,1 μ g/ml en concentration finale). Les cellules sont analysées immédiatement avec un cytomètre en flux Orthocyte (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France). Les taux d'apoptose et de nécrose, dus à l'irradiation, sont calculés comme la différence des taux bruts d'apoptose ou de nécrose entre les cellules irradiées et les témoins correspondants.

VI.10.2 Marquage au Hoechst 33342 et détection par microscopie de fluorescence.

Le suivi de l'apoptose par microscopie de fluorescence est basé sur le marquage de l'ADN par un intercalant de l'ADN, le Hoechst 33342.

Les cellulesensemencées dans des flacons de culture de 12,5 cm² à fond amovible (Nunc, Polylabo, Strasbourg, France) aux conditions habituelles, sont irradiées en phase exponentielle de croissance à 2 ou 4 Gy (voir chapitre VI.9.1), puis les flaskettes sont remises à l'incubateur jusqu'à analyse. Après élimination du milieu de culture et lavage au PBS, les cellules sont fixées par ajout de 2-3 ml de paraformaldéhyde 1% pendant 20 min à température ambiante puis rincées au PBS. Les cellules sont alors colorées par contact de 30 min à 37°C avec une solution de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Leiden, Hollande) à 5 mg/ml dans du PBS. Après un dernier lavage au PBS, la partie supérieure de la flaskette est enlevée et l'observation s'effectue entre lame et lamelle en double immersion à 461 nm.

Les analyses de microscopie de fluorescence ont été réalisées à partir d'un microscope à épifluorescence Olympus AX 70 Provis (Olympus, Rungis, France) muni d'un bloc filtre (330-385 / 420-460 nm), d'une caméra refroidie CCD 12 bits LHESA 1600 (LHESA, Cergy-Pontoise, France), d'une carte d'acquisition Magic (Matrox, Canada) et d'un logiciel d'analyse d'images (Analysis Pro, Olympus). Le montage est représenté à la Figure 24.

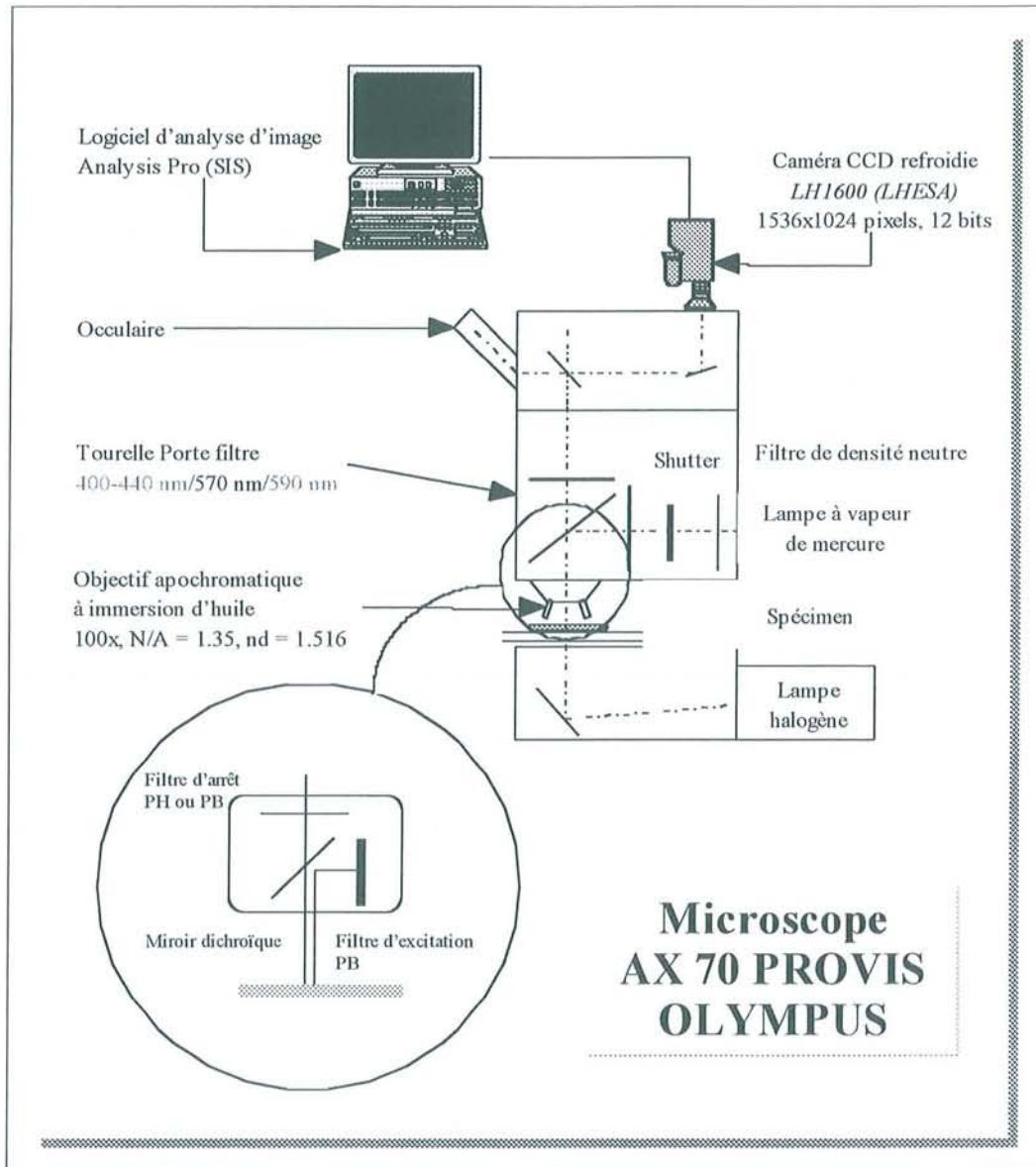


Figure 24 : Schéma de principe du poste de microscopie de fluorescence et d'analyse d'image.

VI.11 Culture de sphéroïdes

Les sphéroïdes sont initiés de manière statique selon la méthode de Yuhas (210) et cultivés sous agitation en spinner.

VI.11.1 Initiation

La culture de sphéroïdes FaDu est initiée de manière statique dans des boîtes de culture de 75 cm² (Dutsher, Brumath, France) dans lesquelles sont coulés 5 ml de L-agarose à 1%. Quinze millilitres de suspension cellulaire à 5.10⁴ cellules/ml sont ajoutés dans chaque boîte de culture puis mises à l'incubateur. Vingt quatre heures plus tard, cette culture est diluée 4 fois dans de nouvelles boîtes du même type afin d'éviter l'agrégation des micro-sphéroïdes et ceci pendant 24 h.

VI.11.2 Maintien

La suspension de sphéroïdes est alors versée dans des tubes 50 ml et centrifugée 3 minutes à 400 rpm. Le surnageant est éliminé et les sphéroïdes sont remis en suspension dans 200 ml de milieu de culture RPMI complet puis placés dans un flacon spinner (Integra Biosciences, Cergy le Haut, France) dont la vitesse de rotation varie de 55 à 70 rpm en fonction de la taille de sphéroïdes. Le milieu de culture qui s'épuise rapidement est changé 2 fois par semaine.

Afin de disposer de sphéroïdes de taille homogène, ceux-ci sont filtrés environ 5 jours après l'initiation de la culture lorsque leur diamètre atteint 150-250 µm. Pour cela, les sphéroïdes centrifugés et remis en suspension dans 30 ml de PBS sont versés au sommet d'une colonne de filtration composée de 2 filtres superposés. Ces filtres ont une ouverture de 150, 200 ou 250 µm et sont fixés dans des porte-filtres (Milipore, Bedford, USA) qu'il suffit d'emboîter. Les sphéroïdes dont le diamètre est supérieur à l'ouverture du premier filtre sont retenus au sommet de la colonne alors que les plus petits passent à travers les 2 filtres et sont éliminés. Le filtre inférieur (de plus petit diamètre) est donc démonté puis lavé au PBS à l'aide d'une seringue afin de récupérer la fraction des sphéroïdes dont le diamètre est compris entre 150 à 200 µm ou 200 à 250 µm selon la taille désirée. Ces sphéroïdes sont remis en culture dans le spinner ou individualisés dans des boîtes 24 puits dont le fond est recouvert d'une fine couche d'agarose 1% pour un suivi individuel.

Chapitre VII

Développement et étude de la radiosensibilité de fractions survivantes et clones issus des lignées cellulaires FaDu et KB après irradiation fractionnée

Ce chapitre est basé sur les publications suivantes :

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C. *Modifications de l'expression des gènes GST- μ et p53 dans les lignées tumorales humaines O.R.L. après irradiation gamma : induction, études cellulaires et moléculaires.* Journal de Chimie Physique (1998) 95, 718-723.

Dubessy C., Merlin J.-L., Colosetti P., Marchal C. *Clonal heterogeneity of glutathione S-transferase (μ , π) mRNA expression in head and neck tumor cells selected after irradiation.* Soumis à Life Sciences.

VII Développement et étude de la radiosensibilité de fractions survivantes et clones issus des lignées cellulaires FaDu et KB après irradiation fractionnée.

VII.1 Objectifs

Les chapitres précédents mettent en évidence l'aspect plurifactoriel de la radiosensibilité. Au niveau cellulaire de nombreux facteurs tels que la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, le cycle cellulaire, la réparation des lésions de l'ADN ou encore le taux d'apoptose interviennent pour moduler la réponse et la sensibilité aux radiations ionisantes.

Ce chapitre présente l'analyse de la radiosensibilité et de la prolifération de 2 modèles de lignées cellulaires, KB et FaDu, dont des fractions cellulaires survivantes après irradiation ont été développées.

Une lignée cellulaire est composée d'un ensemble de clones dont la somme des réponses individuelles donne la réponse globale de la lignée. L'influence de l'hétérogénéité cellulaire sur la sensibilité globale aux radiations ionisantes a été peu étudiée. Ceci implique de travailler sur des modèles de clones cellulaires dont la réponse à l'irradiation est -par définition- uniforme. Le fait de s'affranchir de l'hétérogénéité cellulaire permet de mieux appréhender la réponse cellulaire individuelle ainsi que son impact sur la radiosensibilité globale. L'utilisation de tels modèles doit permettre de relier les variations de radiosensibilité à un ou plusieurs marqueurs utilisables en biologie clinique. Dans ce but, le développement des clones issus de la fraction survivante à l'irradiation de KB a été réalisé. L'analyse de leur sensibilité aux radiations ionisantes est également présentée.

L'importance des paramètres de prolifération du cycle cellulaire sur la sensibilité aux radiations ionisantes a été montrée (265, 266). L'un des objectifs de ce chapitre est de déterminer la durée de la phase S et le labelling index ainsi que le temps potentiel de doublement (T_{pot}) et le temps de doublement afin de caractériser les lignées et les clones.

VII.2 Méthodologie

La méthodologie complète et les détails techniques sont donnés au chapitre VI. La stratégie choisie consiste à irradier des cellules de la lignée KB en phase exponentielle de croissance.

Afin de se rapprocher des conditions d'irradiation fractionnée employées en radiothérapie clinique, celles-ci ont été réalisées à 2 Gy, une dose communément employée en clinique, et fractionnée sur 5 séances espacées de 24 heures. La dose totale délivrée est donc de 10 Gy. L'utilisation d'une culture en phase exponentielle de croissance (à J3 ou J4) permet de s'assurer que les cellules sont en cycle et donc que leur réponse ne sera pas perturbée par des cellules quiescentes majoritaires lors de la confluence (phase de plateau).

Le clonage par dilution limite a permis d'obtenir une première série de 20 clones dont seulement 13 ont pu être maintenus en culture et congelés dans l'azote liquide.

La lignée FaDu a été irradiée toutes les 2 semaines par fractions successives de 4 Gy jusqu'à 72 Gy. L'intervalle de 2 semaines entre 2 irradiations correspond au temps nécessaire pour que les cellules repoussent. Les fractions cellulaires survivantes après des doses totales de 20 et 72 Gy sont analysées.

Les paramètres de prolifération sont calculés à partir du déplacement qu'effectuent les cellules dans le cycle. Pour cela les cellules sont mises temporairement en contact avec de la bromodésoxy uridine (BrdU), qui va être utilisée lors de la synthèse de l'ADN à la place de la thymidine. Après avoir laissé les cellules progresser dans le cycle, le BrdU est détecté par des anticorps marqués à la FITC. L'analyse par cytométrie en flux permet de déterminer le Labelling Index (LI) qui représente la proportion de cellules marquées au BrdU. La durée de la phase S est déterminée en analysant la proportion de cellules marquées se déplaçant en un temps donné depuis la phase S vers la phase G₂/M. Ces phases sont identifiées par un marquage simultané de l'ADN avec de l'iodure de propidium qui est un intercalant. Le temps potentiel de doublement résulte du rapport du temps de phase S sur le LI.

Les temps de doublement ont été déterminés par des tests au MTT. Il s'agit de quantifier quotidiennement la prolifération cellulaire afin d'établir des courbes de croissance. Alors que pendant la phase de latence les cellules entrent progressivement en cycle, lorsqu'elles atteignent la confluence, elles ne prolifèrent plus. Donc seules les données expérimentales de la phase exponentielle de croissance sont retenues pour être ajustées selon une équation de type : $y = b \times e^{ax}$ dont la pente a permet de déterminer le temps de doublement ($T_d = \frac{\ln 2}{a}$).

VII.3 Résultats

VII.3.1 Radiosensibilité

VII.3.1.1 Lignée KB et les clones

Les courbes de survie dose-réponse sont présentées aux Figures 25 à 28. Trois ou 4 courbes de survie de clones sont représentées sur les graphes selon leur sensibilité ainsi que la lignée parentale KB et la fraction survivante KB^m afin d'en faciliter les comparaisons.

Les paramètres radiobiologiques sont calculés selon le modèle linéaire-quadratique à partir de courbes de survies issues d'essais clonogéniques. Le Tableau 16 montre les paramètres α , β , SF_2 et MID de radiosensibilité des lignées cellulaires. La radiosensibilité de KB^{m4} , KB^{m10} et KB^{m11} n'a pas pu être déterminée car elles ne forment pas de colonies.

Tableau 16 : Paramètres de radiosensibilités de KB, KB^m et des clones issus de KB^m . Les paramètres α , β , SF_2 et MID sont calculés selon le modèle linéaire et quadratique. Les écarts-type sont notés entre parenthèse.

Cell Lines	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	SF_2	MID (Gy)
KB	0.114 (0.053)	0.020 (0.005)	0.739 (0.075)	4.306 (0.677)
KB^m	0.049 (0.032)	0.030 (0.018)	0.805 (0.020)	4.663 (0.684)
KB^{m1}	0.155 (0.077)	0.033 (0.014)	0.650 (0.100)	3.343 (0.648)
KB^{m2}	0.397 (0.200)	0.035 (0.027)	0.423 (0.167)	2.130 (0.658)
KB^{m3}	0.301 (0.139)	0.034 (0.021)	0.490 (0.103)	2.395 (0.413)
KB^{m5}	0.421 (0.192)	0.025 (0.042)	0.406 (0.109)	2.133 (0.531)
KB^{m6}	0.346 (0.112)	0.023 (0.025)	0.465 (0.082)	2.444 (0.473)
KB^{m7}	0.208 (0.145)	0.035 (0.020)	0.586 (0.119)	2.836 (0.419)
KB^{m8}	0.156 (0.152)	0.037 (0.026)	0.645 (0.123)	3.155 (0.360)
KB^{m9}	0.260 (0.164)	0.023 (0.014)	0.563 (0.146)	2.878 (0.716)
KB^{m12}	0.077 (0.089)	0.055 (0.007)	0.703 (0.133)	3.339 (0.712)
KB^{m13}	0.431 (0.080)	0.007 (0.009)	0.417 (0.073)	2.269 (0.427)

La première observation est que la lignée cellulaire parentale KB est relativement radio-résistante ($\alpha = 0,114$; $\beta = 0,020$; $SF_2 = 0,739$; $MID = 4,306$). Bien que les paramètres de radiosensibilité de KB^m ($\alpha = 0,049$; $\beta = 0,030$; $SF_2 = 0,805$; $MID = 4,663$) montrent une augmentation de la résistance aux radiations ionisantes, ceux-ci ne sont pas significativement différents de KB ($P > 0,05$).

La relative similitude des paramètres de radiosensibilité de KB et KB^m se reflète sur l'allure de leur courbe de survie respective (Figure 25).

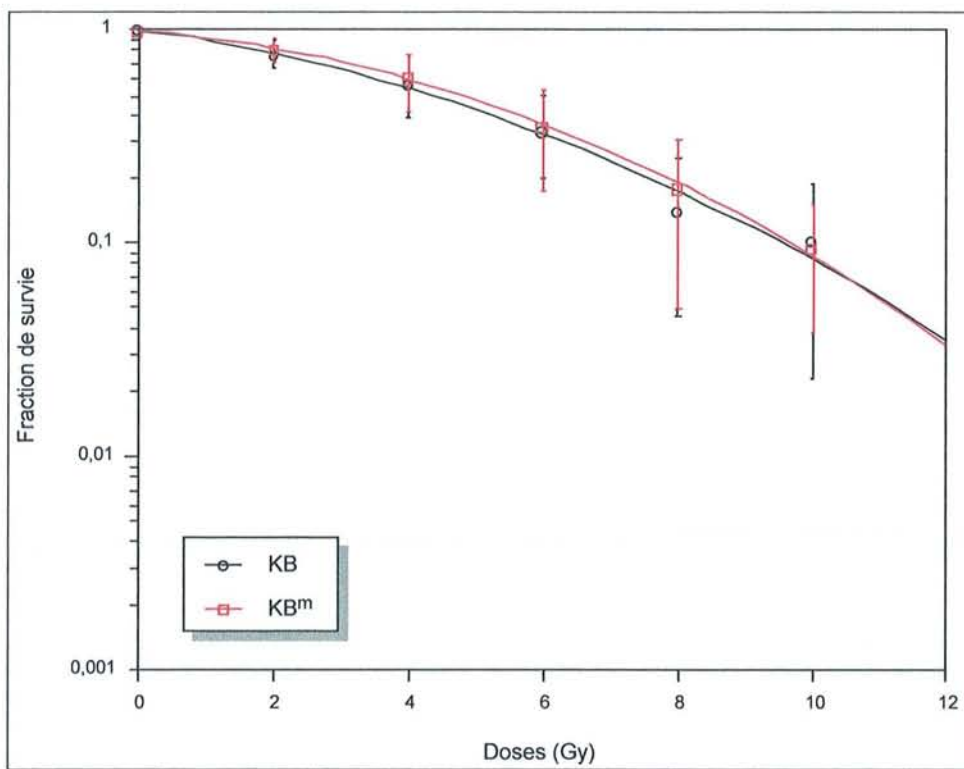


Figure 25 : Courbes de survie de la lignée KB et de la fraction survivante KB^m .

Paradoxalement, une diminution générale mais non uniforme de la radiosensibilité des clones cellulaires est observée.

Trois clones (KB^{m2} , KB^{m5} , KB^{m13}) montrent une sensibilité aux radiations ionisantes supérieure à celle de KB ($P < 0,05$). Entre eux, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour tous les paramètres radiobiologiques ($P > 0,05$). Les valeurs de la SF_2 varient de

0,406 pour KB^{m5} à 0,423 pour KB^{m2} . Comparé à KB, ces 3 clones montrent une diminution de 1,8 fois de la valeur de la SF_2 et 2 fois pour la valeur de la MID. La valeur moyenne d' α est environ 3,6 fois plus haute que dans la lignée parentale KB.

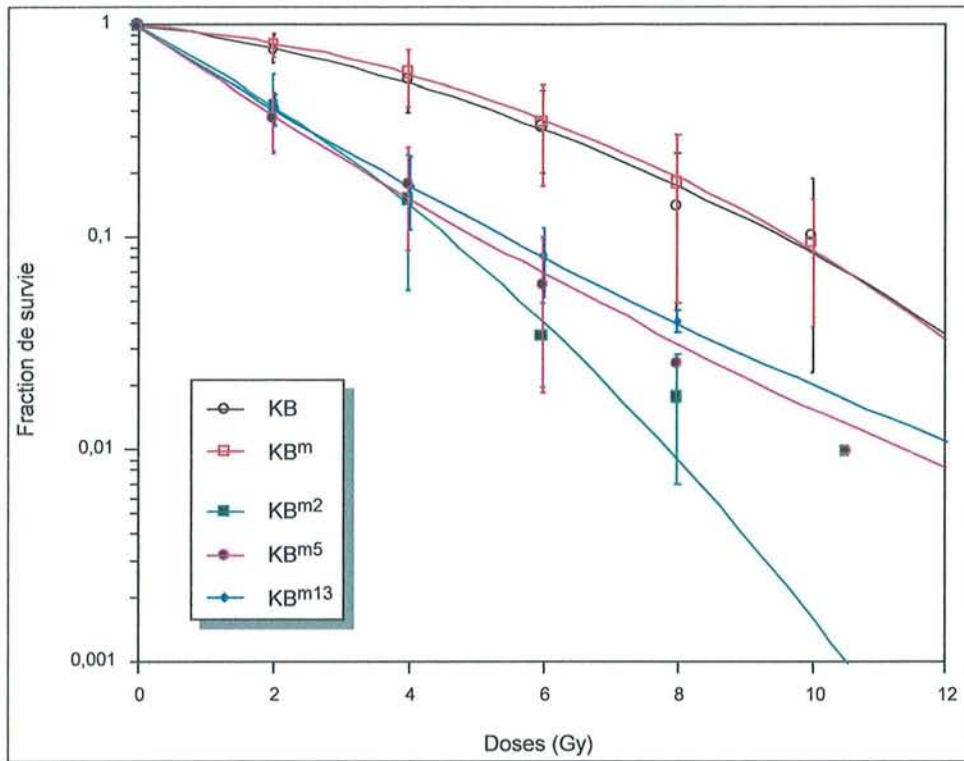


Figure 26 : Courbes de survie des clones $KB^{m2, 5, 13}$.

A l'opposé, KB^{m1} , KB^{m8} et KB^{m12} ont une faible sensibilité aux radiations ionisantes et peuvent être considérés comme les clones les plus résistants. Les courbes de survie sont présentées à la figure 2. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour α , SF_2 et MID avec la lignée parentale ($P > 0,05$). Le clone KB^{m12} présente un profil de radiosensibilité particulier. En effet, malgré des paramètres radiorésistants, KB^{m12} montre une faible radiorésistance pour des doses élevées de radiations (>4 Gy) avec une valeur de β inattendue de 0,703 qui est significativement différente ($P < 0,05$) de celle de KB (0,020).

Les quatre autres clones, KB^{m3} , KB^{m6} , KB^{m7} et KB^{m9} , ont une sensibilité intermédiaire. KB^{m3} et KB^{m6} sont les plus sensibles aux radiations ionisantes et leurs paramètres sont

statistiquement différents comparés à KB ($P < 0,05$). Il en va de même pour les deux autres clones (KB^{m7} et KB^{m9}) qui sont plus radiorésistants.

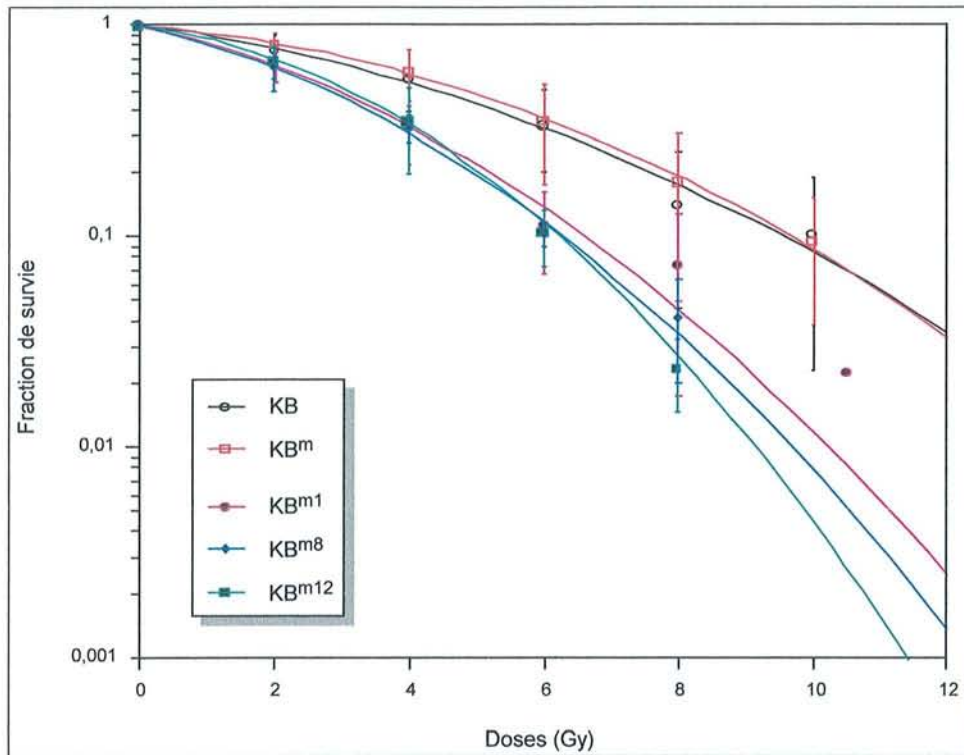


Figure 27 : Courbes de survie des clones $KB^{m1, 8, 12}$.

Les graphes illustrent la grande diversité de radiosensibilité mise en évidence pour les clones ainsi que la résistance de la lignée parentale KB et de la fraction survivante KB^m .

Les paramètres de radiosensibilité ont été déterminés à partir d'essais clonogéniques réalisés, selon les lignées, entre 4 et 7 fois sur une période de 18 mois de culture. Hormis quelques points pour lesquels les écarts-types sont importants (KB^{m5} et KB^{m6} à 6 Gy par exemple), les pourcentages d'erreur sont compris entre 0 et 50%. Toutefois, sur cette période d'étude, les paramètres de radiosensibilité montrent une relative stabilité.

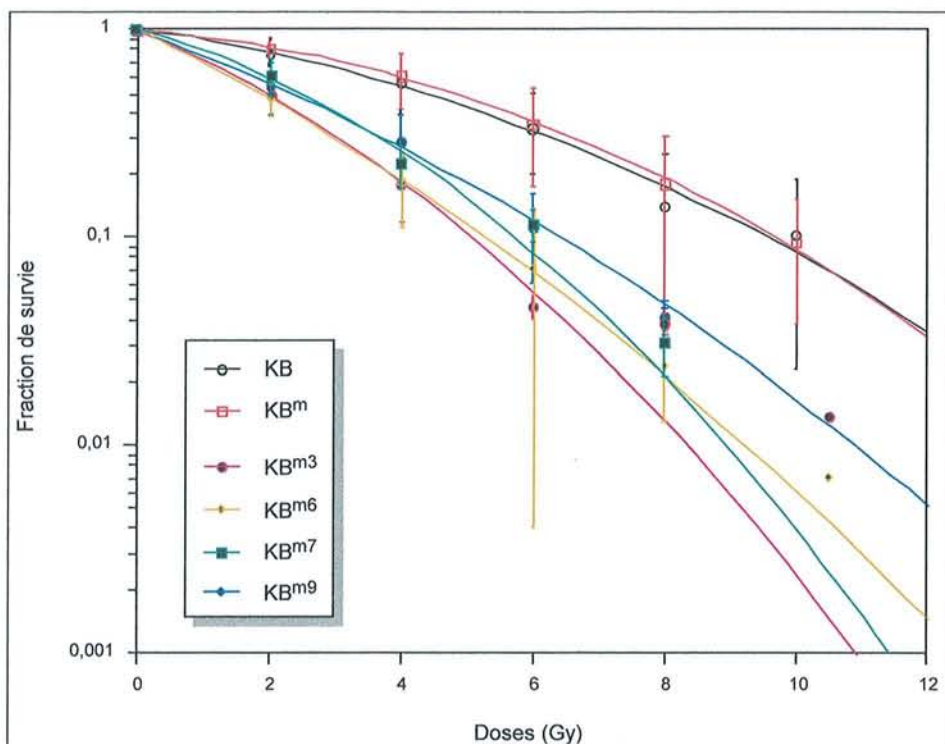


Figure 28 : Courbe de survie des clones $KB^{m3, 6, 7, 9}$.

VII.3.1.2 Lignée FaDu

Selon le même principe que la lignée KB, les paramètres radiobiologiques de FaDu, $FaDu^{m20}$ et $FaDu^{m72}$ sont présentés au Tableau 17.

Tableau 17 : Paramètres de radiosensibilités de FaDu, $FaDu^{m20}$ $FaDu^{m72}$.

Cell Lines	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	SF_2	MID (Gy)
FaDu	0,056 (0.000)	0,017 (0.004)	0,836 (0.014)	5,564 (0.543)
$FaDu^{m20}$	0.100 (0.053)	0.021 (0.006)	0.757 (0.070)	4.450 (0.509)
$FaDu^{m72}$	0.117 (0.094)	0.014 (0.011)	0.759 (0.099)	5.116 (0.108)

La lignée parentale montre une résistance importante à l'irradiation. En effet ses paramètres ($\alpha = 0,056$; $\beta = 0,017$; $SF_2 = 0,836$; MID = 5,564) en font la lignée la moins sensible parmi

celles testées dans ce travail. Les deux lignées filles FaDu^{m20} ($\alpha = 0,100$; $\beta = 0,021$; $SF_2 = 0,757$; $MID = 4,450$) et FaDu^{m72} ($\alpha = 0,117$; $\beta = 0,014$; $SF_2 = 0,759$; $MID = 5,116$), issues des fractions résistantes à 20 Gy et 72 Gy, sont plus radiosensibles bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives par rapport à la lignée mère ($P > 0,05$).

La Figure 29 montre que les courbes de survie de FaDu et FaDu^{m72} suivent un profil identique dans leur partie distale. A l'inverse, la partie proximale des courbes de FaDu^{m20} et FaDu^{m72} sont relativement similaires. Ceci est confirmé par leurs paramètres α et SF_2 (0,056 vs 0,100 et 0,836 vs 0,757 respectivement). Le fléchissement observé sur la courbe de FaDu^{m20} pour de fortes doses d'irradiation (>4 Gy) indique une divergence dans la partie distale entre FaDu^{m20} et FaDu^{m72} que confirment les paramètres MID (4,450 vs 5,116 respectivement).

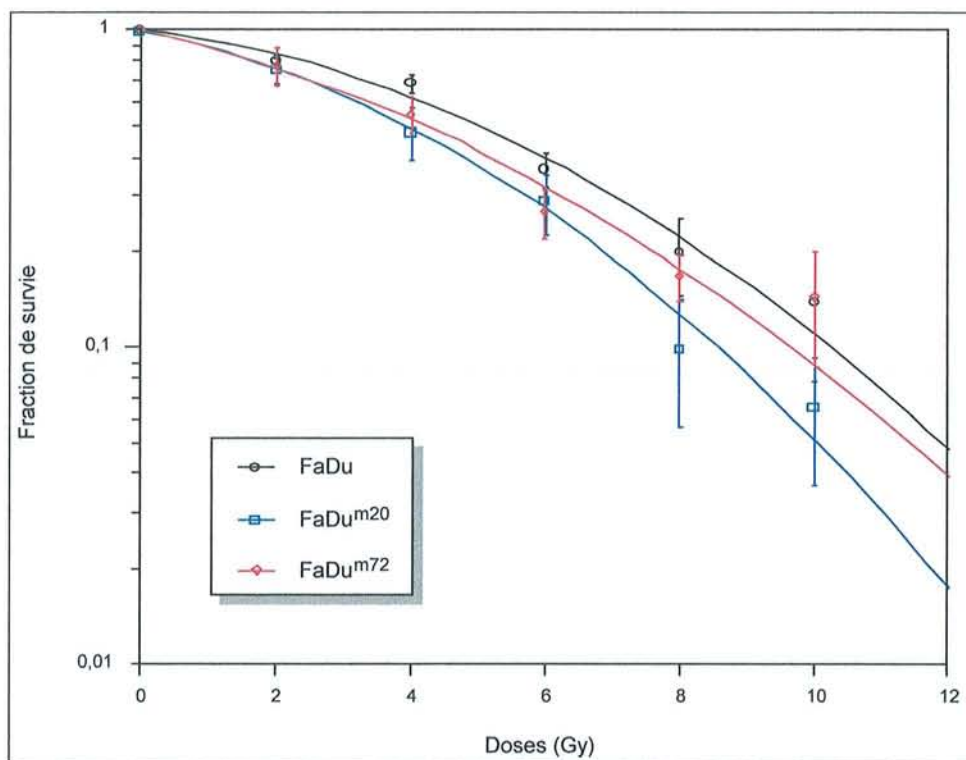


Figure 29 : Courbes de survie de la lignée FaDu et des fractions survivantes FaDu^{m20, 72}.

VII.3.2 Prolifération cellulaire

VII.3.2.1 Durée de la phase S

Les durées de phase S calculées pour la lignée KB et les clones issus de KB^m sont comprises entre $5,64 \pm 0,55$ h pour le clone KB^{m13} et $10,17 \pm 3,89$ h pour KB^{m4} (Tableau 18). Ce clone présente d'ailleurs une valeur extrême et élevée par rapport aux autres clones.

Tableau 18 : Paramètres de prolifération cellulaire de KB et des clones. Les valeurs sont les moyennes obtenues à partir d'au moins 4 séries de mesures.

Lignées	T _s (h)	LI	T _{pot} (h)	T _d (h)	Pertes cell.
KB	7,62 2,05	0,40 0,06	19,20 3,27	28,94 3,67	0,34
KB ^m	6,70 1,63	0,30 0,03	22,57 4,98	29,34 1,47	0,23
KB ^{m1}	6,32 0,93	0,24 0,02	26,05 3,66	31,40 2,26	0,17
KB ^{m2}	7,38 2,06	0,27 0,03	27,02 5,88	30,93 3,22	0,13
KB ^{m3}	7,62 1,05	0,28 0,01	26,78 3,43	36,86 5,81	0,27
KB ^{m4}	10,17 3,89	0,41 0,03	25,02 7,98	29,74 1,33	0,16
KB ^{m5}	6,01 0,75	0,28 0,03	21,75 3,22	28,37 4,34	0,23
KB ^{m6}	6,71 1,24	0,26 0,01	26,06 4,01	35,48 4,78	0,27
KB ^{m7}	6,83 0,84	0,27 0,04	25,11 3,53	34,21 5,31	0,27
KB ^{m8}	6,99 1,28	0,29 0,07	24,25 6,82	30,63 2,26	0,21
KB ^{m9}	6,64 0,64	0,31 0,02	21,41 1,79	33,05 6,28	0,35
KB ^{m10}	7,13 0,44	0,30 0,03	23,96 4,11	39,46 1,33	0,39
KB ^{m12}	7,50 0,85	0,28 0,02	26,96 2,61	32,69 8,93	0,18
KB ^{m13}	5,64 0,55	0,25 0,02	22,45 1,47	35,10 3,98	0,36

La durée moyenne de la phase S pour les clones est ainsi de $6,8 \pm 0,59$ h sans que la valeur du clone KB^{m4} soit prise en compte. Cette valeur est proche de celle de la fraction survivante KB^m ($6,70 \pm 1,63$) dont les clones sont issus. La lignée KB montre une durée de phase S de $7,62 \pm 2,05$ h qui, hormis celle de KB^{m4}, est la plus importante. Elle est ainsi supérieure de 0,92 h à celle de KB^m. Toutefois les variations mises en évidence entre KB et clones restent faibles comme le représente la Figure 30.

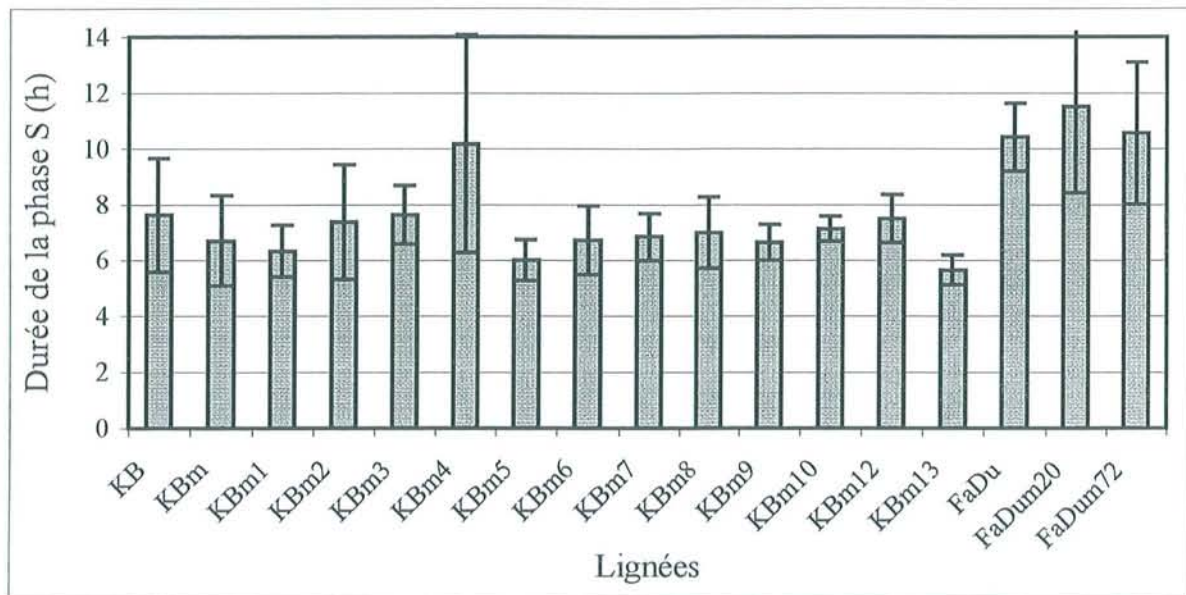


Figure 30 : Durée de la phase S des lignées et des clones.

FaDu présente une durée de phase S plus importante ($10,42 \pm 1,21$ h) que KB (Tableau 19). Les fractions survivantes FaDu^{m20} ($11,50 \pm 3,06$ h) et FaDu^{m72} ($10,56 \pm 2,53$ h) ne montrent pas de variations importantes entre elles ni par rapport à leur lignée mère (Figure 30).

Tableau 19 : Paramètres de prolifération cellulaire de FaDu et des fractions survivantes. Les valeurs sont les moyennes obtenues à partir d'au moins 4 séries de mesures.

Cell Lines	Phase S (h)	LI (%)	Tpot (h)
FaDu	10,42 1,21	0,40 0,02	25,97 2,16
FaDum20	11,50 3,06	0,41 0,02	28,17 6,56
FaDum72	10,56 2,53	0,42 0,03	25,26 4,72

VII.3.2.2 Labelling Index

Les valeurs de labelling index (Tableau 18) qui représentent la proportion de cellules marquées par le BrdU sont comprises entre $0,24 \pm 0,02$ pour KB^{m1} et $0,41 \pm 0,03$ pour KB^{m4}. La Figure 31 met en évidence le fait que la valeur du LI du clone KB^{m4} se distingue

particulièrement de celle des autres clones dont les valeurs s'échelonnent de $0,24 \pm 0,02$ pour KB^{m1} à $0,31 \pm 0,02$ pour KB^{m9} . En effet, la moyenne des LI sans tenir compte de KB^{m4} , s'élève à $0,28 \pm 0,02$. Cette valeur est d'ailleurs proche de celle de KB^m ($0,30 \pm 0,03$). La lignée mère KB montre un LI de $0,40 \pm 0,06$ ce qui signifie que la proportion de cellules marquées est 1,3 à 1,6 fois plus importante que dans KB^m ou les clones.

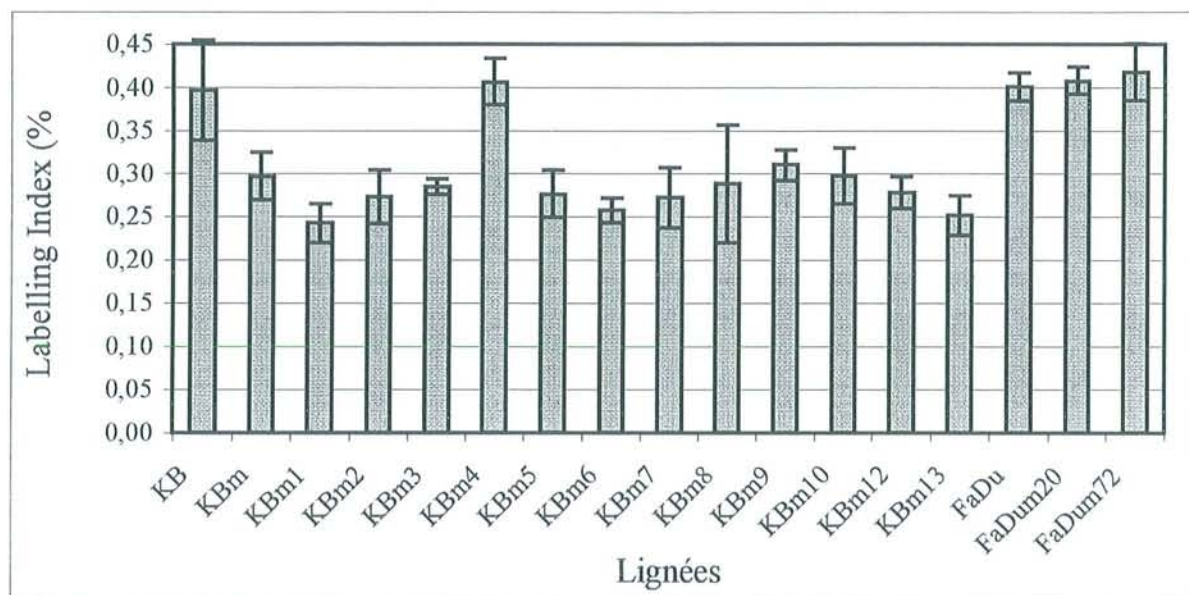


Figure 31 : Labelling Index des lignées et des clones.

La lignée FaDu, montre un LI de $0,40 \pm 0,02$ identique à celui de KB (Tableau 18). Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les valeurs de LI des fractions résistantes et la lignée mère FaDu. Contrairement à KB^m où le LI diminue fortement par rapport à la lignée mère, les fractions survivantes de FaDu ne semblent pas affectées par l'irradiation.

VII.3.2.3 Temps potentiel de doublement

Les valeurs de temps potentiel de doublement des clones issus de KB^m sont relativement proches les unes des autres, elles varient de $21,41 \pm 1,79$ h pour KB^{m9} à $27,02 \pm 5,88$ h pour KB^{m2} (Tableau 18). Le T_{pot} moyen des clones est de $24,73 \pm 1,92$ h. Cette valeur est proche de celle de KB^m ($22,57 \pm 4,98$ h). Toutefois, les écarts-types sont souvent élevés notamment pour

KB^{m4} ce qui est logique vu que le T_{pot} résulte d'un calcul prenant en compte la durée de la phase S dont les variations sont importantes. Le T_{pot} de la lignée mère KB est faible ($19,20 \pm 3,27$) ce qui confirme le fait que cette lignée doit êtreensemencée à $0,5 \cdot 10^4$ au lieu de $1 \cdot 10^4$ cellules/ml lors des entretiens hebdomadaires afin de maintenir une croissance exponentielle. D'une manière générale, les T_{pot} des clones et de KB^m sont supérieurs à celui de la lignée mère non irradiée (Figure 32).

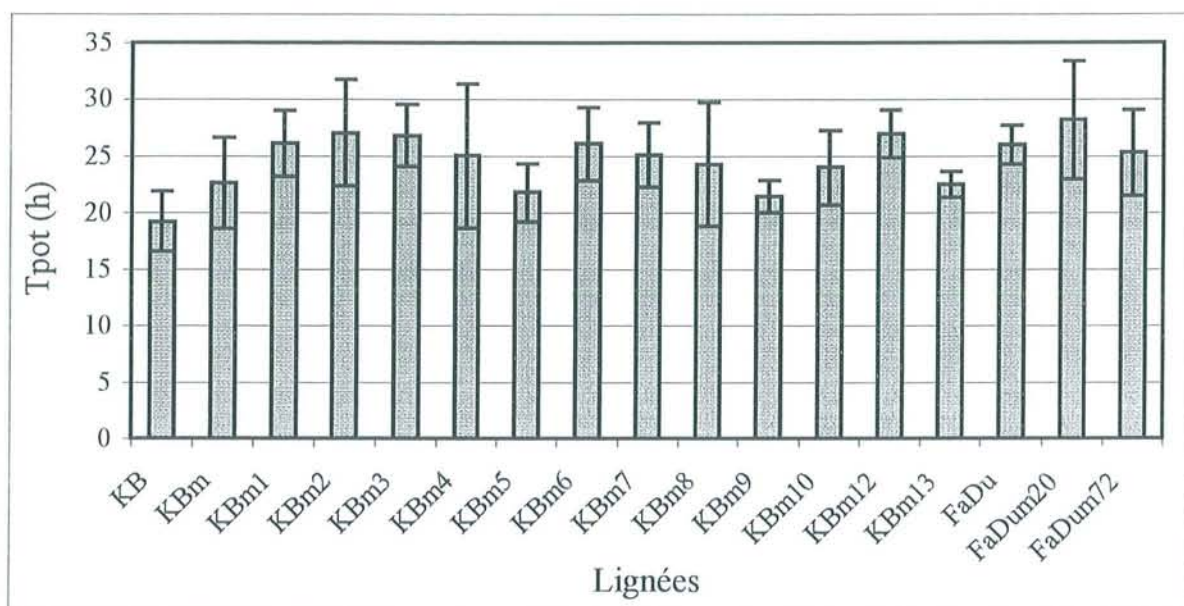


Figure 32 : Temps potentiel de doublement.

Avec une valeur de $28,17 \pm 6,56$ h, le T_{pot} de FaDu^{m20} est le plus élevé (Tableau 19). Celui de la ligne mère FaDu montre une valeur inférieure de $25,97 \pm 2,16$ h alors que celui de la fraction survivante FaDu^{m72} est de $25,26 \pm 4,72$ h. Toutefois, comme pour la lignée KB et les clones, les erreurs sont parfois importantes et limitent les interprétations.

VII.3.2.4 Temps de doublement

Les temps de doublement des clones cellulaires calculés à partir des courbes de croissance donnent des valeurs plus élevées que celles du T_{pot} (Figure 33). Elles s'étalent de $28,37 \pm 4,34$ h pour le clone KB^{m5} jusqu'à $39,46 \pm 2,71$ h pour KB^{m10} (Tableau 18). Le temps de

doublement moyen des clones s'établi à $33,16 \pm 3,07$ h. Cette valeur est supérieure à celle de la fraction survivante KB^m ($29,34 \pm 1,47$) dont les clones dérivent. Son temps de doublement est par ailleurs supérieur à celui de la lignée mère KB ($28,94 \pm 3,67$) sans toutefois être significativement différent. Il est à noter que le clone KB^{m5} se divise plus rapidement que KB et KB^m ce qui confirme là encore les faits expérimentaux. Les temps de doublement de FaDu, FaDu^{m20} et FaDu^{m72} n'ont pas été déterminés.

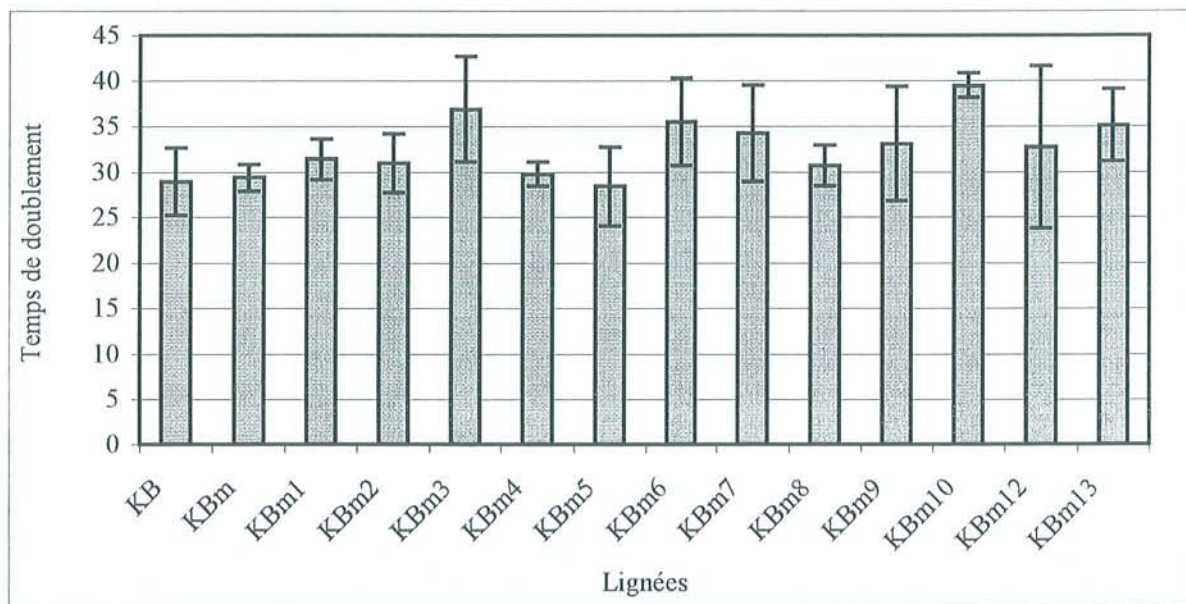


Figure 33 : Temps de doublement déterminés par test MTT.

VII.3.2.5 Pertes cellulaires

Les taux de pertes cellulaires sont estimés selon l'Équation III.2. Il s'agit en fait du complément du taux de nouvelles cellules estimé selon le ratio du T_{pot} par rapport au T_d . Dans KB et les clones, il est surprenant de voir qu'il se produit entre 17 % (KB^{m2}) et 39 % (KB^{m10}) de pertes cellulaires (Figure 34). Le taux moyen de pertes cellulaire des clones se situe à 25 %, il est donc proche de celui de KB^m (23 %). La lignée KB montre l'une des valeurs les plus élevées (34 %).

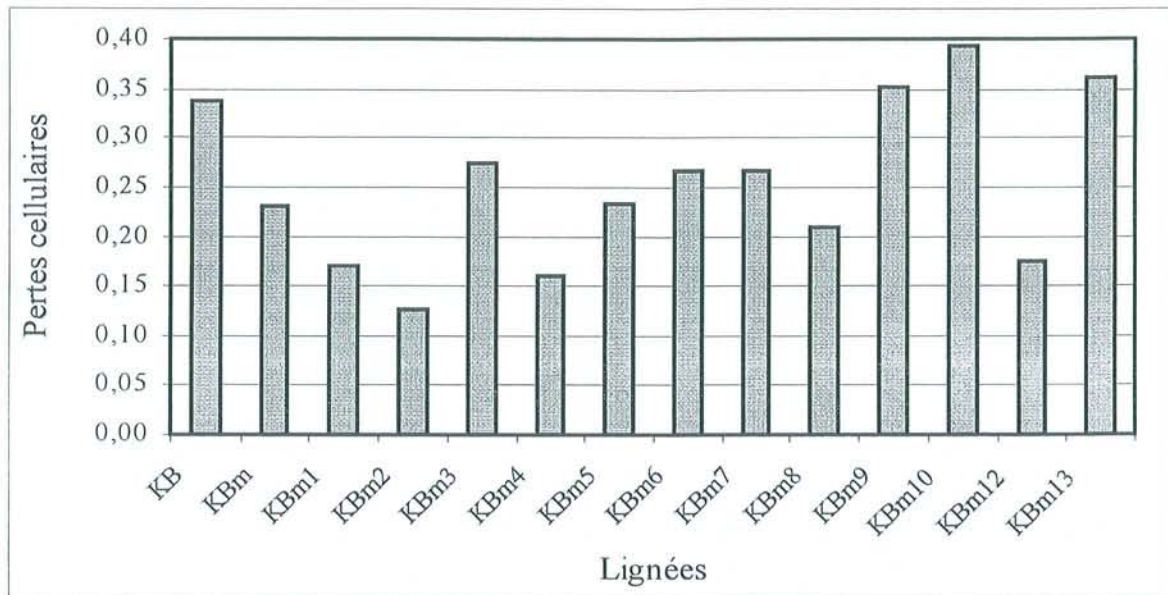


Figure 34 : Pertes cellulaires pour KB, KB^m et les clones. Elles sont calculées selon la formule : $1-(T_{pot}/T_d)$.

VII.4 Discussion

VII.4.1 Radiosensibilité

KB est une lignée polyclonale dont la radiosensibilité résulte de la combinaison de celle des clones qui la composent. Dans cette étude, la lignée cellulaire KB peut être considérée comme relativement radiorésistante ($SF_2=0,74 \text{ Gy} \pm 0,08$) comparé à la SF_2 moyenne ($0,49 \text{ Gy} \pm 0,12$) d'autres carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures comme établi précédemment (267). Cette radiorésistance intrinsèque de la lignée KB limite certainement l'augmentation de la radiorésistance de la lignée fille KB^m. L'irradiation fractionnée initiale de $5 \times 2 \text{ Gy}$ n'est certainement pas suffisante pour affecter les paramètres radiobiologiques de manière significative. Ce fait peut également être imputé à la sensibilité de la technique mise en œuvre. En effet les essais clonogéniques constituent la méthode de référence pour la détermination de la survie après irradiation (231). Toutefois, d'un strict point de vue technique, les erreurs de répétabilité limitent la mise en évidence des variations fines de radiosensibilité. Bien qu'une méthode de comptage semi-automatique des colonies ait été utilisée afin de réduire les erreurs de comptage, seule une optimisation et une standardisation plus poussée pourraient permettre de minimiser les variations expérimentales.

La radiosensibilisation inattendue observée dans les clones peut résulter de l'inactivation ou de la modulation de l'expression de gènes induits par l'irradiation initiale. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer les variations de radiosensibilité. Ainsi le taux de prolifération cellulaire est lié dans certains cas à des variations de radiosensibilité. Les processus de détoxification sont également impliqués dans les variations de sensibilité aux radiations ionisantes par l'intermédiaire d'enzymes telles que les superoxyde dismutases, les métallothionéines ou encore les enzymes liées au glutathion comme les glutathion S-transférases et les glutathion réductase et peroxydase. En plus des voies de détoxification, le niveau de radiosensibilité est contrôlé par d'autres mécanismes tels que les arrêts radio-induits du cycle cellulaire (268), l'inactivation des mécanismes réparation des radio-lésions de l'ADN (269), ou encore l'induction d'apoptose via plusieurs voies (270, 271).

La radiosensibilité a été testée jusqu'à 18 mois après l'irradiation initiale et l'isolement des clones. Bien que des variations soient observées au cours de cette période, aucune variation de la sensibilité n'est mise en évidence. Ceci mène à penser que les caractéristiques de radiosensibilité des clones sont acquises et stables.

Tout comme KB, la lignée FaDu montre une résistance importante à l'irradiation ($SF_2=0,836$ Gy \pm 0,014) comparé à d'autres carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (267). Les paramètres α ($0,056 \pm 0,000$) et MID ($5,564 \pm 0,543$) confirment ce fait. Toutefois il a été montré que cette lignée n'exprime pas de protéine p53 fonctionnelle (272, 273). Or il a été proposé que l'absence ou la diminution des processus liés à une protéine p53 mutée, tels que l'induction d'apoptose, les arrêts du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN, pouvaient entraîner une augmentation de la résistance aux radiations ionisantes (274, 275). L'absence de p53 fonctionnelle pourrait donc expliquer, tout du moins en partie, la résistance importante de FaDu.

Les fractions cellulaires survivantes FaDu^{m20} et FaDu^{m72} issues de FaDu après l'irradiation fractionnée n'ont pas permis d'obtenir d'augmentation significative de la radiorésistance. Là encore les mêmes explications que pour KB^m peuvent être avancées.

Il semble intéressant de noter que les fractions résistantes issues de KB et FaDu ont des radiosensibilités proches de leurs lignées mères respectives alors que les clones issus de KB^m montrent des paramètres de radiosensibilités très différents de KB.

Ces faits amènent à caractériser plus précisément les lignées cellulaires KB et FaDu, leurs fractions survivantes respectives KB^m , $FaDu^{m20}$ et $FaDu^{m72}$ ainsi que les clones KB^{m1} à KB^{m13} . Les paramètres de prolifération cellulaire sont donc étudiés.

VII.4.2 Prolifération cellulaire

Les clones ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité cellulaire au niveau de la radiosensibilité ; l'implication éventuelle des paramètres de prolifération dans la sensibilité à l'irradiation de FaDu, KB et de leurs fractions survivantes ainsi que des clones est donc abordée sous le même aspect.

VII.4.2.1 Durée de la phase S (T_s)

La phase S du cycle cellulaire, pendant laquelle a lieu la synthèse d'ADN, est rapportée comme étant peu sensible aux irradiations (276, 277). Il a donc été proposé que la durée de la phase S pouvait être liée à la sensibilité aux agents anticancéreux tels que les radiations ionisantes (276, 278).

Les durées de phases S rapportées dans la littérature, pour des cellules cultivées *in vitro* en phase exponentielle de croissance, varient habituellement de 6 à 10 heures ce qui est comparable aux valeurs obtenues pour KB et les clones hormis KB^{m4} . Toutefois, certains auteurs rapportent des durées supérieures jusqu'à 17 heures (279). Les faibles variations de durée de phase S entre KB, KB^m et les clones peuvent expliquer l'absence de corrélation avec les paramètres de radiosensibilité (α , β , SF_2 et MID). Certains clones résistants ($KB^{m12, 8}$) montrent toutefois des valeurs élevées de phase S. La même observation est faite à propos de FaDu dont la durée de phase S est très longue ($10,42 \pm 1,21$ h) et qui est une lignée plus radiorésistante que KB. Ceci concorde avec le fait qu'une durée de phase S importante peut réduire la sensibilité des cellules. Toutefois, il semble nécessaire de prendre également en considération la proportion de cellules en phase S dans la totalité du cycle plutôt que sa seule durée (278).

Les erreurs sur les valeurs de durée de phase S sont élevées. En effet, la détermination du temps de phase S est basée sur le déplacement des cellules marquées dans le cycle cellulaire. Mais l'évaluation de la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle entraîne des

imprécisions parfois importantes qui se répercutent sur les calculs ainsi que l'ont rapportés certains auteurs (65).

VII.4.2.2 Labelling Index (LI)

Le labelling index ou index de marquage résulte d'une détermination directe de la proportion de cellules marquées, sa valeur est donc plus fiable que celle du temps de phase S. Ainsi le LI reflète la capacité proliférative de la population cellulaire. Or ces cellules prolifératives sont plus sensibles à l'irradiation contrairement aux cellules quiescentes (280, 281).

Alors qu'elle est fortement radiorésistante, la lignée mère KB montre un LI élevé ce qui est en contradiction avec le fait précédent. Quiet *et al.* (282) retrouvent le même phénomène en comparant *in vitro* deux lignées cellulaires dont la plus résistante montre l'index de prolifération le plus important. Aucune corrélation significative n'est mise en évidence entre les valeurs de LI et les paramètres radiobiologiques pour KB et les clones. Peikkola-Heino *et al.* ont fait la même observation sur une série de 30 lignées cellulaires issues de carcinomes des VADS (278). De plus, aucune corrélation avec la radiosensibilité n'a été mise en évidence comme pour KB et ses clones. En radiothérapie clinique, le caractère prédictif à la radiosensibilité du LI a été étudié et reste controversé. Certaines études montrent une corrélation entre la prolifération et le contrôle tumoral (280, 283) alors que d'autres n'ont pu mettre en évidence aucune valeur pronostique du LI (284). L'irradiation fractionnée de KB a modifié la proportion de cellules prolifératives de KB^m. Ceci se retrouve également dans les clones dont la moyenne des LI est proche de celle de KB^m. Ces valeurs reflètent donc l'hétérogénéité cellulaire de KB^m. Toutefois KB^{m4} semble avoir gardé la même proportion de cellules prolifératives que KB mais son incapacité à former des colonies empêche la détermination de sa radiosensibilité.

Les trois lignées FaDu, de radiosensibilité équivalente, montrent des LI proches ce qui indique que l'irradiation n'a pas affecté la proportion de cellules prolifératives contrairement à KB^m.

VII.4.2.3 Temps potentiel de doublement (T_{pot})

L'irradiation de KB a notamment eu pour conséquence d'allonger le T_{pot} des clones ce qui influence leur temps de doublement. Le renouvellement cellulaire est donc plus lent que dans

la lignée mère. Plusieurs études ont montré qu'un renouvellement rapide de la population cellulaire proliférative, représenté par le T_{pot} (285, 286), était le facteur principal de la perte de contrôle tumoral lors d'une irradiation fractionnée (287-289) notamment dans le cas des tumeurs des VADS (253, 288, 290, 291). De plus l'utilisation du T_{pot} montre son utilité dans la prise en compte des pertes cellulaires. Dans une culture cellulaire, il y a peu de pertes cellulaires. De plus, sur une culture cellulaire, ce n'est pas la réponse ou son contrôle qui sont mesurés mais la radiosensibilité. Ces éléments expliquent sûrement l'absence de corrélation observée entre la radiosensibilité des clones et le T_{pot} . L'absence de variations significatives du T_{pot} des fractions survivantes FaDu^{m20} et FaDu^{m72} tend à montrer que l'irradiation de FaDu n'a pas eu les mêmes effets que sur KB mais l'analyse ne concerne que 2 fractions survivantes alors que pour KB, 12 clones sont pris en compte.

Le temps potentiel de doublement prend en compte la proportion de cellules en prolifération et la durée de la phase S pour être déterminé (277, 292). Ceci induit des erreurs importantes qui limitent les interprétations. Les imprécisions de calcul font que l'utilisation du T_{pot} est peu adaptée à la détermination de la prolifération cellulaire sur des cellules en culture. Ce paramètre montre son utilité pour des valeurs plus importantes de l'ordre de plusieurs jours, comme les tumeurs.

VII.4.2.4 Temps de doublement (T_d)

La détermination des temps de doublements par test MTT permet de mettre en évidence plus précisément les différences de prolifération entre les clones et la lignée mère. En apparence, l'irradiation n'a pas eu d'effet sur la prolifération de KB^m par rapport à KB contrairement à certains clones (notamment KB^{m3,6,7,10,13}). Ces données sont en contradiction avec le fait que les cellules tumorales à croissance rapide sont considérées comme plus radiosensibles que celles à croissance lente (278). Ce résultat est à rapprocher d'une étude de Peikkola-Heino *et al.* parvenant à une conclusion similaire (278). L'absence de corrélation avec la radiosensibilité suggère que celle-ci n'est pas directement liée à la prolifération cellulaire dans ce modèle et donc que d'autres facteurs interviennent dans sa détermination.

VII.4.2.5 Pertes cellulaires

Les pertes cellulaires résultent principalement de la mort et de la différenciation cellulaire. Dans les lignées cellulaires cultivées en monocouche, elles sont habituellement réduites car

ces processus ne se produisent pas ou peu. Par exemple, le taux d'apoptose spontanée est généralement inférieur à 5 %.

Il a été précisé plus haut que la technique de mesure du T_{pot} est plus adaptée aux tumeurs qu'aux cultures cellulaires ce qui entraîne des incertitudes de mesure importantes. Les T_d calculés sont relativement élevés ce qui peut s'expliquer techniquement car les expérimentations sont réalisées dans des plaques 96 puits qui ne permettent pas la même croissance cellulaire que des flacons classiques (de type 75 cm²). Il serait donc nécessaire de confirmer ces résultats en utilisant un support de culture identique lors des déterminations de T_{pot} et T_d ainsi qu'un test différent (exclusion au bleu trypan, Sulforhodamine B).

Les pertes cellulaires importantes mises en évidence sont donc probablement dues à de mauvaises estimations du T_{pot} et du T_d .

L'irradiation a donc eu pour effet de modifier la prolifération des clones par rapport à KB. La diminution du LI, donc de la proportion de cellules prolifératives, a eu pour conséquence d'allonger le temps potentiel de doublement et, dans une moindre mesure, le temps de doublement car le temps de phase S reste globalement identique. Les pertes cellulaires importantes sont probablement dues à de mauvaises estimations du T_{pot} et du T_d . Aucune relation avec la radiosensibilité n'a pu être mise en évidence. Dans ce modèle de carcinome des VADS, les paramètres de prolifération cellulaire ne reflètent donc pas les variations de sensibilité aux radiations ionisantes et d'autres paramètres entrent en jeu dans la détermination de la radiosensibilité.

RESUME

La fraction survivante à l'irradiation fractionnée (5x2 Gy) de KB (dont la radiorésistance intrinsèque est importante) a permis d'isoler 13 clones. Ceux-ci montrent une diminution variable de la résistance (jusqu'à 2 fois pour la SF₂) pouvant résulter de l'inactivation ou de la modulation de l'expression de gènes induits par l'irradiation initiale. Tout comme KB^m, les fractions survivantes issues de FaDu ne montrent pas de différence significative de radiosensibilité. La résistance importante de FaDu peut être attribuée à l'inactivation de p53.

La durée de la phase S, considérée comme radiorésistante, montre peu de variations entre les clones. Il en est de même pour leur labelling index qui est toutefois inférieur à celui de la lignée mère. L'irradiation fractionnée de KB a eu pour effet de diminuer le LI mais d'allonger le T_{pot} et le T_d de certains clones. Sur FaDu, peu d'effets sont observés. Les pertes cellulaires importantes dans KB et les clones reflètent des différences techniques dans la détermination des T_{pot} et T_d.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les paramètres de prolifération cellulaire et ceux de la radiosensibilité ce qui suppose que d'autres facteurs interviennent dans sa détermination.

Chapitre VIII

**Expression radio-induite de p53 et relations
avec les arrêts du cycle cellulaire.**

VIII Expression du gène et de la protéine p53.

VIII.1 Objectifs

Dans les cancers des VADS, il a été montré que les variations de radiosensibilité peuvent être liées, dans certains cas, au statut p53. En effet, cette protéine est impliquée dans de nombreux phénomènes liés à la réponse aux radiations ionisantes. L'altération de ses fonctions au niveau transcriptionnel ou traductionnel peut donc avoir des répercussions sur les processus de réparation des radiolésions, les arrêts du cycle cellulaire ou encore l'induction d'apoptose. Le niveau d'expression a également été reporté comme pouvant influencer ces phénomènes et donc la sensibilité aux radiations ionisantes. Le taux d'expression basal de l'ARNm de p53 a donc été mesuré. La cinétique d'expression de l'ARNm après irradiation à 2 et 4 Gy dans la lignée KB et deux clones KB^{m5} et KB^{m12} , a été suivie.

Le second objectif concerne l'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases cycle et des arrêts aux points de contrôle. La radiosensibilité varie selon les phases du cycle cellulaire et selon les lignées. Mais d'une manière générale, la phase M est plus sensible que la phase G_1 . La distribution initiale des cellules dans les phases du cycle peut donc influencer la radiosensibilité. Cette répartition a donc été déterminée afin d'établir une relation avec les variations de sensibilité aux radiations ionisantes des clones issus de KB ainsi que de FaDu et des fractions survivantes.

La cellule réagit à l'irradiation en induisant des arrêts du cycle notamment à deux points de contrôle particuliers : les transitions G_1/S et G_2/M . Ceci se traduit par une accumulation des cellules au niveau de ces points de contrôle qu'il est facile de mettre en évidence par un marquage de l'ADN. Il a été montré que ces arrêts radio-induits sont en relation directe avec la réponse et donc la sensibilité aux radiations ionisantes.

Les arrêts du cycle cellulaire ont donc été suivis dans les lignées et les clones après une irradiation de 2 Gy. Le rapport entre ces arrêts radio-induits et la radiosensibilité est analysé en prenant en compte l'influence de l'hétérogénéité cellulaire représentée par les clones et le statut p53.

VIII.2 Méthodologie

VIII.2.1 RT-PCR semi-quantitative

Afin de procéder à l'amplification des ARNm des gènes p53 et β 2-microglobuline qui est le gène de référence, une transcription inverse est réalisée. Celle-ci est effectuée par une méthode non dirigée à l'aide d'amorces aléatoires ce qui permet, à partir d'un échantillon initial d'ARNtx, d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) utilisable pour amplifier n'importe quel gène. La méthode par oligodT n'a pas été choisie car seule la partie 3' de l'ARN est efficacement rétro-transcrite, ce qui peut poser un problème lorsque le fragment à amplifier se situe dans la partie opposée (en 5').

Les amplifications sont réalisées soit de manière « classique » dans des tubes à parois fines placés dans un thermocycleur PHC-3, soit à l'aide d'un thermocycleur Rapidcycler et de tubes capillaires. Cette technologie apparue au milieu des années 90 présente de nombreux avantages. Le principe repose sur des échanges de chaleur quasi instantanés du mélange réactionnel placé dans un tube capillaire et dont le volume n'excède pas 10 μ l. Ceci permet d'écourter les phases de montée et de descente en température ainsi que celles de dénaturation de l'ADN et d'appariement des amorces. Ainsi une PCR de 30 cycles, qui habituellement dure 2 à 3 heures, est achevée en 15 à 20 minutes.

La RT-PCR semi-quantitative fait appel à une co-amplification du gène p53 et d'un gène de référence (β 2-microglobuline). Une optimisation des conditions d'amplification due aux interactions et compétitions est donc nécessaire.

Lors de l'analyse par électrophorèse des produits de PCR, le bromure d'éthidium migre dans le sens inverse de l'ADN. Il est préférable de laisser l'ADN en contact avec le BET afin d'obtenir la meilleure visualisation et donc d'éviter que l'ADN migre dans une zone qui ne contient plus de BET. Les conditions de migration sont notamment optimisées selon ce paramètre. Les gels sont analysés par densitométrie à l'aide d'un système d'analyse d'image. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de produits de PCR. L'intensité du signal est ajustée avant la prise d'image afin de ne pas saturer le capteur de la caméra. En effet, cela entraîne une modification des intensités relatives de fluorescence des produits de PCR.

VIII.2.2 Western-Blot

La détection de la protéine p53 est réalisée par immuno-blot. Les protéines, extraites à 4°C à partir des cellules en phase exponentielle de croissance sont transférées sur une membrane de PVDF de porosité adéquate, après séparation sur un gel de polyacrylamide. Les propriétés de séparation du gel varient selon le degré de réticulation du gel (qui dépend du ratio acrylamide/bisacrylamide et qui est ici de 19:1) ainsi que de la concentration (qui permet de faire varier la densité de ce gel). Ici, seule la concentration du mélange acrylamide / bisacrylamide varie en fonction de la protéine à mettre en évidence. Avant de procéder au marquage, la membrane est saturée pour éviter les fixations aspécifiques des anticorps. La protéine cible est alors détectée par un anticorps spécifique qui lui-même est mis en évidence par une réaction immuno-colorimétrique dont le principe repose sur l'émission de lumière à partir du luminol qui est un substrat de la horseradish peroxidase (HRP) couplée aux anticorps secondaires.

VIII.2.3 Analyse du cycle cellulaire

La méthode utilisée est basée sur le marquage des cellules par l'Iodure de Propidium (IP) qui est un intercalant de l'ADN double brin. Cette technique permettant d'obtenir un histogramme de répartition des cellules dans le cycle s'effectue sur des cellules en phase exponentielle de croissance (J3). Le suivi des arrêts du cycle cellulaire qui se déroule sur 48 heures, est réalisé après une irradiation initiale de 2 Gy effectuée à J3 afin de se placer dans des conditions identiques. Le contact avec l'IP est réalisé à 4°C pendant 24 h car ceci permet un meilleur marquage que lors d'un contact court. L'IP entre dans les cellules puis les noyaux grâce à l'ajout d'un détergent, le triton X100, dans la solution de marquage. L'ajout de RNase a pour but d'éliminer le bruit de fond causé par le marquage aspécifique de l'IP sur les ARN.

L'algorithme de Dean et Jett permet d'estimer le nombre de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire. Le logiciel détermine l'emplacement des pics G_0/G_1 et G_2/M qui correspondent respectivement à un contenu en ADN de N et 2N. La répartition des cellules dans chacune de ces 2 phases suit théoriquement une distribution normale. La phase S est assimilée à une somme de gaussiennes entre les 2 pics déterminés précédemment et dont l'amplitude est modulée par un polynôme du second degré. Le CV de ces gaussiennes est égal à celui du pic G_0/G_1 . L'équation totale de l'histogramme comporte 9 paramètres qui sont calculés de façon itérative afin d'ajuster l'histogramme de cycle réel par une méthode des

moindres carrés. Pour chacun des 256 canaux de fluorescence (représentant le contenu en ADN), cette méthode permet donc d'estimer la proportion et le nombre de cellules appartenant à chacune des phases G_0/G_1 , S et G_2/M .

Les histogrammes obtenus à partir de marquages à l'IP permettent de visualiser facilement les arrêts du cycle cellulaire. Une variation du nombre de cellules dans différents canaux de fluorescence est observée ce qui signifie qu'une accumulation se produit dans une phase du cycle. Les arrêts sont représentés graphiquement dans le temps comme une proportion relative par rapport aux témoins non traités ce qui permet de s'affranchir des différences de répartition mises en évidence entre les lignées et les clones et de faciliter la lecture et l'interprétation des arrêts radio-induits. Une dose d'irradiation de 2 Gy a été choisie car elle est la dose la plus communément utilisée en radiothérapie clinique. Les mesures ont été réalisées toutes les 4 heures pendant 24 heures. Afin de confirmer le retour à la normale et/ou détecter une prolongation des arrêts, des mesures supplémentaires sont faites 36 et 48 heures après l'irradiation. Une série de mesure a également été effectuée 1/2 heure après l'irradiation pour mettre en évidence d'éventuels changements rapides de distribution cellulaire.

VIII.3 Résultats

VIII.3.1 Expression de p53

VIII.3.1.1 Taux d'expression basal de l'ARNm de p53

L'analyse par RT-PCR du taux d'expression basal de l'ARNm de p53 montre des variations importantes entre les clones et les lignées (Figure 35). Ainsi, la lignée mère KB exprime très faiblement p53. La valeur du ratio ($0,02 \pm 0,01$ par rapport à l'expression de la β 2-microglobuline) est proche de zéro. De plus l'erreur importante du ratio peut être attribuée au bruit de fond lors de l'analyse densitométrique.

La fraction survivante KB^m montre un RER de $0,23 \pm 0,04$ ce qui signifie que le niveau d'expression est environ 11 fois supérieur à celui de KB. Les clones issus de KB^m ont des taux d'expression encore plus élevés sauf pour KB^{m13} dont la valeur est identique à celle de KB ($0,02 \pm 0,01$). Ils varient de $0,76 \pm 0,22$ pour KB^{m7} à $1,67 \pm 0,71$ pour KB^{m12} (soit respectivement de 35 à 76 fois supérieur à la valeur de KB). La moyenne des RER des clones est de $1,17 \pm 0,24$ ce qui est significativement supérieur à la valeur de KB^m .

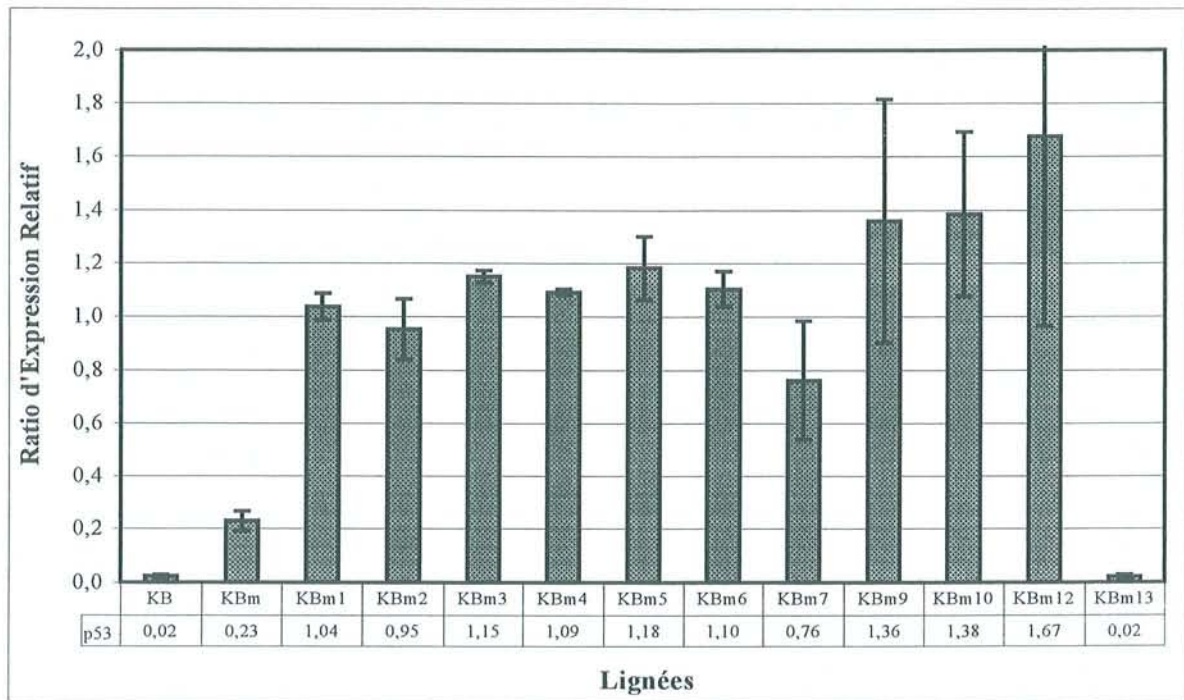


Figure 35 : Taux d'expression basal de l'ARNm de p53 dans KB et les clones.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le taux d'expression basal de l'ARNm p53 et les paramètres de radiosensibilité. En effet, par exemple, KB^{m1} est résistant par rapport aux autres clones et montre un RER de $1,04 \pm 0,05$ alors que KB^{m2} qui est nettement plus sensible, montre peu de différence d'expression basale de p53 ($0,95 \pm 0,11$). Le clone KB^{m13} est également représentatif de cette situation car sa radiosensibilité, similaire à KB^{m2}, ne reflète pas son niveau d'expression en ARNm de p53 proche de zéro.

VIII.3.1.2 Cinétique d'expression de l'ARNm de p53

L'expression de l'ARNm de p53 a été suivie pendant 48 heures après une irradiation de 2 ou 4 Gy dans la lignée mère KB et deux clones de radiosensibilité différente, KB^{m5} et KB^{m12}. La Figure 36 montre un exemple d'amplification de p53 qui produit une bande de 640 pb. Afin de faciliter la lecture des graphes, les points expérimentaux à 48 heures n'ont pas été représentés sur les Figure 37 et Figure 38.

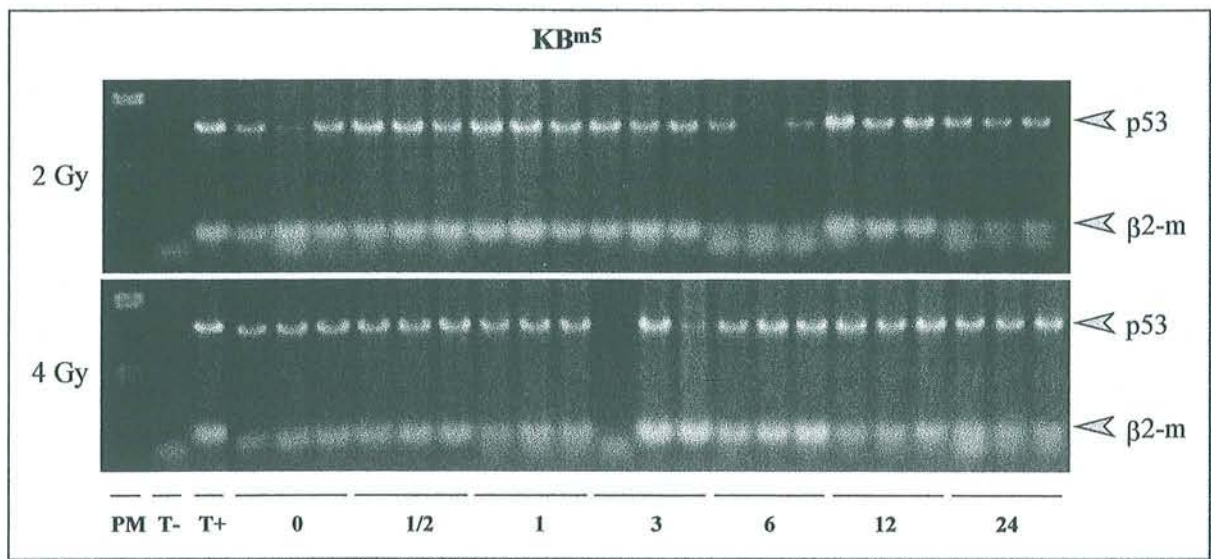


Figure 36 : Exemple de cinétique d'amplification du gène p53 dans le clone KB^{m5} après irradiation à 2 et 4 Gy.

Tableau 20 : Cinétique du Ratio d'Expression Relative (RER) de l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB		KB ^{m5}		KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy
0	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00
0,5	1,33 0,07	1,27 0,51	1,13 0,23	1,30 0,16	2,48 0,95	0,95 0,21
1	1,45 0,23	2,54 0,95	1,17 0,37	1,79 0,53	1,89 1,14	1,35 0,33
3	1,25 0,26	2,38 1,05	1,21 0,46	1,22 0,42	2,18 1,37	1,24 0,38
6	1,25 0,49	1,36 0,98	1,48 0,49	1,14 0,33	2,44 1,21	1,01 0,35
12	1,14 0,45	2,02 1,30	1,03 0,38	1,48 0,60	1,48 0,95	1,49 0,51
24	0,85 0,16	1,19 0,49	1,41 0,40	1,58 0,41	1,54 0,79	1,02 0,36
48	0,66 0,15	1,16 0,61	1,32 1,54	1,29 0,54	2,52 1,37	0,82 0,40

L'irradiation à 2 Gy induit une expression monophasique du gène de p53 dans les trois lignées étudiées avec toutefois des intensités différentes (Figure 37). Celle-ci débute rapidement puisque après 30 minutes, les RER sont 1,33 ; 1,13 et 2,48 fois plus importants respectivement pour KB, KB^{m5} et KB^{m12} (Tableau 20). Un décalage est mis en évidence entre les pics d'expression des deux clones atteints après 6 heures dont les valeurs sont respectivement de $1,48 \pm 0,49$ et $2,44 \pm 1,21$ (hormis le pic de KB^{m12} 30 minutes après

irradiation) alors que le pic d'induction de KB l'est plus rapidement dès 1 heure ($1,45 \pm 0,23$). Les RER de p53 amorcent alors une décroissance pour atteindre à nouveau leur niveau de base en 24 à 48 heures.

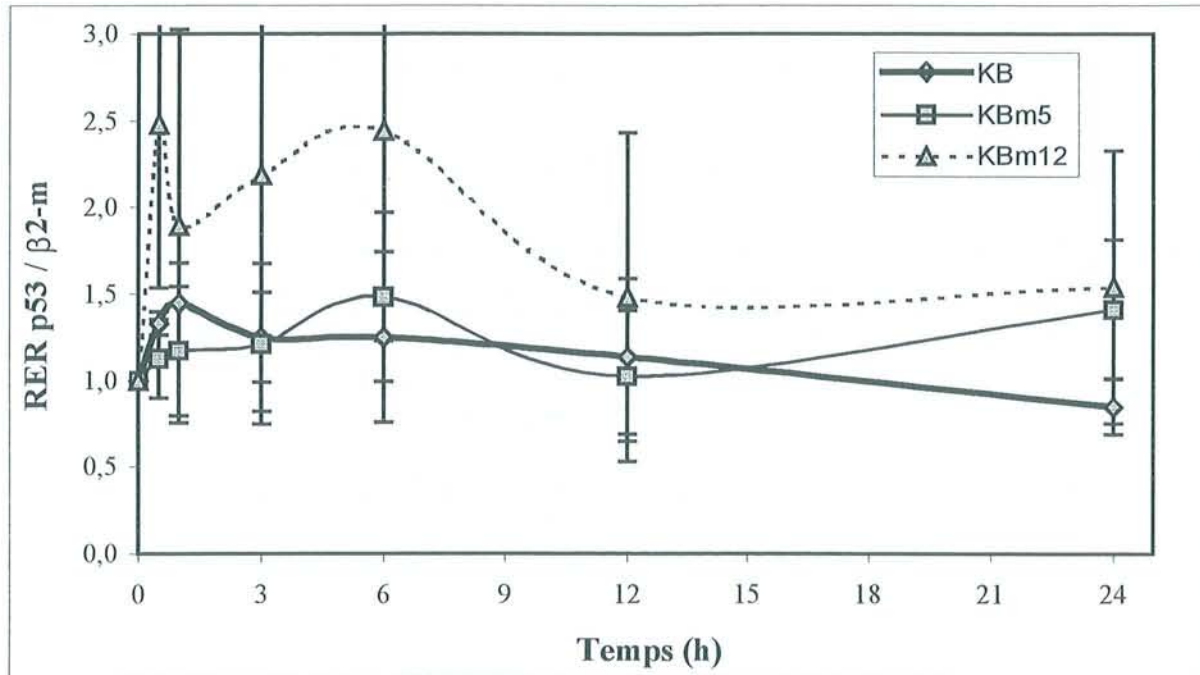


Figure 37 : Cinétique d'expression l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy. Les valeurs sont le ratio d'expression relative (RER) de l'ARNm de p53/ARNm de la b2-microglobuline (T=48 h non représenté).

Le profil des courbes après irradiation à 4 Gy n'est pas le même. En effet, l'expression de l'ARNm de p53 suit une évolution biphasique (Figure 38) contrairement à l'irradiation de 2 Gy. De la même manière que précédemment, l'augmentation de l'expression est rapide puisque le premier pic d'induction est maximal 1 heure après l'irradiation pour KB, KB^{m5} et KB^{m12} avec respectivement des valeurs de $2,54 \pm 0,95$; $1,79 \pm 0,53$ et $1,35 \pm 0,33$ (Tableau 20). La phase de décroissance qui se met alors en place permet aux RER de p53 de retrouver leurs valeurs initiales 6 heures après l'irradiation de 4 Gy. Une seconde induction, tardive, est mise en évidence. Elle débute immédiatement et atteint un maximum 12 heures après l'exposition aux radiations ionisantes pour KB ($2,02 \pm 1,30$) et KB^{m12} ($1,49 \pm 0,51$).

Toutefois, l'expression de l'ARNm de p53 du clone KB^{m5} se prolonge jusqu'à 24 heures ($1,58 \pm 0,41$). Les valeurs de cette seconde phase d'induction sont plus faibles que la première sauf pour KB^{m12} dont les valeurs sont identiques. De nouveau, les RER de p53 diminuent afin de retrouver progressivement les valeurs de l'expression basale.

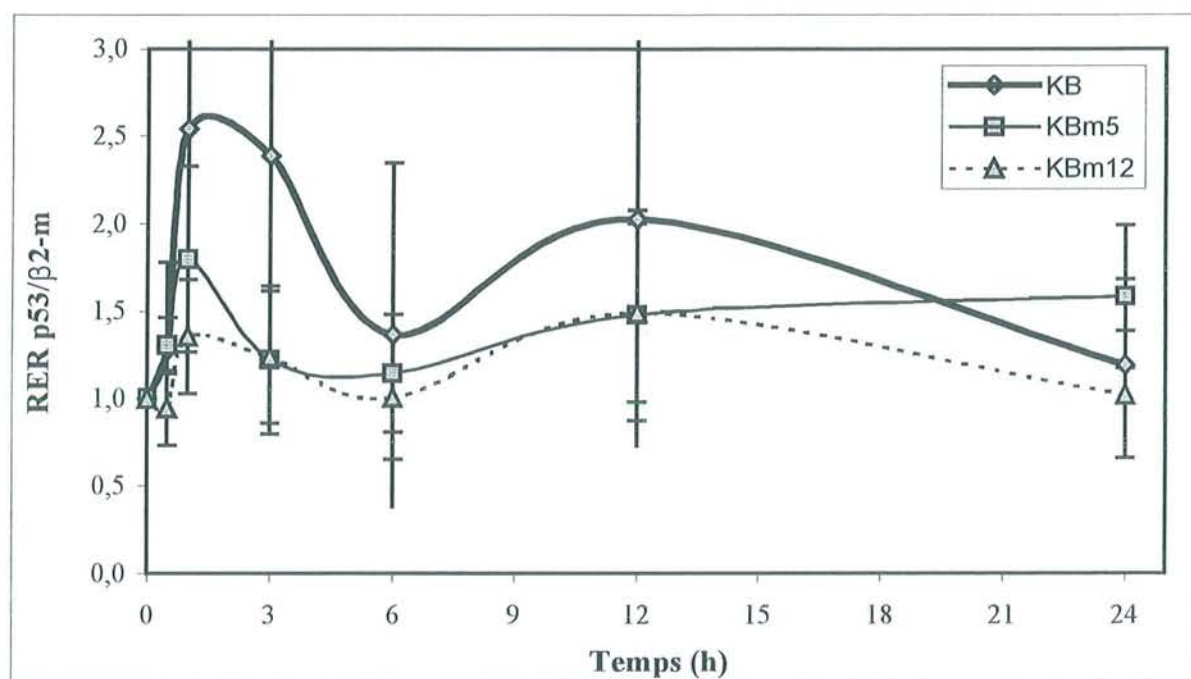


Figure 38 : Cinétique du RER normalisé de l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy. Les valeurs sont le ratio d'expression relative (RER) de l'ARNm de p53/ARNm de la β 2-microglobuline (T=48 h non représenté).

Bien que le niveau d'expression de p53 dans la lignée mère KB et le clone KB^{m5} soit plus important après une irradiation de 4 Gy par rapport à 2 Gy, la situation inverse est observée pour KB^{m12}.

VIII.3.1.3 Cinétique d'expression de la protéine p53

L'accumulation de la protéine p53 après irradiation à 2 et 4 Gy n'a pas été observée aussi bien dans les clones KB^{m5} et KB^{m12} que dans la lignée mère KB. La cinétique a été suivie pendant

48 heures. La Figure 39 montre un exemple de détection de la protéine p53 par western-blot dans le clone KB^{m5}. La première piste contient les marqueurs de poids moléculaires, la dernière est un témoin positif constitué d'un extrait protéique de cellules CAL51 traitées au 5 Fluoro Uracile.

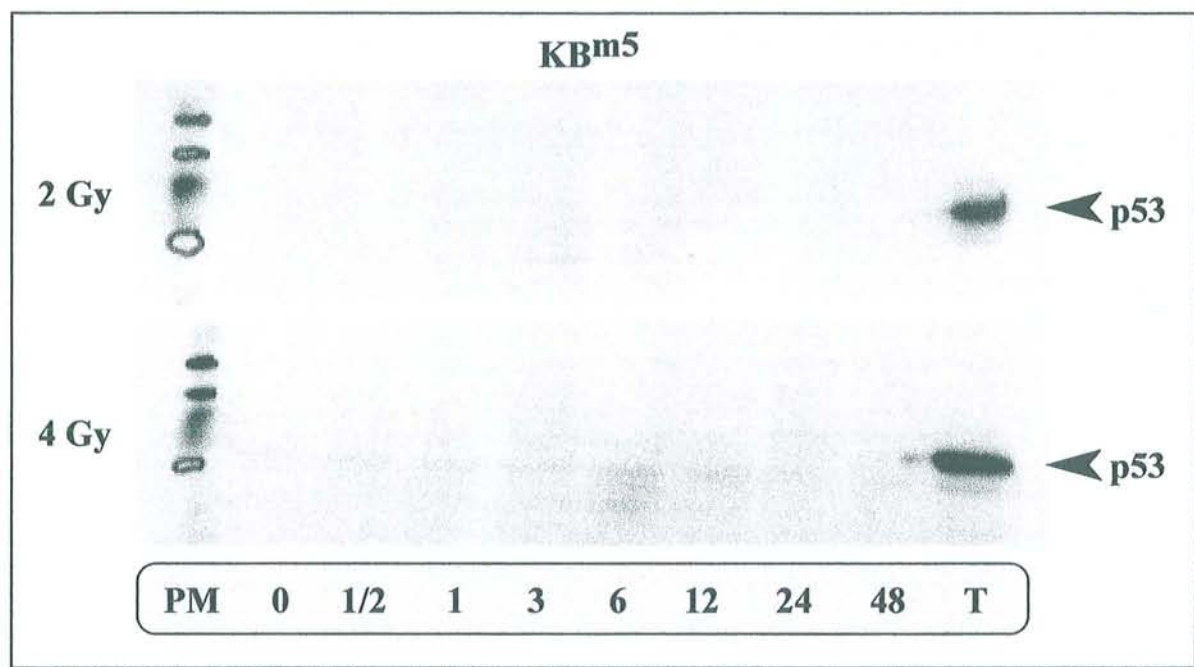


Figure 39 : Exemple d'immuno-détection de la protéine p53 après irradiation à 2 et 4 Gy dans KB^{m5}.

VIII.3.2 Cycle cellulaire

VIII.3.2.1 Distribution des lignées dans le cycle cellulaire.

La répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire ne montre pas de variations importantes (Figure 40). En effet, la proportion de cellules en phase G₀/G₁ se situe entre 51,20 ± 6,20 % pour KB^{m5} et 59,95 ± 5,68 % pour KB^{m2} (Tableau 21). La moyenne des clones se situe à 55,44 ± 2,5 %, cette valeur reste éloignée de celle de la fraction survivante KB^m (51,90 ± 4,23) dont les clones sont issus. La lignée mère possède 54,13 ± 4,87 % de cellules en phase G₀/G₁, ce qui est proche de la moyenne déterminée pour les clones.

La proportion de cellules en phase S ne montre pas non plus de variations importantes. Les extrêmes se situent à 28,85 ± 4,24 % pour le clone KB^{m2} et 34,73 ± 5,25 % pour le clone

KB^{m5}. La valeur de KB^m se trouve être la plus importante de toutes avec $34,95 \pm 4,48$ % de cellules en phase S. Cette valeur est éloignée de la valeur moyenne des clones ($31,62 \pm 1,86$) ainsi que de celle de KB ($31,30 \pm 3,60$ %).

Tableau 21 : Répartition dans les phases du cycle cellulaire de KB, KB^m et des clones. Les valeurs sont la moyenne et l'écart-type résultants d'au moins 4 séries d'expériences.

Lignées cellulaires	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
KB	54,13 4,87	31,30 3,60	14,58 1,58
KB ^m	51,90 4,23	34,95 4,48	13,15 2,14
KB ^{m1}	56,43 4,10	31,30 4,00	12,23 1,04
KB ^{m2}	59,95 5,68	28,85 4,24	11,13 2,28
KB ^{m3}	54,83 3,05	31,90 2,16	13,25 1,36
KB ^{m4}	56,20 3,28	32,10 3,42	11,75 1,73
KB ^{m5}	51,20 6,20	34,73 5,25	14,10 1,93
KB ^{m6}	54,80 2,74	31,83 1,88	13,38 1,37
KB ^{m7}	57,90 2,54	29,78 0,82	12,33 1,84
KB ^{m8}	57,73 2,24	29,58 1,32	12,75 2,00
KB ^{m9}	52,83 2,69	34,05 3,58	13,13 1,85
KB ^{m10}	57,40 1,17	29,20 3,44	13,40 3,87
KB ^{m12}	52,55 3,24	32,60 1,39	14,88 4,23
KB ^{m13}	53,45 6,70	33,53 4,58	13,03 2,78

De la même manière que précédemment, les pourcentages de cellules en phase G₂/M ne présentent que de faibles variations. Les mêmes clones KB^{m2} et KB^{m5} ont les valeurs les plus extrêmes (respectivement $11,13 \pm 2,28$ % et $14,10 \pm 1,93$ %). Ici, la valeur moyenne des clones ($12,95 \pm 0,97$ %) est proche de celle de KB^m ($13,15 \pm 2,14$ %). A l'opposé, KB montre l'une des valeurs les plus élevées ($14,58 \pm 1,58$ %).

D'une manière générale, KB^{m2} et KB^{m5} se distinguent de part leurs distributions opposées et extrêmes dans les phases du cycle cellulaire. Les valeurs de KB^m ne sont similaires aux clones que pour la phase G₂/M.

La répartition des cellules dans le cycle ne montre pas de différence entre la lignée mère FaDu et les fractions survivantes FaDu^{m20} et FaDu^{m72} (Tableau 22). Les valeurs des phases G₀/G₁ et G₂/M sont légèrement inférieures à celles observées pour KB et les clones. Toutefois, une augmentation d'environ 30 % de la phase S est notée par rapport aux clones issus de KB (Figure 40).

Tableau 22 : Répartition dans les phases du cycle cellulaire de FaDu, FaDu^{m20} et FaDu^{m72}. Les valeurs sont la moyenne et l'écart-type résultants d'au moins 4 séries d'expériences.

Lignées cellulaires	G0/G1	S	G2/M
FaDu	47,94 4,07	44,52 5,79	7,50 2,32
FaDu ^{m20}	43,02 3,03	46,02 3,66	11,00 1,97
FaDu ^{m72}	45,64 1,83	42,02 3,00	12,32 1,85

Pour l'ensemble de lignées et clones, les erreurs restent raisonnables avec des valeurs majoritairement inférieures à 10% (de 2,7 % pour la phase S de KB^{m7} à 28,4 % pour la phase G₂/M de KB^{m12}).

VIII.3.2.2 *Corrélations avec la radiosensibilité.*

Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la distribution des cellules dans le cycle cellulaire et les paramètres de radiosensibilité (α , β , SF₂ et MID). Par exemple, les deux clones KB^{m2} et KB^{m5} montrent une répartition très différente et même opposée de leurs cellules dans le cycle alors que leur radiosensibilité est similaire. Les variations observées pour FaDu et les fractions survivantes ne reflètent pas non plus la radiosensibilité de ces lignées.

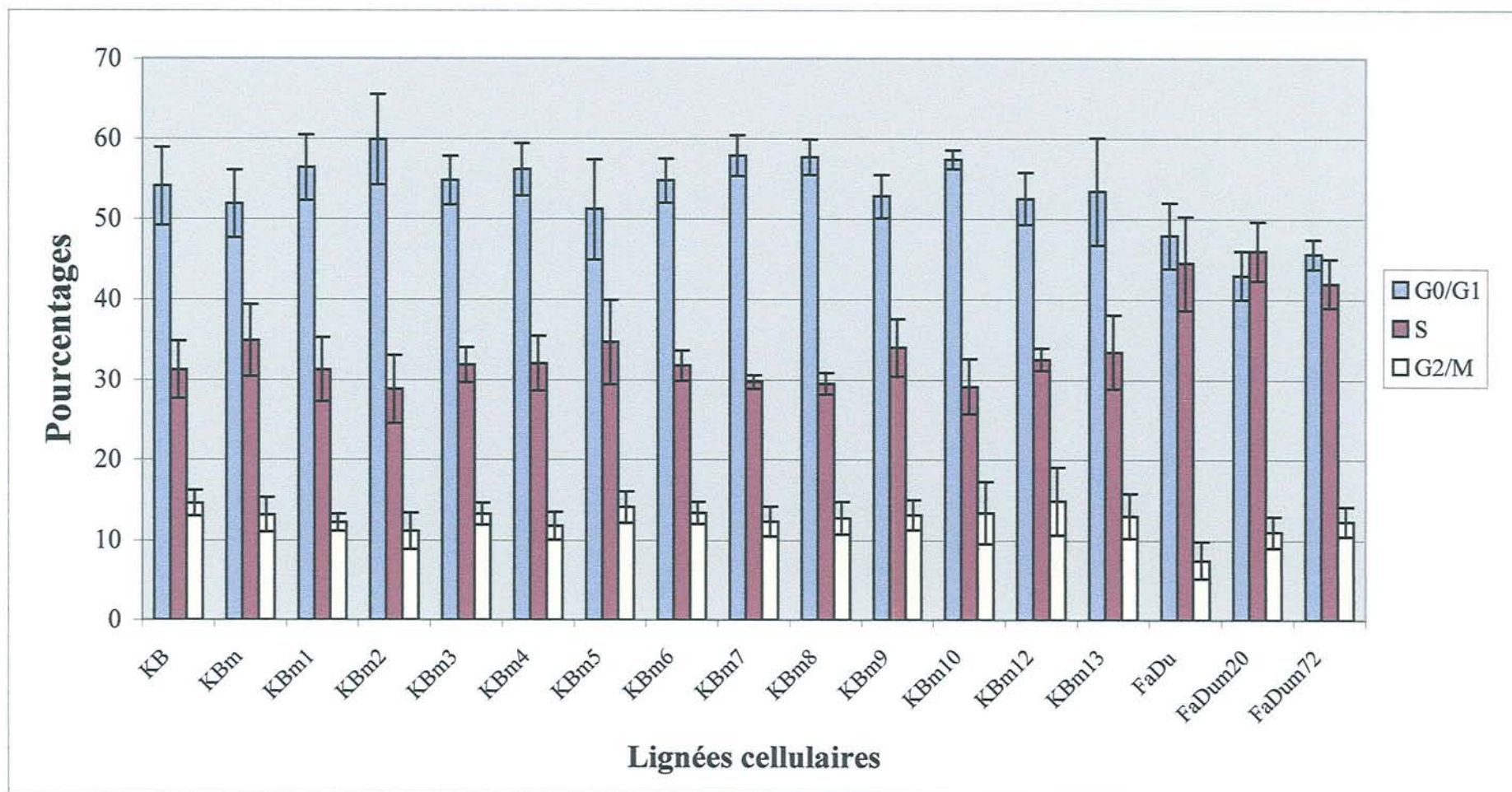


Figure 40 : Répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire.

VIII.3.2.3 Arrêts radio-induits du cycle cellulaire.

VIII.3.2.3.1 FaDu, FaDu^{m20} et FaDu^{m72}

La lignée FaDu montre des variations de distribution dans le cycle cellulaire au cours du temps après une irradiation à 2 Gy (Figure 41). Une accumulation des cellules en phase G₂/M est mise en évidence. Celle-ci augmente progressivement pendant les 8 premières heures et reste stable jusqu'à 16 heures avec un taux de $2,42 \pm 0,13$ fois supérieur à celui du témoin ($19,1 \% \pm 2,6$ vs $7,9 \% \pm 2,9$) avant d'amorcer une décroissance. Le taux basal est quasiment retrouvé 24 heures après irradiation et seule une faible proportion de cellules reste bloquée en G₂/M. A l'inverse, la proportion de cellules en phase G₀/G₁ tend à diminuer à $0,55 \pm 0,1$ fois la valeur du témoin ($29,0 \% \pm 2,9$ vs $52,2 \% \pm 5,2$) entre 8 à 12 heures après irradiation pour revenir à la normale rapidement (t=20-24 h). Cette diminution montre une absence de blocage à la transition G₁/S. L'évolution de la distribution de la phase S au cours du temps est opposée à celle de G₁/S et est symétrique par rapport à la droite y=1 donc par rapport au taux basal du témoin. Ainsi, le niveau maximal de cellules en phase S, atteint entre 8 et 12 heures, est $1,3 \pm 0,03$ fois supérieur à celui des cellules contrôle ($51,9 \% \pm 1,8$ vs $40,0 \% \pm 2,6$).

La fraction survivante FaDu^{m72} montre des profils cinétiques similaires à ceux de la lignée mère avec des valeurs d'induction quasiment identiques (Figure 41). Le blocage à la transition G₂/M se maintient toutefois jusqu'à 24 heures puis chute brutalement. La lignée FaDu^{m20}, bien qu'elle présente des courbes de même allure, ne montre pas d'induction aussi importante que la lignée mère (Figure 41). Ainsi le blocage en G₂/M qui est stable entre 12 et 20 heures, présente un taux maximal d'induction de $1,84 \pm 0,26$ fois ($14,3 \% \pm 3,6$ vs $7,8 \% \pm 2,7$). De plus, un second blocage dont l'intensité est tout aussi importante apparaît 36 heures après irradiation. Le temps t=12 heures est particulier car il présente systématiquement une valeur inférieure aux points expérimentaux qui l'entourent à 8 et 16 heures, de plus seule la phase G₂/M est affectée par cette diminution. Les variations de distribution des phases G₀/G₁ et S ne montrent pas non plus d'amplitude importante.

Les deux fractions survivantes FaDu^{m20} et FaDu^{m72}, tout comme FaDu, présentent donc un arrêt radio-induit en phase G₂/M mais l'arrêt en phase G₀/G₁ n'a pas pu être mis en évidence.

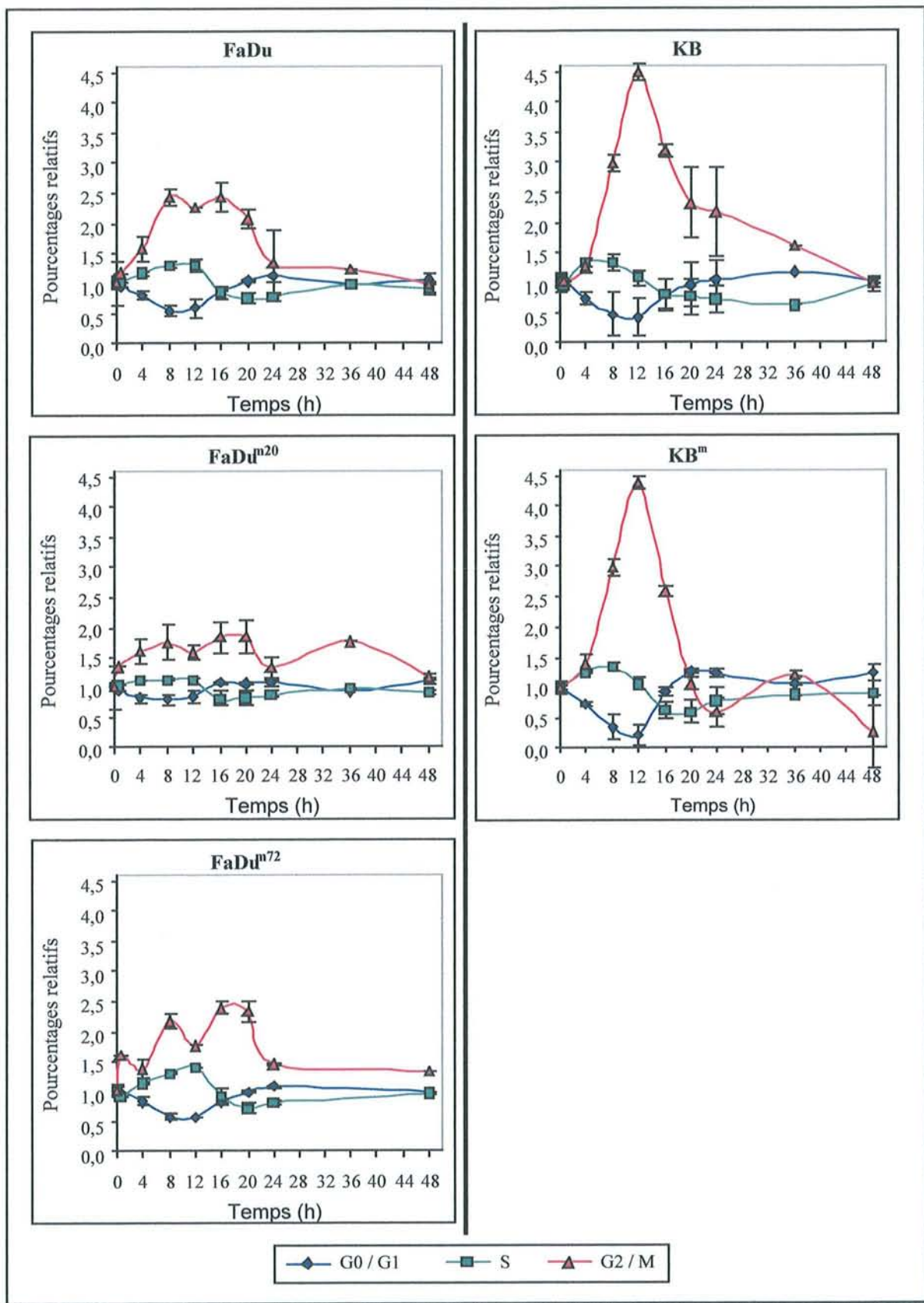


Figure 41 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour FaDu, FaDu^{m20}, FaDu^{m72}, KB et KB^m.

La lignée KB présente des variations des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy (Figure 41). Une accumulation transitoire des cellules en phase G₂/M, dont l'intensité est plus importante que celle de FaDu, est mise en évidence. En effet, 12 heures après l'irradiation, la proportion de cellules présentes en G₂/M est 4,50 fois plus importante qu'à t=0 ce qui représente 36,6 % ± 4,6 % de la population cellulaire. La décroissance de cette population s'effectue selon une cinétique biphasique, la première conduit à la diminution rapide (en 8 heures) de près de la moitié des cellules bloquées ; la seconde (de t=20 à t=48 heures) voit un retour au taux basal 48 heures après l'irradiation. Les variations des phases S et G₀/G₁ sont identiques à celles décrites précédemment pour la lignée FaDu. Un arrêt radio-induit intense et bref à la transition G₂/M se produit donc après irradiation de la lignée KB. Mais comme FaDu, aucun arrêt à la transition G₁/S n'est observé.

La distribution dans les phases du cycle cellulaire de la fraction survivante KB^m montre un profil similaire à celui de la lignée mère KB (Figure 41). Toutefois, bien que l'intensité de l'accumulation en G₂/M soit presque identique (4,40 fois), le retour au taux basal s'effectue plus rapidement (en 8 heures de t=12 à t=20 heures) selon une décroissance monophasique. Il est à noter que la proportion de cellules en phase G₀/G₁ diminue considérablement pour passer de 52,4 % ± 1,3 % à t=0 à 11,1 % ± 2,1 % à t=12 heures soit 4,7 fois moins.

Les clones issus de KB^m montrent des profils similaires car ils présentent tous un arrêt radio-induit du cycle cellulaire en G₂/M et une absence d'accumulation des cellules en G₀/G₁ (Figure 42 et Figure 43). L'induction maximale de l'arrêt en G₂/M se produit majoritairement à t=12 heures pour les clones KB^{m1, 4, 5, 8, 10, 13}. Ce pic est décalé à t=16 heures pour KB^{m2}. Toutefois, les clones KB^{m3, 6, 7, 9, 12} ont un pic d'induction large qui s'étend entre 12 et 16 heures. Les clones ne montrent qu'un seul arrêt en G₂/M à l'exception de KB^{m4} qui présente une seconde accumulation à t=36 heures. La décroissance des pics d'accumulation radio-induits des cellules en G₂/M se déroule en deux temps comme pour la lignée mère KB. En effet, la première phase, rapide, prend place dès le début de la décroissance (à t=12 ou 16 heures selon les clones) et se prolonge jusqu'à 24 heures (KB^{m1, 4, 5, 8, 10, 12, 13}) ou 36 heures (KB^{m2, 3, 6, 7, 9}) après l'irradiation. La seconde phase, plus lente suit immédiatement la première et se termine à 48 heures.

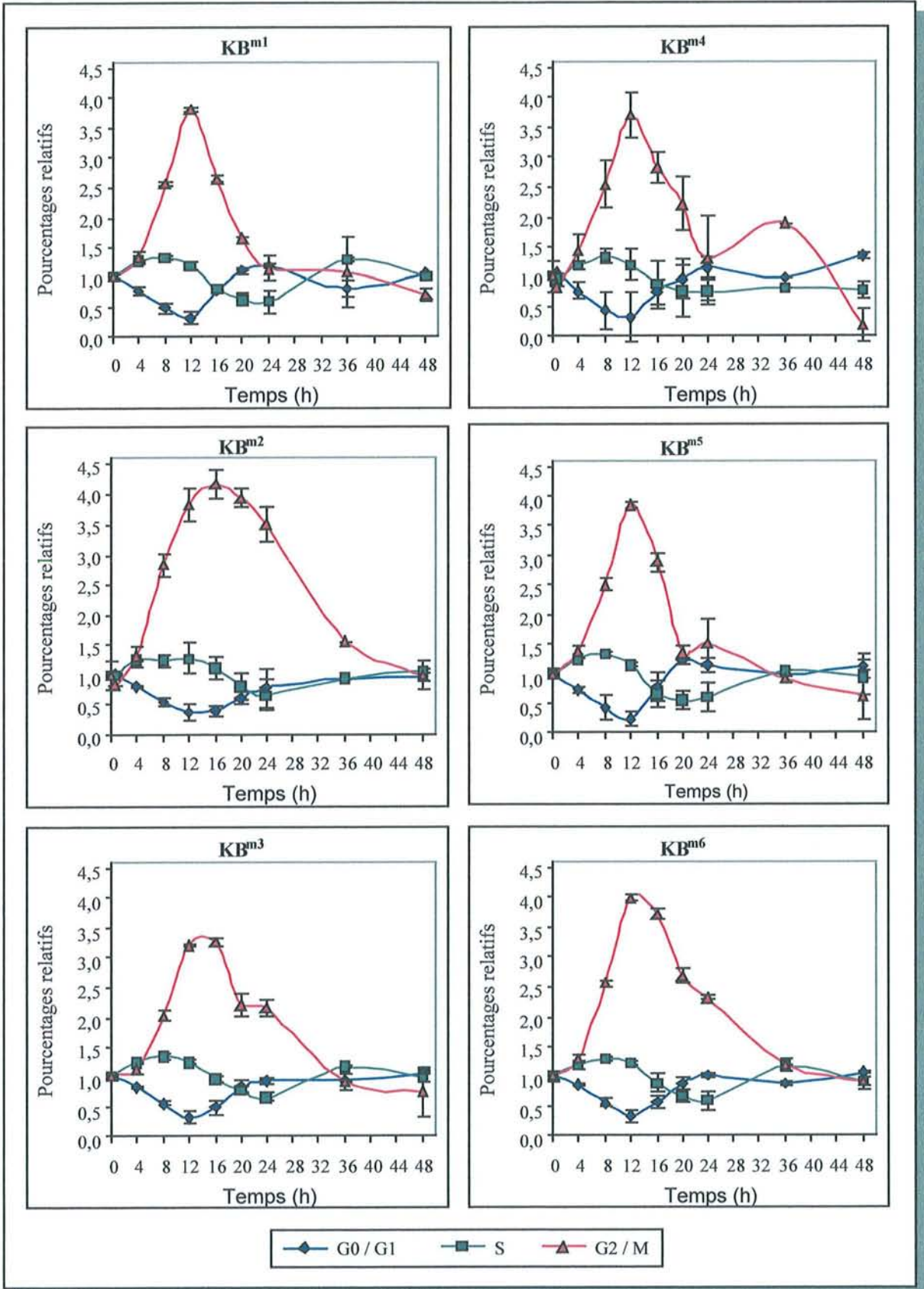


Figure 42 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour les clones KB^{m1} à KB^{m6}.

L'intensité des arrêts en G_2/M varie selon les clones de $2,14 \pm 0,06$ pour KB^{m13} à $4,17 \pm 0,23$ pour KB^{m2} (en pourcentages relatifs aux témoins) mais aucun n'atteint les niveaux mis en évidence pour KB (4,50) et KB^m (4,40). Deux groupes de clones se dessinent. Le premier rassemble les clones dont l'induction maximale est supérieure à 3,5. Il s'agit des clones $KB^{m1, 2, 4, 5, 6, 8}$. Le second, composé des clones $KB^{m3, 7, 9, 10, 12, 13}$, montre des inductions inférieures à 3,5 fois la valeur des témoins. La moyenne du pourcentage relatif d'arrêt des clones se situe à $3,47 \pm 0,55$ ce qui est éloigné de la valeur de KB^m .

La distribution des phases G_0/G_1 et S montre des profils similaires entre les clones. Ces courbes sont biphasiques. En effet, une accumulation des cellules en phase S d'environ 1,4 fois pour tous les clones, est mise en évidence dans un premier temps jusqu'à 16-20 heures où le retour au taux basal s'effectue. La seconde partie de la courbe de distribution montre une diminution de la proportion de cellules en phase S sous le taux de base et n'excède jamais $0,54 \pm 0,16$ fois (KB^{m5}). La cinétique de distribution des phases G_0/G_1 est quasiment symétrique à celle de la phase S par rapport à la droite d'équation $y=1$. La diminution de la proportion de cellules varie de $0,23 \pm 0,13$ à $0,55 \pm 0,05$ fois pour KB^{m5} et KB^{m10} respectivement. Le retour total au taux basal est observé selon les clones en 36 à 48 heures après l'irradiation.

Tout comme la lignée mère KB , les clones issus de la fraction survivante KB^m présentent un arrêt radio-induit du cycle cellulaire à la transition G_2/M mais aucun arrêt à la transition G_1/S n'a pu être mis en évidence.

VIII.3.2.4 Corrélations avec la radiosensibilité.

Aucune corrélation entre le taux d'induction des arrêts en G_2/M et les paramètres de radiosensibilité n'a pu être mise en évidence. Par exemple, les clones KB^{m1} et KB^{m5} présentent des taux d'induction proches l'un de l'autre (environ 3,8 fois) mais leur sensibilité aux radiations ionisantes est opposée car KB^{m5} est radiosensible et KB^{m1} est l'un des clones les plus résistants.

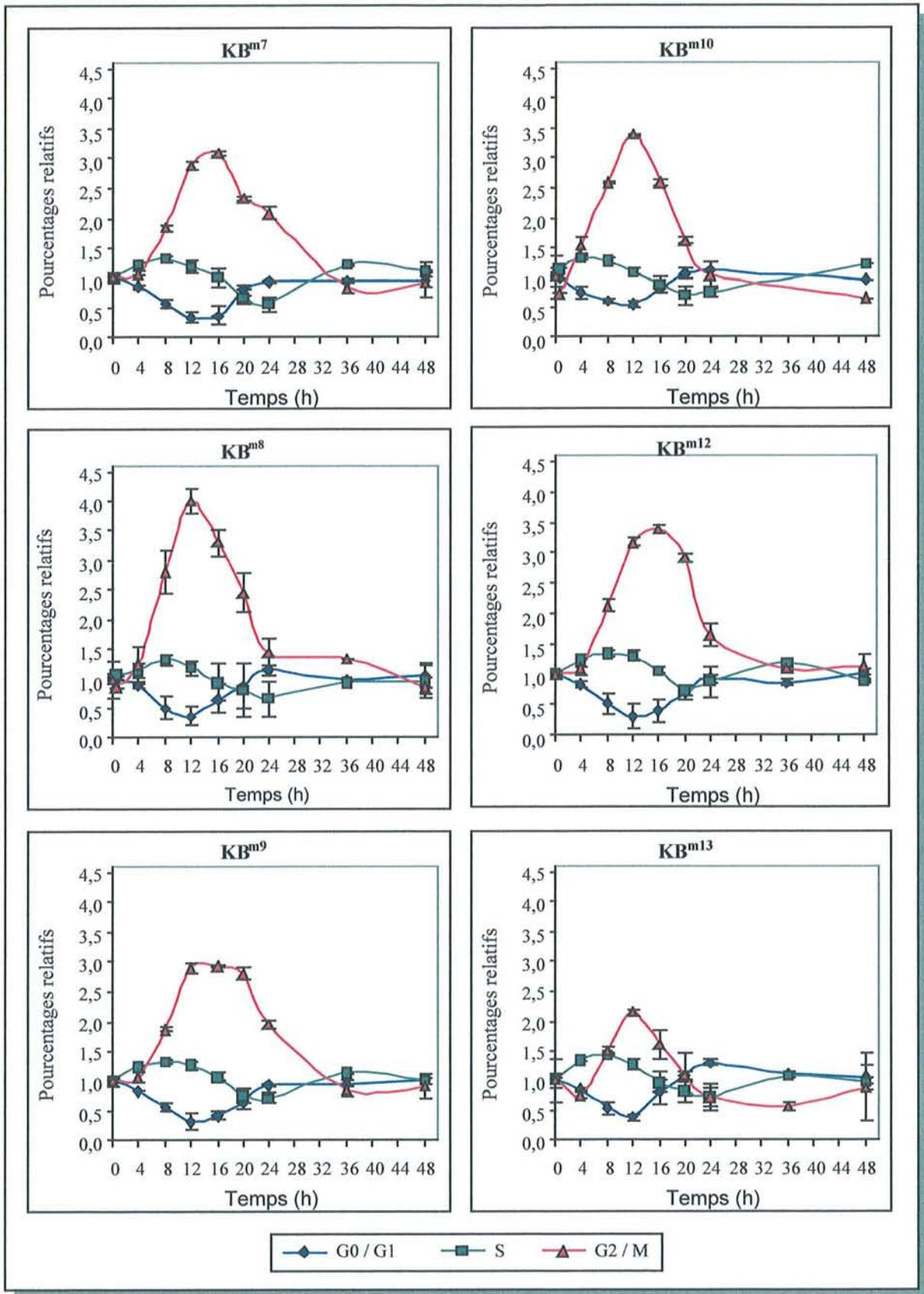


Figure 43 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour les clones KB^{m7} à KB^{m13} .

VIII.4 Discussion

VIII.4.1 Expression de p53

VIII.4.1.1 Expression basale

Dans la lignée mère KB, le taux d'expression basal de l'ARNm de p53 est proche de zéro. Lors de l'analyse en western-blot, la protéine n'est pas détectée ce qui pourrait suggérer qu'il existe un lien entre les deux. Autrement dit, la faible expression basale du transcrit ne permettrait pas de produire suffisamment de protéine p53 pour que la détection soit possible par western-blot. Le séquençage de l'ADNc de p53 des exons 2 à 9 a été réalisé dans la lignée KB et aucune mutation ou délétion n'a été mise en évidence (communication personnelle, données non publiées). Peu d'études sont disponibles concernant l'expression aberrante de l'ARNm de p53. Toutefois, Barnas *et al.* rapportent un fait similaire à notre travail dans des lignées de carcinomes épidermoïdes d'œsophage pour lesquelles le gène p53 sauvage montre une faible expression de l'ARNm et une absence de détection de la protéine (293). Les auteurs émettent l'hypothèse que la faible expression de l'ARNm de p53 serait un mécanisme alternatif d'inactivation des fonctions de p53 sans que la structure du gène soit pour autant altérée. Ceci permettrait notamment de préserver l'intégrité du génome. L'absence simultanée d'ARNm et de protéine p53 sauvage a également été observée dans une lignée tumorale de poumon (294) ainsi que dans une lignée lors du screening d'un panel de 10 lignées d'origines diverses (295). Des observations similaires ont été faites par Kawasaki *et al.* dans des lignées tumorales de vessie pour lesquelles l'expression de la protéine p53 diffère selon l'expression du transcrit et le statut mutationnel de p53 (296). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle, dépendante du statut mutationnel de p53, pourrait expliquer ces différences d'expression.

L'absence de protéine p53 dans la lignée KB, en l'absence d'irradiation, pourrait donc être due à la répression transcriptionnelle de son ARNm mais également à une régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle. Les mécanismes de régulations peuvent être de plusieurs types (293) : des méthylations inactivant les promoteurs de la transcription, une altération de domaines de régulation de la transcription non encore identifiés et extérieurs au gène, la production d'ARNm instable conduisant à une diminution de sa demie-vie,

l'altération de facteurs de trans-régulation (297). De plus il est à noter que l'exon 1, non traduit, n'a pas été séquencé or il contient le promoteur transcriptionnel primaire (293), une mutation à ce niveau expliquerait aussi le faible niveau d'expression du transcrit.

Le niveau d'expression du transcrit de p53 mesuré dans KB^m montre une surexpression de 11 fois par rapport à la lignée mère mais la comparaison est toutefois à relativiser au vu du faible niveau d'expression détecté, proche de zéro, et à l'erreur importante ($0,02 \pm 0,01$). L'irradiation fractionnée (5×2 Gy) à laquelle a été soumise KB a donc provoqué la surexpression basale de l'ARNm de p53. Ceci suppose que les mécanismes de régulation transcriptionnelle et/ou post transcriptionnelle évoqués précédemment, ont été altérés par les radiations ionisantes.

Dans leur ensemble, les clones issus de KB^m montrent une surexpression variable, systématique (hormis KB^{m13}) et plus importante que KB^m. En effet le RER moyen de p53 dans les clones (hormis KB^{m13}) est de $1,17 \pm 0,24$ ce qui est significativement supérieur à la valeur de KB^m ($0,23 \pm 0,04$). Il semble étonnant de constater une telle différence entre KB^m et les clones pris dans leur ensemble, ce qui signifierait qu'une expression basale importante d'ARNm de p53 serait liée à la capacité de clonage des cellules. En effet, la technique de clonage cellulaire par dilution limite a probablement permis de ne sélectionner que des cellules clonogéniques aptes à proliférer. Aucune autre explication plausible n'est donc proposée concernant cette différence d'autant plus que les études comparables sont rares voir inexistantes dans la littérature. L'irradiation a probablement induit des modifications stables car les mesures, qui ont eu lieu sur une période de 18 mois, montrent des variations de faible amplitude.

Tout comme la lignée mère KB, les immuno-marquages (western-blots) ne révèlent pas la présence de protéine p53 dans les clones KB^{m5} et KB^{m12}. Ce fait peut paraître surprenant car leur taux d'expression basal en ARNm est élevé et devrait être en relation avec la quantité de protéine. Cette observation indique que le taux basal d'ARNm de p53 n'a aucune influence sur le niveau d'expression de la protéine ce qui met en évidence, dans les clones, la présence d'une répression forte au niveau post-transcriptionnel ou traductionnel. L'éventualité d'une régulation strictement transcriptionnelle est donc écartée pour les clones. L'anticorps monoclonal anti-p53 utilisé, le DO-7, reconnaît un épitope situé dans l'exon 2 en position 19 à 26 (N-terminale) or aucune mutation n'a été observée à cet emplacement.

VIII.4.1.2 Cinétique d'expression radio-induite

Les cinétiques d'expression de l'ARNm de p53 et de sa protéine précisent plusieurs points. Ainsi la protéine n'est jamais mise en évidence après les irradiations à 2 et 4 Gy dans la lignée mère KB et les 2 clones de radiosensibilité extrême. Cette observation est en contradiction avec le fait établi que l'exposition aux radiations ionisantes provoque l'accumulation nucléaire de la protéine p53 (298, 299). Paradoxalement, ces mêmes doses de radiations induisent des variations d'expression de l'ARNm de p53 dans les trois lignées. Ces données confirment le fait que l'expression de la protéine p53 n'est pas régulée au niveau transcriptionnel (par exemple par une altération ou une méthylation du promoteur de l'exon 1). Seule une régulation post-transcriptionnelle et/ou une répression traductionnelle peuvent expliquer ces observations.

Au niveau des transcrits, l'irradiation à 2 Gy induit des profils d'expression monophasiques dont l'amplitude reste modérée pour KB et KB^{m5} alors que la surexpression est plus importante dans KB^{m12}. Les pics d'inductions se produisent 1 heure après l'irradiation pour KB et après 6 heures pour les clones. Toutefois, les écarts-type élevés limitent les interprétations car ces valeurs, relativement proches, ne sont pas significativement différentes les unes des autres. A l'inverse, les profils d'expression d'ARNm observés après une irradiation à 4 Gy sont biphasiques. La surexpression rapide mise en évidence dans toutes les lignées à 1 heure, découle du stress provoqué par l'irradiation, notamment de la production d'espèces réactives de l'oxygène et des dommages de l'ADN qui induisent la transcription transitoire d'ARNm de p53. La diminution de la quantité d'ARNm de p53, observée entre 1 heure et 6 heures, est probablement due à la dégradation naturelle des ARNm car la traduction n'est apparemment pas possible. L'implication de la protéine p53 dans la réparation des radiolésions de l'ADN est connue (132, 300-302), le déficit observé ici diminue donc l'efficacité de la réparation. La persistance de ces dommages pourrait expliquer la nécessité pour les cellules de transcrire à nouveau des ARNm de p53 lors de la seconde induction, plus modérée mais plus longue que la première, observée 6 heures après l'irradiation.

Whisnant-Hurst *et al.* ont récemment montré que la réparation de certaines lésions de l'ADN est indépendante de p53 (303). Ainsi les profils monophasiques observés après l'irradiation à 2 Gy laisse penser que les dommages sont peu importants et efficacement réparés par les systèmes cellulaires de réparation indépendants de p53 ce qui ne nécessite pas de nouvelle

production d'ARNm de p53. La réponse marquée et biphasique des cellules KB à une irradiation de 4 Gy suggère l'existence d'une dose seuil à partir de laquelle les lésions trop nombreuses ne peuvent être réparés par les systèmes p53-indépendants. Ces dommages persistants induisent alors une seconde expression d'ARNm de p53 qui seront à leur tour dégradés.

Aucune relation n'a été mise en évidence entre l'expression basale de l'ARNm de p53 et la radiosensibilité des clones. L'absence de protéine p53 pour KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12}, aussi bien au niveau basal qu'en réponse à l'irradiation, suggère fortement que la situation soit identique pour les autres clones. D'un strict point de vue fonctionnel, l'absence de protéine p53 due à une régulation post-transcriptionnelle ou une répression traductionnelle peut être partiellement assimilée à la perte de fonctionnalité de p53 due à une mutation/délétion (en effet, il a été montré qu'une protéine p53 non fonctionnelle pouvait interférer avec elle-même ou d'autres protéines). Le rôle de p53 dans la détermination de la radiosensibilité n'est pas parfaitement défini. En effet des études contradictoires montrent que l'état mutationnel de p53 est lié à la radiosensibilité (304) alors que d'autres auteurs observent le contraire (305) notamment dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (123). Ce travail montre que les variations de radiosensibilité dans le modèle KB ne sont pas liées à protéine p53 et sont donc en accord avec les études de Brachman *et al.* (123). Ces variations de sensibilité aux radiations ionisantes pourraient alors dépendre d'autres déterminants tels que les processus de détoxification, l'efficacité des systèmes de réparation ou l'induction d'apoptose.

Ce déficit en protéine p53 doit se répercuter sur la capacité des cellules à instaurer l'arrêt à la transition G₁/S ainsi que sur l'induction d'apoptose p53-dépendante.

Les résultats présentés ici montrent notamment que l'inactivation fonctionnelle de la protéine p53, fréquente dans les carcinomes épidermoïdes des VADS, peut se produire par d'autres mécanismes que les mutations de la séquence codante du gène p53.

VIII.4.2 Distribution des cellules dans le cycle cellulaire

Il a été proposé que la répartition des cellules dans le cycle, et notamment la proportion de cellules en phase S, pouvait influencer la sensibilité à l'irradiation (277). Ceci est basé sur la radiosensibilité différentielle des phases G₀/G₁ (résistante), S (plus ou moins résistante) et G₂/M (sensible) (277).

Les différences de distribution cellulaire mises en évidence entre les deux lignées mères peuvent expliquer la radiorésistance plus importante de FaDu. En effet, comparée à KB, la proportion de cellules en phase S est supérieure de 42 % dans FaDu alors que la phase G₂/M, considérée comme radiosensible, y est presque 2 fois moins importante. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant une relation entre la répartition des cellules dans le cycle et la résistance aux radiations ionisantes (279).

La situation pour les clones issus de KB^m n'est pas la même car aucune corrélation n'est observée entre la proportion de cellules dans les phases du cycle et les paramètres de radiosensibilité. De la même façon, les variations restent faibles entre KB ou KB^m et les clones pris dans leur globalité. Ceci indique que l'irradiation fractionnée de KB, qui a permis d'obtenir KB^m puis les clones, a engendré des variations de radiosensibilité qui ne sont pas liées à la distribution des cellules dans les phases du cycle, notamment de la phase S. Ceci suggère que la répartition des cellules dans le cycle cellulaire pourrait refléter la radiosensibilité intrinsèque des lignées mais pas la radiosensibilité acquise des clones. Toutefois ces données demeurent limitées et méritent d'être approfondies par l'étude d'autres lignées de carcinomes épidermoïdes des VADS.

VIII.4.3 Arrêts radio-induits du cycle cellulaire

Les arrêts du cycle cellulaire aux transitions G₁/S et G₂/M sont décrits pour de nombreux inducteurs tels que les drogues de chimiothérapie et les radiations ionisantes (306-308). Ces blocages permettent notamment aux cellules d'évaluer et de réparer les dommages subit ou d'induire l'apoptose.

Un blocage transitoire en phase G₂/M est observé pour toutes les lignées après une irradiation à 2 Gy. Les cellules présentes en phase S continuent leur progression et s'accumulent progressivement au point de contrôle G₂/M. Cette accumulation débute immédiatement après l'irradiation ce qui est en contradiction avec le délai de 18 h observé par Murata *et al.* (307) avec des cellules HeLa. La présence de ce blocage à la transition G₂/M empêche l'entrée des cellules en mitose puis leur progression en phase G₀/G₁.

Aucune accumulation en phase G₀/G₁ n'est mise en évidence. La diminution relative de la proportion de cellules en phase G₀/G₁ résulte donc de la conjugaison de deux facteurs : un déficit en cellules provenant de la phase G₂/M et l'absence d'arrêt en G₁/S. Les cellules

présentes en phase G_0/G_1 lors de l'irradiation ne sont donc pas bloquées et progressent en phase S.

L'accumulation des cellules en phase S implique la mise en place d'un blocage à ce niveau. Painter a montré que la durée de la phase S augmente après une irradiation (309) car l'initiation de la réplication et l'élongation de l'ADN sont inhibés (310). Ce délai semble d'ailleurs indépendant de p53. Sa présence signifie que seules les cellules en phase S précoce, qui commencent donc leur synthèse d'ADN, sont bloquées alors que celles en phase S tardive, dont la réplication s'achève, progressent en G_2/M où elles seront bloquées à leur tour. L'intensité maximum est généralement atteinte 8 heures après l'irradiation c'est à dire que la levée du blocage débute toujours avant que le maximum du blocage en G_2/M soit atteint (entre 12 et 16 h). Il est donc possible que les cellules relarguées du blocage en phase S viennent progressivement s'accumuler en G_2/M . La présence de ce blocage permet en outre de confirmer que la transition G_1/S est possible.

La levée du blocage en phase G_2/M (12 à 20 heures après l'irradiation) permet aux cellules d'entrer en mitose puis en phase G_1 ce qui se traduit par l'augmentation rapide de la proportion de cellules en phase G_0/G_1 . A ce moment la quantité de cellules en phase S est faible car celles qui étaient bloquées ont progressé en G_2 et aucune n'a encore atteint la phase S.

Contrairement aux arrêts prolongés caractérisés par un plateau mis en évidence par Murata *et al.* (306, 307), ceux observés dans ce travail sont de courte durée et présentent un pic, il n'y a donc pas de blocage persistant. La cinétique de décroissance du blocage en G_2/M de la lignée mère KB ainsi que de plusieurs clones ($KB^{m2, 4, 5, 8, 12}$) montrent 2 parties. La première est une décroissance rapide de la proportion de cellules en G_2/M qui dure 8 à 12 h selon les lignées, alors que la seconde est plus lente et permet de retrouver la proportion initiale de cellules en phase G_2/M . Ceci signifie que les cellules bloquées transitoirement en phase S arrivent en G_2/M mais il se peut également qu'une partie des cellules reste bloquée en G_2/M plus longtemps.

Il a été montré que le moment d'induction et la durée du blocage sont liés à la sensibilité à l'irradiation (311). Entre KB et les clones, aucune relation de ce type n'est mise en évidence. Certains clones radiosensibles tels que $KB^{m2, 7, 9}$ montrent un délai d'induction maximal supérieur à celui de KB (environ 16 heures au lieu de 12) alors que $KB^{m1, 8}$, dont la résistance

est proche de celle de KB, ont un délai d'induction similaire à la lignée mère de l'ordre de 12h. Mais des situations inverses sont observées notamment avec KB^{m5} (radiosensible) qui n'est pas différent de KB et le clone résistant KB^{m12} qui montre un délai. La variabilité de la réponse empêche donc la mise en évidence d'une relation entre la radiosensibilité et le délai d'induction de l'arrêt en G₂/M.

Une relation entre l'intensité du blocage en phase G₂/M et la radiosensibilité a été observée (312, 313). Bien que l'intensité des blocages soit inférieure ou égale à celle de KB, certains clones sensibles, tels que KB^{m2, 5}, montrent des blocages proches de celui de la lignée mère ce qui empêche toute corrélation avec la radiosensibilité. Il est à noter que l'arrêt en G₂/M de KB^{m13} est très faible par rapport aux autres clones.

D'une manière générale, les caractéristiques de l'arrêt du cycle à la transition G₂/M (durée, intensité, délai) dans KB et les clones ne sont pas liés à la radiosensibilité. Toutefois le comportement de plusieurs clones est conforme aux observations issues d'études similaires mais celles-ci comparent généralement un faible nombre de lignées filles dérivant d'une lignée mère ou bien des lignées différentes ce qui facilite la mise en évidence de corrélations entre la radiosensibilité et les propriétés du blocage en G₂/M (314-316)

Il est communément admis que l'induction de l'arrêt en G₂/M protège les cellules contre les dommages radio-induits (314, 315). A l'inverse de l'arrêt en G₁/S, l'arrêt en G₂/M ne nécessite pas absolument la présence d'une protéine p53 sauvage car des cellules p53 mutées sont capables d'induire un arrêt en G₂/M (317). Son rôle est mal défini mais il semblerait que p53 permette la réparation des dommages radio-induits de l'ADN lors de l'arrêt G₂/M et un échappement rapide du blocage pour induire l'apoptose (302, 318).

Les lignées FaDu et KB ainsi que leurs fractions survivantes et les clones qui en dérivent sont incapables d'induire l'arrêt radio-induit à la transition G₁/S. Ce point de contrôle est sous la dépendance directe de p53 (317). Or il a été rapporté que le gène p53 de la lignée FaDu est muté au niveau du codon 248 situé dans l'exon 7 (272, 273) selon une transversion G->T qui engendre un changement d'acide aminé Arg->Leu inactivant la protéine p53. De nombreuses études ont montré que l'absence de protéine p53 fonctionnelle pouvait être corrélée avec une résistance élevée aux radiations ionisantes (274, 275). Les résultats présentés ici sont donc en accord avec les données la littérature car FaDu et ses fractions survivantes présentent une

radiorésistance importante et une absence d'arrêt en G₁/S que l'on peut attribuer à un déficit en protéine p53 fonctionnelle.

La situation est similaire pour la lignée KB et la fraction survivante KB^m pour lesquels la radiorésistance est importante et où aucun arrêt radio-induit à la transition G₁/S n'est mis en évidence. Ceci suppose que le contrôle de cet arrêt serait défectueux et engendrerait une résistance élevée à l'irradiation. Comme pour FaDu, p53 est une cible de choix pour expliquer un tel phénotype car sa protéine n'est pas exprimée dans KB (ainsi que dans 2 clones KB^{m5} et KB^{m12}) ce qui peut expliquer l'absence d'arrêt en phase G₁/S. Ce fait n'est pas exceptionnel car 50 à 60% des carcinomes épidermoïdes des VADS ont une protéine p53 non fonctionnelle (319).

Toutefois l'implication unique ou simultanée d'autres protéines n'est pas à exclure. Ainsi récemment, Zhan *et al.* ont rapporté que l'inhibition de l'expression de p21^{waf1/cip1} par Bcl-2, empêche la mise en place de l'arrêt G₁/S (320). Il a été montré que le point de contrôle à la transition G₁/S permettait de maintenir l'intégrité du génome et donc de limiter l'instabilité génomique (321). La perte de l'arrêt en G₁/S peut expliquer les dommages importants subits par les lignées KB et FaDu lors de l'irradiation fractionnée qui se sont notamment répercutés sur la sensibilité à l'irradiation des clones. Ces clones, dont la radiorésistance est plus faible que celle de la lignée mère, ne montrent pas non plus d'arrêt à la transition G₁/S. Celui-ci n'apparaît donc pas comme un déterminant essentiel de la radiosensibilité des clones issus de KB^m. L'analyse des clones permet donc de montrer que l'irradiation initiale de KB a provoqué des modifications de radiosensibilité au niveau des clones qui ne sont pas en relation directe avec l'arrêt en G₁/S. L'influence et l'implication de l'arrêt radio-induit en G₁/S sur la radiosensibilité ne peut donc pas être généralisé à l'ensemble des systèmes cellulaires.

RESUME

L'irradiation fractionnée à laquelle a été soumise KB a provoqué la surexpression basale de l'ARNm de p53 dans 10 des 11 clones issus de KB. Ceci suppose que les mécanismes de régulation transcriptionnelle et/ou post transcriptionnelle ont été altérés par les radiations ionisantes.

En réponse à des irradiations des 2 et 4 Gy, les profils cinétiques montrent des expressions d'ARNm respectivement monophasiques et biphasiques. Mais la protéine n'est pas détectée dans KB ainsi que les deux clones étudiés (KB^{m5} et KB^{m12}). Seule une régulation post-transcriptionnelle et/ou une répression traductionnelle peuvent expliquer ces observations.

Ces résultats suggèrent que l'inactivation fonctionnelle de la protéine p53 peut se produire par d'autres voies que les mutations de la séquence codante du gène.

La répartition uniforme des cellules étudiées dans les phases du cycle cellulaire n'indique pas de corrélation avec la radiosensibilité. Toutefois, la forte proportion de cellule en phase S de FaDu pourrait contribuer à sa résistance.

Après irradiation à 2 Gy, aucune des lignées ne montre l'arrêt à la transition G₁/S ce qui confirme l'inactivité fonctionnelle de la protéine p53. Inversement, toutes les lignées montrent un blocage transitoire à la transition G₂/M d'intensité, de délai et de durée variables, sans qu'aucun lien ne soit établi avec la radiosensibilité.

Chapitre IX

Mort cellulaire radio-induite.

Ce chapitre est basé sur les publications suivantes :

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C. *Modifications de l'expression des gènes GST- μ et p53 dans les lignées tumorales humaines O.R.L. après irradiation gamma : induction, études cellulaires et moléculaires.* Journal de Chimie Physique (1998) 95, 718-723.

Dubessy C., Merlin J.-L., Colosetti P., Marchal C. *Clonal heterogeneity of glutathione S-transferase (μ , π) mRNA expression in head and neck tumor cells selected after irradiation.* Soumis à Life Sciences.

IX Mort cellulaire radio-induite.

IX.1 Objectifs

La capacité des cellules à mourir après irradiation conditionne leur sensibilité à l'irradiation. Ainsi, il a été montré, dans plusieurs systèmes cellulaires, que l'induction d'apoptose est liée à la radiosensibilité. Deux clones, KB^{m5} et KB^{m12} représentatifs de radiosensibilités extrêmes (respectivement $\alpha = 0,421 \pm 0,192$, $\beta = 0,025 \pm 0,042$, $SF_2 = 0,406 \pm 0,109$, $MID = 2,133 \pm 0,531$ et $\alpha = 0,077 \pm 0,089$, $\beta = 0,055 \pm 0,007$, $SF_2 = 0,70 \pm 0,133$, $MID = 3,339 \pm 0,712$), ont été choisis avec la lignée mère KB afin d'analyser l'induction d'apoptose et son influence sur la radiosensibilité. De la même manière, la mort par nécrose a été suivie afin de préciser son importance et son rôle dans la sensibilité aux radiations ionisantes.

IX.2 Méthodologie

La méthode choisie, simple et rapide, est utilisée avec des cellules non fixées. Elle consiste à marquer les cellules à analyser avec un mélange d'acridine orange (AO) et de bromure d'éthidium (BET). L'AO est employé à faible concentration de façon à marquer préférentiellement l'ADN des cellules vivantes. Excité par une lumière à 491 nm, l'AO émet alors une fluorescence verte à 527 nm.

Les cellules apoptotiques sont peu marquées car leur ADN est fragmenté et réparti dans des corps apoptotiques. Entre ces deux populations cellulaires se trouvent les cellules nécrotiques qui incorporent l'AO de manière intermédiaire. Le second marquage est dû au bromure d'éthidium. Cet intercalant de l'ADN ne pénètre pas aisément dans les cellules viables contrairement aux cellules nécrotiques ayant perdu leur intégrité membranaire et qui montrent une forte intensité de marquage. Les cellules apoptotiques ne sont théoriquement pas détectées par le BET. En pratique, comme pour les cellules viables, une partie de la population est marquée. Cette méthode de caractérisation à l'AO-BET permet donc de mettre rapidement et simplement en évidence trois populations de cellules : viables, mortes, apoptotiques (voir Figure 44).

Les taux d'apoptose et de nécrose dues à l'irradiation, sont calculés comme la différence des taux bruts d'apoptose ou de nécrose entre les cellules irradiées et les témoins correspondants.

Il est donc possible d'obtenir des taux négatifs lorsque qu'il y a plus d'apoptose ou de nécrose dans les témoins que dans les cellules irradiées.

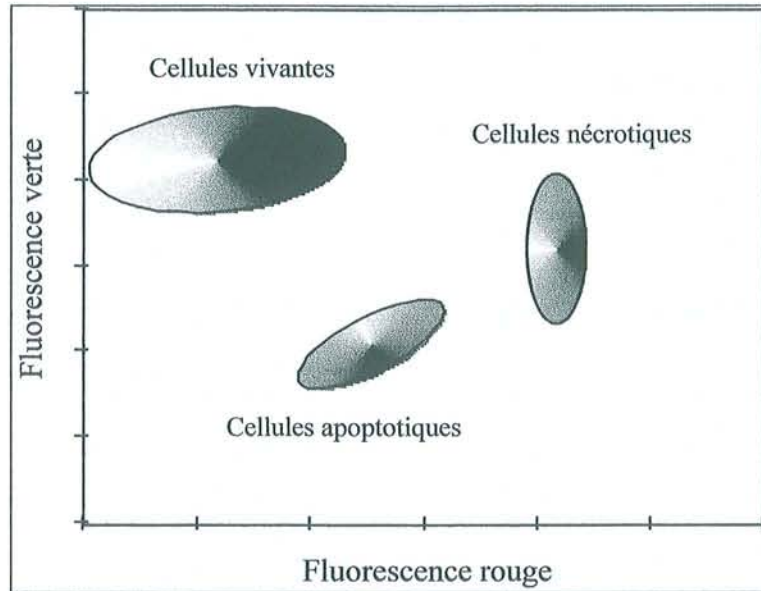


Figure 44 : Cytogramme schématisé lors de la détection des cellules apoptotiques, nécrotiques et viables par marquage Acridine Orange-Bromure d'éthidium.

Une détection des cellules apoptotiques au microscope à fluorescence est réalisée. Les cellules sont marquées avec du Hœchst 33342, un intercalant de l'ADN fluorescent à 461 nm lorsqu'il est excité avec une longueur d'onde de 350 nm. Ce marquage permet de suivre l'évolution du processus apoptotique au niveau de l'ADN (condensation de l'ADN des cellules marginées, apparition des corps apoptotiques).

IX.3 Résultats

IX.3.1 Détection par double marquage Acridine Orange-Bromure d'Ethidium

La cinétique d'induction de l'apoptose a été suivie toutes les 24 heures pendant 144 heures. En effet, des expériences préliminaires ont montré que l'apoptose radio-induite dans les cellules KB n'apparaît pas dans les 24 premières heures suivant l'irradiation. L'évaluation du taux d'apoptose radio-induite est calculée comme la différence entre le taux d'apoptose total et celui des témoins correspondants.

IX.3.1.1 Apoptose

L'apoptose mise en évidence dans la lignée KB est globalement tardive. En effet, le processus ne commence à être détectable que 72 heures après l'irradiation avec des taux de $2,7 \pm 1,5$ % pour une exposition à 2 Gy et $4,6 \pm 3,4$ % pour 4 Gy (Tableau 23). Aux temps précédents (24 et 48 heures), les niveaux détectés d'apoptose radio-induite ne sont pas significatifs car trop proches de ceux des témoins non irradiés. Ces taux augmentent progressivement au cours du temps. Des irrégularités, probablement dues aux incertitudes de mesure, sont toutefois observées 144 heures après l'irradiation à 2 Gy et 120 heures après l'exposition à 4 Gy où les niveaux d'apoptose diminuent. Le taux maximal d'apoptose radio-induite relevé est de $8,0 \pm 6,0$ %, 120 heures après une irradiation de 2 Gy. Ce taux monte à $17,9 \pm 7,5$ % lorsqu'il est mesuré 144 heures après une exposition à 4 Gy.

Tableau 23 : Pourcentages relatifs d'apoptose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB		KB ^{m5}		KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy
24	0,8 0,1	1,5 0,0	-0,1 1,2	3,0 2,2	1,5 2,1	1,8 1,5
48	-1,3 1,8	1,1 1,4	0,7 1,3	2,9 1,8	0,8 0,8	3,9 2,6
72	2,7 1,5	4,6 3,4	0,1 1,4	5,1 3,8	4,7 2,4	11,8 5,7
96	4,3 4,2	11,2 3,9	-3,0 7,9	4,8 7,5	5,8 3,3	12,5 5,5
120	8,0 6,0	9,9 1,2	2,0 1,9	6,8 3,4	4,0 0,8	17,0 6,4
144	2,4 3,9	17,9 7,5	3,2 1,8	14,6 4,5	6,5 5,5	13,3 4,3

Le clone KB^{m5} présente, comme la lignée mère KB, un taux d'apoptose radio-induite plus important après une irradiation à 4 Gy qu'à 2 Gy. En effet, dès 24 heures, $3,0 \pm 2,2$ % des cellules irradiées à 4 Gy sont en apoptose. Cette population progresse jusqu'à atteindre $14,6 \pm 4,5$ % après 144 heures. Lors d'une irradiation à 2 Gy, la quantité de cellules apoptotiques ne semble augmenter qu'à partir de 120 et 144 heures ($3,2 \pm 1,8$ %), les 4 premiers jours ne montrent d'ailleurs que peu d'apoptose par rapport aux témoins.

Le clone KB^{m12} montre une induction d'apoptose plus rapide que celle des autres lignées. Ainsi, dès 48 heures après l'irradiation, $3,9 \pm 2,6$ % des cellules exposées à 4 Gy sont en

apoptose. A 72 heures, ce taux passe brusquement à $11,8 \pm 5,7 \%$ pour atteindre $17,0 \pm 6,4 \%$ à 120 heures. L'irradiation à 2 Gy permet d'induire de l'apoptose chez $4,7 \pm 2,4 \%$ des cellules en 72 heures, ce niveau progresse alors légèrement pour atteindre $6,5 \pm 5,5 \%$ après 144 heures.

D'une manière générale, l'exposition aux radiations ionisantes des cellules KB et des clones qui en dérivent, provoque une induction d'apoptose dose-dépendante qui augmente au cours du temps (Figure 45).

IX.3.1.2 Nécrose

Le taux de mort cellulaire par nécrose dû aux radiations ionisantes a été évalué par rapport aux témoins non irradiés. Dans la lignée mère KB, il varie entre $-6,3 \pm 2,6 \%$ à 48 heures et $7,8 \pm 6,7$ à 120 heures après irradiation à 2 Gy. Peu de différence sont mises en évidence entre les niveaux de nécrose relevés après irradiation à 2 et 4 Gy (Tableau 24).

Tableau 24 : Pourcentages relatifs de nécrose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB		KB ^{m5}		KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy
24	1,1 0,4	1,2 0,1	1,0 2,2	5,0 2,3	-3,0 3,2	-1,5 3,2
48	-6,3 2,6	-3,4 3,8	-5,5 5,2	-3,5 7,9	1,1 2,0	-0,4 1,3
72	1,2 6,7	-0,8 6,9	0,6 1,7	0,1 5,1	-3,9 4,9	-0,5 8,3
96	1,2 6,3	5,3 2,0	-1,9 1,9	-0,5 4,0	-1,2 6,2	-1,9 4,0
120	7,8 6,7	6,9 4,2	-4,2 4,0	-4,2 4,1	-2,4 1,2	1,9 4,7
144	4,1 3,1	4,1 2,7	0,0 5,0	-1,5 3,2	1,7 3,7	0,3 9,0

D'une manière générale, les courbes de nécrose sont situées sous l'axe des abscisses (Figure 45). En effet, pour KB^{m5}, et hormis un niveau de $5,0 \pm 2,3 \%$ de nécrose 24 heures après une exposition à 4 Gy, les taux de cellules mortes par nécrose varient entre $1,0 \pm 2,2 \%$ et $-5,5 \pm 5,2 \%$ 48 heures après irradiation à 2 Gy. Le même type d'observation est réalisé pour KB^{m12} avec une valeur maximale de $1,9 \pm 4,7 \%$ 120 heures après une irradiation à 4 Gy, et une valeur minimale de $-3,9 \pm 4,9 \%$ 72 heures après une dose de 2 Gy.

D'une manière générale, des variations chaotiques sont observées dans les clones KB^{m5} et KB^{m12} issus de KB.

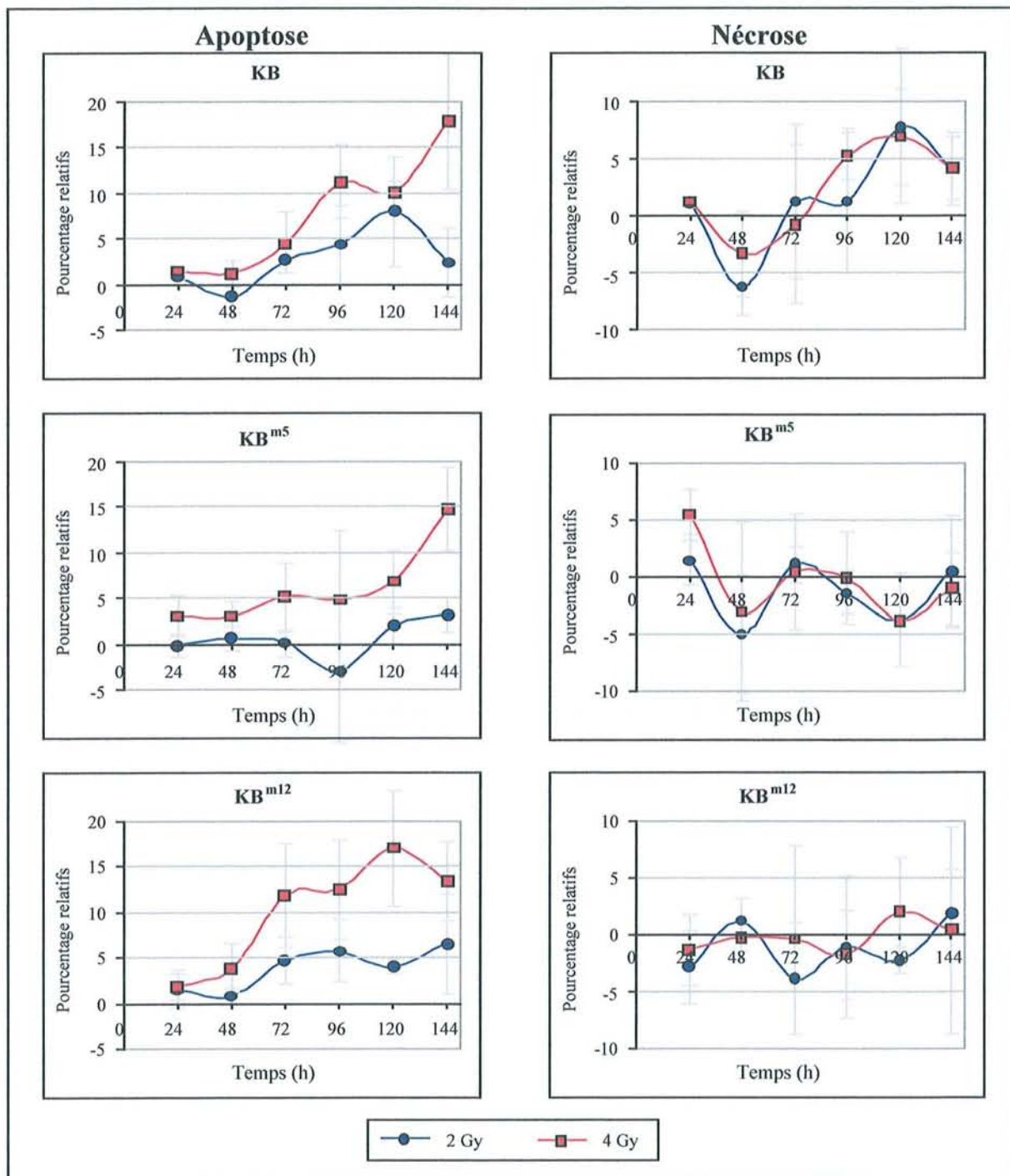


Figure 45 : Cinétique d'apoptose et de nécrose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy (en pourcentages relatifs).

IX.3.2 Observations en microscopie de fluorescence

Afin de confirmer les mesures réalisées par cytométrie en flux, des observations directes ont été réalisées sur la lignée mère KB et les deux clones. La Figure 46 présente un exemple de mise en évidence de l'apoptose par marquage au Hœchst 33342. Des cellules du clone KB^{m5} sont observées après des irradiations à 2 et 4 Gy ainsi que les cellules témoins correspondantes.

Le détail de l'évolution des cellules apoptotiques est présenté à la Figure 46 A. Les cellules témoins non irradiées ne montrent pas de cellules apoptotiques. En microscopie de fluorescence, il est possible de distinguer quelques étapes morphologiques d'induction de l'apoptose. Ainsi, les cellules marginées précoces sont facilement identifiables grâce à la condensation de la chromatine le long de la membrane nucléaire comme illustré sur la Figure 46. Progressivement elles deviennent des cellules marginées tardives reconnaissables par la structure en petits amas de l'ADN. La fin du processus apoptotique est caractérisée par la formation de corps apoptotiques résultant de la fragmentation de la cellule.

Les cellules KB^{m5} témoins après 96 heures de culture montrent une population de cellules non confluentes (Figure 46 B). Ces cellules sont en phase exponentielle de croissance, les noyaux de deux cellules en mitose sont d'ailleurs visibles.

Quatre-vingt-seize heures après l'irradiation à 2 Gy (Figure 46 C), la photographie montre une cellule apoptotique (en bas à droite) pour laquelle on distingue les corps apoptotiques résiduels. Une cellule marginée est également présente (en haut et au centre), dont la forme compactée et en amas de la chromatine contre la membrane nucléaire indique qu'il s'agit d'une cellule marginée précoce.

Après une irradiation de 4 Gy (Figure 46 D), la photographie montre la présence de plusieurs cellules apoptotiques ainsi qu'une cellule marginée. Plusieurs stades sont donc présents, bien que le nombre de cellules apoptotiques soit en définitive plus élevé lors d'une irradiation à 4 Gy qu'à 2 Gy.

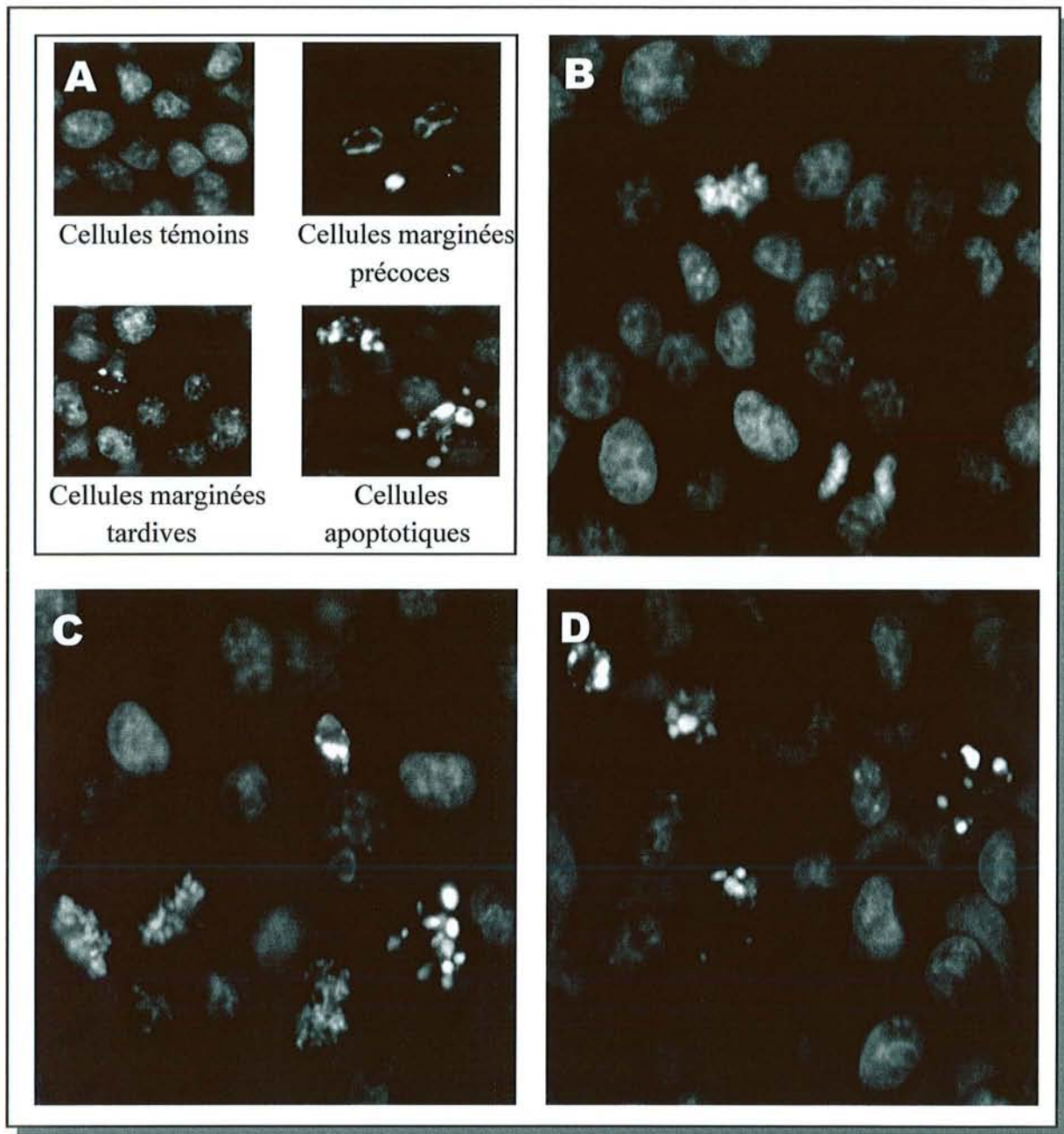


Figure 46 : Observation au microscope à fluorescence de l'induction d'apoptose dans le clone KB^{m5} après marquage au Hœchst 33342 ($G=100x$). A : Exemples de critères morphologiques de l'apoptose utilisés ; B : cellules KB^{m5} témoins à 96 heures de culture ; C : cellules KB^{m5} 96 heures après irradiation à 2 Gy ; D : cellules KB^{m5} 96 heures après irradiation à 2 Gy.

IX.4 Discussion

L'induction de la mort par apoptose et par nécrose a été suivie pendant 144 heures dans la lignée KB et dans les deux clones KB^{m5} (sensible) et KB^{m12} (résistant) par cytométrie en flux après marquage à l'AO-BET. Ceci a permis de montrer que l'induction d'apoptose est tardive dans ces lignées puisqu'elle est détectée à partir de 72 heures pour atteindre un maximum 120 heures après l'irradiation.

Le temps d'induction de l'apoptose varie selon le type histologique et la localisation d'origine des cellules. Il est connu que les cellules d'origine hématopoïétique entrent rapidement en apoptose après irradiation (quelques heures) contrairement à celles qui ne le sont pas et dont l'induction est plus longue (plusieurs jours) (322). Ainsi Story *et al.* observent 80 % de cellules apoptotiques dans une lignée de lymphome murin 4 heures après une irradiation de 4 Gy (141). Dans les lignées adhérentes, Meyn *et al.* rapportent que le pic d'apoptose d'une lignée d'adénocarcinome ovarien se situe 6 heures après l'irradiation (139) avec une induction variant de 25 à 40 % selon la dose d'irradiation (2,5 à 25 Gy). A l'opposé, Filipovitch *et al.* ont également observé 30 à 40 % de cellules apoptotiques d'une lignée de carcinome ovarien mais 72 heures après une irradiation à 10 Gy (323). La lignée CHO irradiée à 5 Gy montre 12 % de cellules apoptotiques après 42 heures (324). En fait, il existe une grande variabilité de délai et de niveau d'induction d'apoptose dans les lignées issues de tumeurs solides. Les cellules issues de carcinomes épidermoïdes, notamment des VADS, sont généralement considérées comme peu sensibles à l'apoptose et avec des temps d'induction relativement longs de l'ordre de 24 à 48 heures (139). Les faibles niveaux d'apoptose observés dans KB et les clones (15 à 20 %) ainsi que les délais d'induction importants (72 heures) sont donc en accord avec la littérature.

Ces observations, issues d'études *in vitro*, ne sont pas nécessairement les mêmes *in vivo*. Un allongement du délai d'induction de l'apoptose a ainsi été mis en évidence lors de traitements avec des drogues telles que le cisplatine (325) ou le cyclophosphamide (326) par rapport aux radiations ionisantes ce qui s'explique probablement par la pharmacocinétique de ces substances.

La relation entre la radiosensibilité et l'induction d'apoptose est un sujet encore vivement débattu. Plusieurs études ont montré que la résistance aux radiations ionisantes pouvait être liée à l'incapacité des cellules à déclencher l'apoptose (141, 206, 327). Toutefois cette

relation ne se vérifie pas toujours, notamment lorsque les cellules sont issues de tumeurs peu sensibles à l'apoptose telles que les carcinomes épidermoïdes des VADS (328). Ceci est généralement vérifié *in vivo* car les tumeurs qui répondent bien à l'irradiation comme les lymphomes sont connues pour donner un fort niveau d'apoptose radio-induite comparé aux tumeurs qui répondent peu comme les mélanomes (328). Les résultats décrits pour KB et les clones ne montrent pas de relation entre l'induction d'apoptose et la radiosensibilité. En effet, les deux lignées résistantes KB ($SF_2 = 0,739 \pm 0,075$) et KB^{m12} ($SF_2 = 0,703 \pm 0,133$) montrent les taux d'apoptose les plus élevés ($17,9 \pm 7,5$ et $13,3 \pm 4,3$ respectivement pour KB et KB^{m12}). A l'inverse KB^{m5} , qui est la plus sensible ($SF_2 = 0,406 \pm 0,109$), n'induit que peu d'apoptose (hormis à 144 heures après 4 Gy) et tardivement. Ceci semble donc en accord avec certaines des études citées précédemment.

La relation entre l'apoptose et la radiosensibilité pose la question de l'importance du statut p53, d'autant plus que 50 à 60 % des tumeurs des VADS sont porteuses d'une mutation de ce gène provoquant dans la plupart des cas une inactivation de cette protéine (319). Certaines voies d'induction de l'apoptose sont sous la dépendance de p53. Radford *et al.* ont montré que la présence de p53 mutée provoque une apoptose 6 fois plus lente que lorsque le gène est sauvage (142), l'apoptose apparaît donc plus tardivement. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la mort rapide par apoptose serait due aux cassures de l'ADN alors que l'apoptose tardive serait dépendante des aberrations chromosomiques (329). L'influence du statut de p53 sur la radiosensibilité a fait l'objet de nombreuses études tant *in vitro* qu'*in vivo*. Là encore la réponse n'est pas parfaitement claire car selon les études et les localisations, les résultats sont contradictoires. Par exemple dans des lignées de lymphomes de Burkitt, la radiorésistance a pu être liée à la mutation de p53 (330). A l'inverse cette relation n'apparaît pas dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (123, 305). Dans cette même localisation, Servomaa *et al.* ont montré que la présence de p53 mutée était significativement liée à la radiosensibilité et non à la radiorésistance (304). De plus la sensibilité est fortement liée au type de mutation (304). Dans KB, le gène p53 est sauvage mais la protéine n'est pas exprimée comme dans les clones KB^{m5} et KB^{m12} . L'importance des temps d'induction d'apoptose confirme l'absence de protéine p53 fonctionnelle.

Il a également été suggéré que la présence de protéine p53 sauvage favoriserait la sortie de l'arrêt en G_2/M en induisant l'apoptose des cellules bloquées (318, 331). Or les cellules KB et les clones montrent bien un arrêt radio-induit en G_2/M généralement maximum à 12 heures

mais leur échappement à cet arrêt ne correspond pas à l'induction d'apoptose qui survient plus tard (72 heures). Ceci confirme également que la protéine p53 n'est pas fonctionnelle dans la lignée KB ni dans les clones. Il est donc fortement probable que l'apoptose mise en évidence dans KB et les clones soit due à une voie indépendante de p53.

En plus des lésions de l'ADN qui activent l'apoptose par l'intermédiaire de p53, les radiations ionisantes peuvent induire la mort cellulaire programmée par une voie membranaire qui est celle des céramides. L'augmentation du taux de céramides due à l'activation de la sphingomyélinase et de la céramide synthase peut induire l'apoptose (155). Il a été montré qu'en réponse à une irradiation de 10 Gy, la sphingomyélinase augmentait rapidement (5 à 10 minutes) le taux intracellulaire de céramides de 1,5 à 2 fois (332). La céramide synthase provoque quant à elle, une augmentation tardive (à partir d'1 heure) mais plus importante du taux de céramides (4 à 6 fois) (156, 333). Ce taux élevé de céramides permet une induction rapide de la mort cellulaire programmée (en quelques heures) ce qui n'est pas compatible avec l'induction très tardive observée dans KB et les clones. Mais une étude récente a montré que les lésions de l'ADN pouvaient activer la céramide synthase (156).

Récemment, Haimovitz-Friedman a avancé l'hypothèse suivante, compatible avec notre étude (155). Les faibles doses utilisées dans notre travail (2 et 4 Gy) provoquent peu de radio-lésions de l'ADN et n'activent que faiblement la céramide synthase. L'augmentation du taux de céramide reste donc faible et n'induit pas l'apoptose (d'autant plus que la sphingomyélinase produit proportionnellement moins de céramides). L'absence de protéine p53 fonctionnelle empêche la réparation des radio-lésions de l'ADN qui, après le blocage en phase G₂/M, seront amplifiées car les cellules reprennent un cycle cellulaire normal (aucune polyploïdie n'est observée). Après 2, 3 voire 4 mitoses successives, l'amplification exponentielle du nombre de lésions de l'ADN provoquerait l'activation proportionnelle de la céramide synthase et donc du taux de céramides ce qui déclencherait l'apoptose. Cette hypothèse permet donc d'expliquer l'apoptose radio-induite tardive observée dans KB et les clones (environ 72 heures). Actuellement, on ne sait pas si l'activation de la céramide synthase est sous la dépendance de p53. Dans le modèle KB, l'absence de protéine p53 fonctionnelle suggère que l'activation de la céramide synthase soit un processus p53-indépendant. La validation de cette hypothèse nécessite de mesurer la quantité de céramides produits par l'activité de la céramide synthase après différentes doses de radiation.

La nécrose est une mort violente provoquée par des conditions non physiologiques (328). L'analyse cinétique de la proportion de cellules KB, KB^{m5} et KB^{m12} mourant par nécrose indique que ce taux est en moyenne identique dans les témoins et dans les cellules irradiées. Ceci montre donc que de faibles doses uniques de 2 ou 4 Gy telles que celles utilisées en radiothérapie ne provoquent pas de mort nécrotique significative mais plutôt l'apoptose. L'importance de la mort mitotique n'a pas été estimée. Son rôle dans la réponse à l'irradiation doit toutefois être important notamment pour le clone KB^{m5} qui montre une faible induction d'apoptose alors que sa radiosensibilité est la plus importante ($SF_2 = 0,406 \pm 0,109$). La mort mitotique semble donc être prépondérante dans les cellules issues de tumeurs peu sensibles à l'apoptose comme c'est le cas pour les carcinomes épidermoïdes (328).

L'analyse de la mort radio-induite de KB et des clones KB^{m5} et KB^{m12} montre donc des inductions d'intensité moyenne compatibles avec les données de la littérature sur les carcinomes épidermoïdes des VADS. Cette apoptose tardive laisse supposer une induction indépendante de p53. L'implication de la voie des céramides produits par la céramide synthase en réponse à l'accumulation de dommages non réparés de l'ADN pourrait être envisageable.

RESUME

La mort cellulaire radio-induite a été suivie pendant 144 h après irradiation à 2 et 4 Gy dans KB et deux clones (KB^{m5} et KB^{m12}) de radiosensibilité extrême.

L'apoptose observée est tardive (72-144 h) et les taux d'induction correspondent à ceux des carcinomes des VADS. La présence d'une induction radio-induite d'apoptose est confirmée par microscopie de fluorescence. La nécrose ne semble pas être le mode de mort cellulaire prépondérant après irradiation à 2 et 4 Gy.

Ces résultats supposent que la mort apoptotique tardive mise en évidence serait induite par une voie p53-indépendante qui pourrait être celle des céramides.

Chapitre X

Expression de gènes impliqués dans les processus de détoxification.

X Expression de gènes et protéines impliqués dans les processus de détoxification.

X.1 Objectifs

La résistance de cancers des VADS est multifactorielle et peut être intrinsèque (334) ou acquise (335). La résistance aux radiations peut être influencée par la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par les radiations ionisantes (336) et nécessitant des enzymes telles que les superoxyde dismutase, les métallothionéines et des enzymes liées au glutathion comme les glutathion S-transférases.

Le phénotype GST- μ nul, présent dans 40 à 50% de la population, a été associé avec les cancers des VADS induits par la fumée de cigarettes. L'isotype GST- π a été lié à la résistance aux radiations ionisantes et aux drogues alkylantes (94). Mulder *et al.* (95) ont montré que GST- π contribuait à la résistance inhérente aux drogues anti-cancéreuses dans les cancers du larynx et du pharynx. D'une manière générale, il a été montré que l'augmentation de l'expression des GSTs est liée à l'augmentation de la résistance aux drogues et aux radiations ionisantes (96).

L'un des buts de ce travail est d'étudier l'implication des isotypes GST- μ et π dans la sensibilité à l'irradiation en se basant sur l'analyse de l'hétérogénéité clonale de l'expression basale de l'ARNm des GSTs. Ceci est réalisé avec des clones issus de KB^m qui est la fraction survivante de KB après une irradiation fractionnée à dose thérapeutique.

Il s'agit par la suite d'analyser la cinétique d'expression des ARNm de GST- π , MnSOD et MT2A ainsi que de leur protéine respective toujours en se basant sur l'hétérogénéité clonale étudiée dans deux clones KB^{m5} et KB^{m12} de radiosensibilité extrême, ainsi que dans la lignée mère KB.

Ce travail n'a pas été effectué pour FaDu et les fractions survivantes FaDu^{m20} et FaDu^{m72}.

X.2 Méthodologie

X.2.1 RT-PCR

Afin de procéder à l'amplification des gènes GST- μ , GST- π , MnSOD, MT2A et β 2-microglobuline qui est le gène de référence, une transcription inverse est réalisée. Celle-ci est effectuée par une méthode non dirigée à l'aide d'amorces aléatoires ce qui permet, à partir d'un échantillon initial d'ARNtx d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) utilisable pour amplifier n'importe quel gène. La méthode par oligodT n'a pas été choisie car seule la partie 3' de l'ARN est efficacement rétro-transcrite, ce qui peut poser un problème lorsque le fragment à amplifier se situe dans la partie opposée (en 5').

Les amplifications sont réalisées soit de manière « classique » dans des tubes à parois fines placés dans un thermocycleur PHC-3, soit à l'aide d'un thermocycleur Rapidcycler et de tubes capillaires. Cette technologie apparue au milieu des années 90 présente de nombreux avantages. Le principe repose sur des échanges de chaleur quasi instantanés du mélange réactionnel placé dans un tube capillaire et qui n'excède pas 10 μ l. Ceci permet d'écourter les phases de montée et de descente en température ainsi que celles de dénaturation de l'ADN et d'appariement des amorces. Ainsi une PCR de 30 cycles, qui habituellement dure 2 à 3 heures, est achevée en 15 à 20 minutes.

La RT-PCR semi-quantitative fait appel à une co-amplification du gène d'intérêt et d'un gène de référence (β 2-microglobuline). Une optimisation des conditions d'amplification due aux interactions et compétitions est donc nécessaire.

Lors de l'analyse par électrophorèse des produits de PCR, le bromure d'éthidium migre dans le sens inverse de l'ADN. Il est préférable de laisser l'ADN en contact avec le BET afin d'obtenir la meilleure visualisation et donc d'éviter que l'ADN migre dans une zone qui ne contient plus de BET. Les conditions de migration sont notamment optimisées selon ce paramètre. Les gels sont analysés par densitométrie à l'aide d'un système d'analyse d'image. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de produits de PCR. L'intensité du signal est ajustée avant la prise d'image afin de ne pas saturer le capteur de la caméra. En effet, cela entraîne une modification des intensités relatives de fluorescence des produits de PCR.

X.2.2 Western-blots

La détection de la protéine GST- π , MnSOD et MT2A est réalisée par immuno-blot. Les protéines, extraites à 4°C à partir des cellules en phase exponentielle de croissance sont transférées sur une membrane de PVDF de porosité adéquate, après séparation sur un gel de polyacrylamide. Les propriétés de séparation du gel varient selon le degré de réticulation du gel (qui dépend du ratio acylamide/bisacrylamide et qui est ici de 19:1) ainsi que de la concentration (qui permet de faire varier la densité de ce gel). Ici, seule la concentration du mélange acylamide / bisacrylamide varie en fonction de la protéine à mettre en évidence. Avant de procéder au marquage, la membrane est saturée pour éviter les fixations aspécifiques des anticorps. La protéine cible est alors détectée par un anticorps spécifique qui lui-même est mis en évidence par une réaction immuno-colorimétrique dont le principe repose sur l'émission de lumière à partir du luminol qui est un substrat de la HRP couplée aux anticorps secondaires.

X.3 Résultats

X.3.1 Expression basale des ARNm de GST- μ et GST- π

L'expression de l'ARNm de GST- μ et GST- π a été détectée dans tous les clones (Figure 47). La co-amplification du gène GST- μ ou GST- π n'a pas altéré la stabilité de l'amplification du gène de la β 2-microglobuline. L'intensité de la bande de 178 paires de bases de GST- μ apparaît comme étant relativement constante d'un clone à l'autre (Figure 47A). Il a été observé que le profil d'amplification de GST- π varie d'une lignée à l'autre (Figure 47B). L'expression de l'ARNm des GSTs a été suivie dans les clones sur une période de 18 mois, elle a été trouvée stable sans qu'il soit nécessaire de procéder à une ré-irradiation. Ceci indique que les variations d'ARNm ne sont pas exprimées transitoirement.

La bande de 621 paires de bases de GST- π montre de grandes variations d'amplification. Par exemple, avec un niveau constant de β 2-microglobuline, l'ARNm de GST- π varie d'une forte expression dans le clone 2 jusqu'à une absence d'expression dans le clone 3. Dans toutes les expériences d'amplification de GST- μ ou GST- π , les variations intra-expérimentales du Ratio d'Expression Relatif (RER) n'excèdent jamais 10%.

Le niveau basal d'expression du RER de l'ARNm de GST- μ varie de 0,62 (KB^{m13}) à 1,84 (KB^{m3}) (Tableau 25). Dans la lignée parentale KB, la valeur du RER est de 0,69, une des plus faibles. KB^m et les autres clones montrent une surexpression significative ($P < 0,05$) de l'ARNm de GST- μ comparé à KB, excepté pour KB^{m10} et KB^{m13}. Dans la fraction survivante KB^m, le RER de GST- μ (1,06) est surexprimé 1,7 fois par rapport à KB. Cette valeur apparaît comme proche de la valeur moyenne des RER déterminés pour les clones (1,2). Une variation significative du RER de l'ARNm de GST- μ a été observée dans les clones allant de 0,62 (KB^{m13}) à 1,84 (KB^{m3}) ce qui représente une surexpression d'environ 1 à 2,7 fois comparé à KB. Les valeurs de RER de GST- μ ont toutes été trouvées significativement différentes ($P < 0,05$) les unes par rapport aux autres excepté pour KB^{m10} et KB^{m13}.

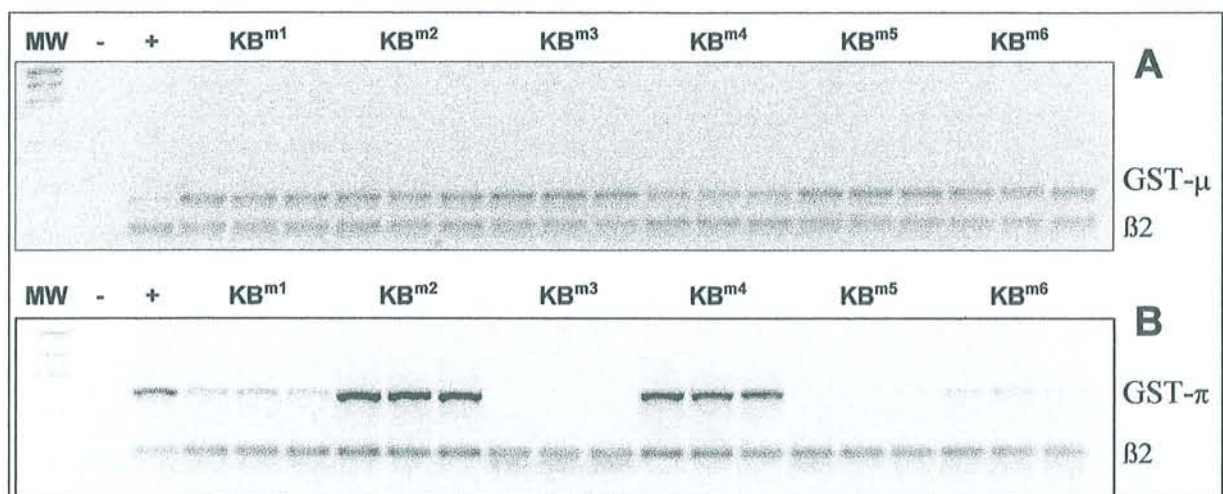


Figure 47 : Exemple d'analyse en RT-PCR de l'expression basale de GST- μ (A) et GST- π (B) dans les clones. Première ligne : marqueur de poids moléculaires (MW), seconde et troisième lignes : contrôles négatif (-) et positif (+). Le témoin positif de GST- μ a été préparé à partir de l'ADNc d'un donneur anonyme en bonne santé. Le témoin positif de GST- π a été préparé à partir de l'ADNc de la lignée leucémique humaine K562 qui a une forte expression d'ARNm de GST- π . Les PCR semi-quantitative de GST- μ ou GST- π ont été réalisées avec une amplification concomitante du gène de la β 2-microglobuline comme gène de référence. Les produits de RT-PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'amplification du gène de la β 2-microglobuline produit un fragment de 120 bp. Tous les essais ont été réalisés en « triplicate » et répétés au moins trois fois.

D'une manière générale, aucune surexpression de GST- μ ou bien seulement modérée, n'a été observée dans les clones comparé à la lignée parentale KB (Figure 48).

Tableau 25 : Ratio d'expression relative basale de l'ARNm de GST- μ et GST- π dans KB, KB^m et les clones.

Lignées cellulaires	GST-μ	Valeur de P^b	GST-π	Valeur de P[*]
KB	0.69 (0.17) ^a	-	0.04 (0.02)	-
KB ^m	1.06 (0.31)	0.0469	0.30 (0.12)	0.0039
KB ^{m1}	1.62 (0.44)	0.0005	0.36 (0.11)	0.0039
KB ^{m2}	1.27 (0.26)	0.0003	1.60 (0.21)	0.0039
KB ^{m3}	1.84 (0.75)	0.0003	0.01 (0.01)	0.0099
KB ^{m4}	1.02 (0.22)	0.0023	1.20 (0.26)	0.0062
KB ^{m5}	1.53 (0.42)	0.0003	0.03 (0.01)	ns
KB ^{m6}	1.53 (0.45)	0.0003	0.20 (0.09)	0.0039
KB ^{m7}	0.94 (0.07)	0.0032	0.01 (0.01)	0.0065
KB ^{m9}	1.19 (0.06)	0.0015	0.02 (0.02)	ns
KB ^{m10}	0.69 (0.07)	ns	0.90 (0.16)	0.0039
KB ^{m11}	0.99 (0.02)	0.0015	0.01 (0.00)	0.0039
KB ^{m12}	1.12 (0.02)	0.0014	1.13 (0.30)	0.0062
KB ^{m13}	0.62 (0.23)	ns	0.49 (0.26)	0.0039

^a Les RER ont été calculés en triplicate comme le ratio de l'intensité de fluorescence des bandes de GST- μ ou GST- π sur la fluorescence des bandes correspondantes de β 2-microglobuline. Les résultats sont la valeur moyenne d'au moins trois expériences indépendantes (\pm écart-type). Les données n'ont pas été déterminées pour le clone 8.

^b Test U non paramétrique de Mann Whitney comparant KB^m ou les clones avec KB, ns = non significatif.

A l'opposé, les RER de GST- π présentent d'importantes variations allant de 0,01 (KB^{m11}) à 1,60 (KB^{m2}) (Tableau 25). Avec 0,05, la valeur de KB est l'une des plus faibles. KB^m (0,30) montre un niveau d'expression significatif de GST- π 6,6 fois supérieur ($P=0,0039$) à la lignée mère KB. En fait, seuls KB^{m5} (0,03) et KB^{m9} (0,02) ne montrent pas de différence statistique avec la valeur du RER de KB. La plus forte surexpression (32 fois) a été observée dans KB^{m2} (1,60). Les clones KB^{m4}, KB^{m10} et KB^{m12} ont aussi une valeur élevée de RER de GST- π , respectivement 1,20 ; 0,90 et 1,13 ce qui correspond à une surexpression de 24 fois, 18 fois et 23 fois comparé à KB (Figure 48). Trois autres clones, KB^{m1} (0,36), KB^{m6} (0,2) et KB^{m13} (0,49), ont une surexpression modérée allant de 4 fois (KB^{m6}) à 10 fois (KB^{m13}). KB^m ne montre pas de différence statistique avec ces trois clones.

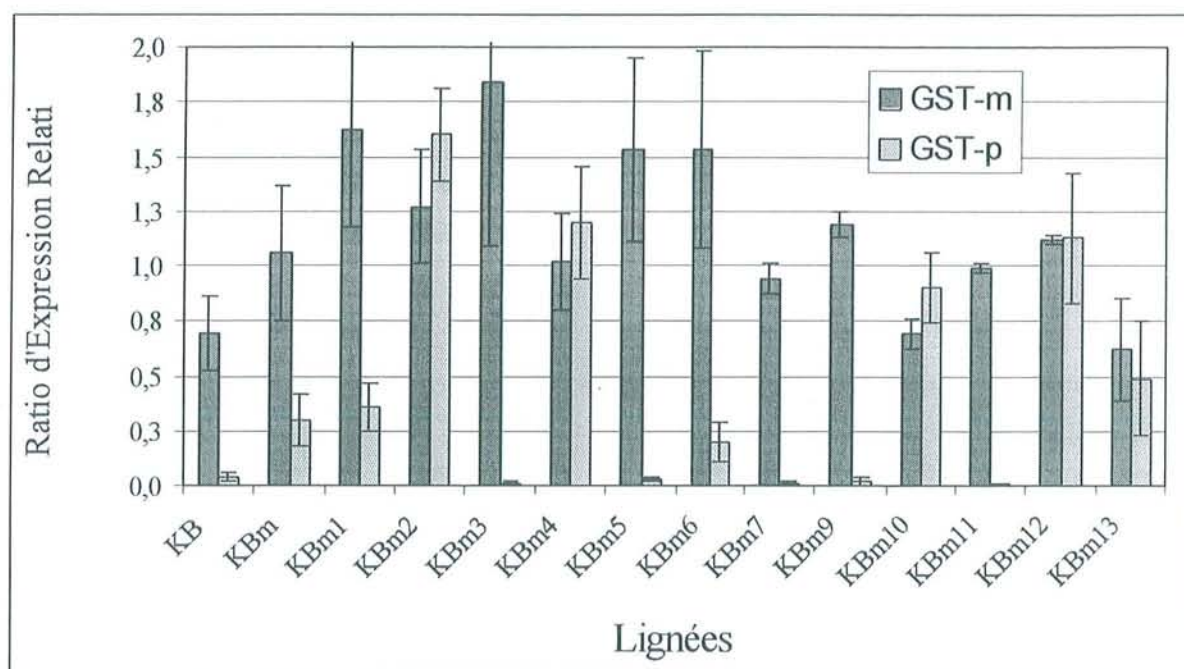


Figure 48 : Représentation graphique des Ratio d'Expression Relatif de l'ARNm de GST- μ et GST- π sans irradiation.

Donc les modifications modérées (KB^{m1}, KB^{m6} and KB^{m13}) ou importantes (KB^{m2}, KB^{m4}, KB^{m10} and KB^{m12}) du niveau d'expression dans les 7 clones peuvent être attribuées à l'irradiation.

X.3.2 Expression radio-induite

L'expression des gènes GST- π , MnSOD et MT2A a été suivie après irradiation à 2 et 4 Gy afin d'analyser la relation avec la sensibilité aux radiations ionisantes. Seuls les clones KB^{m5} (sensible) et KB^{m12} (résistant) ainsi que la lignée mère KB ont été utilisés. L'expression de GST- μ n'a pas été suivie car seules de faibles différences d'expression ont été observées entre les clones.

X.3.2.1 GST- π

La cinétique d'induction de GST- π , suivie pendant 48 heures après irradiation, n'a pas permis de mettre clairement en évidence l'expression de l'ARNm de GST- π dans la lignée mère KB ni dans le clone radiosensible KB^{m5}. Les très faibles taux révélés sont à la limite de détection des appareils et s'apparentent plus à du bruit de fond qu'à un signal interprétable. A l'inverse, le clone KB^{m12} montre un signal de base (Tableau 25) et des variations d'expression (Tableau 26).

Tableau 26 : RER normalisés de l'ARNm de la GST- π dans le clone KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy
0	1,00 0,00	1,00 0,00
0,5	2,37 0,52	1,18 0,45
1	1,43 0,04	1,87 0,60
3	1,62 0,58	0,76 0,37
6	1,64 0,31	0,28 0,05
12	1,02 0,21	1,60 0,47
24	0,84 0,18	0,97 0,45
48	1,98 0,53	0,36 0,06

Les ratio d'expression relative normalisés décrivent des courbes biphasiques (Figure 49) qui diffèrent selon la dose de radiations appliquées. Après 2 Gy, une induction rapide et transitoire de l'ARNm est observée. En effet, 30 minutes après l'irradiation, le taux d'ARNm de GST- π est multiplié par $2,37 \pm 0,52$ alors qu'une heure après, le RER normalisé redescend à $1,43 \pm 0,04$. Une second augmentation est observée entre 3 et 6 heures après l'irradiation

avant que ce taux revienne à son niveau de base. Les variations d'expression d'ARNm consécutives à une irradiation de 4 Gy montrent aussi un profil biphasique. Toutefois, le premier pic d'induction de l'ARNm atteint sa valeur maximale ($1,87 \pm 0,60$) 1 heure après l'irradiation avant de subir une décroissance importante jusqu'à 6 heures ($0,28 \pm 0,05$). Le second pic d'expression se met alors en place à 12 heures avant que le taux d'ARNm retrouve son niveau basal à 24 heures. Quarante huit heures après irradiation, le taux d'ARNm réaugmente ($1,98 \pm 0,53$) lorsque les cellules ont été exposées à une dose de 2 Gy alors qu'il diminue fortement après une dose de 4 Gy ($0,36 \pm 0,06$).

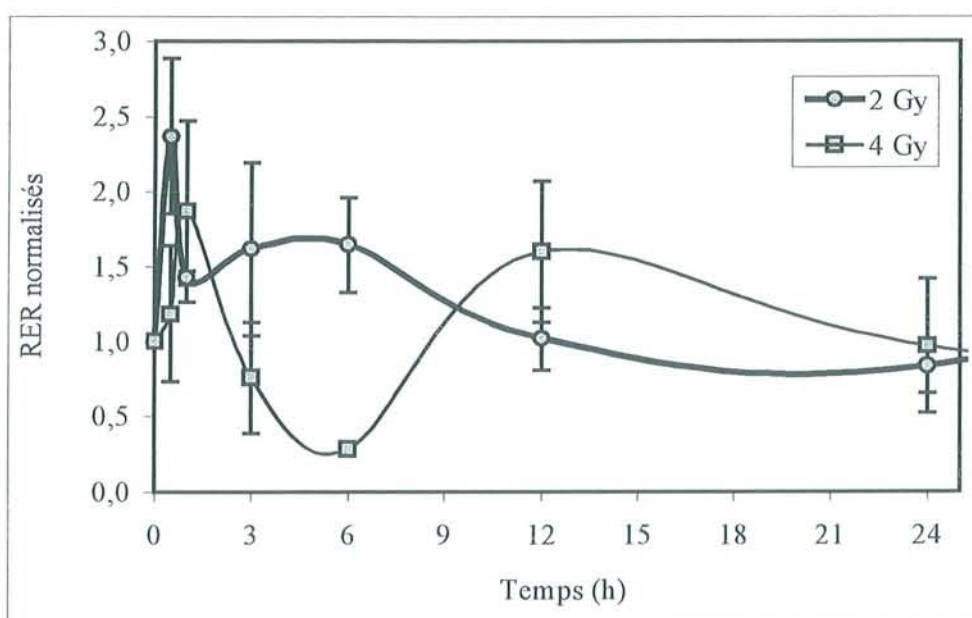


Figure 49 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la GST- π dans le clone KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

L'analyse qualitative du western-blot (Figure 50) ne permet pas de mettre en évidence la présence de la protéine GST- π dans la lignée mère KB ni dans le clone KB^{m5}. Le clone KB^{m12} montre une faible expression dans le témoin commun aux deux doses correspondant au niveau de base. L'induction de la protéine au cours du temps après une irradiation à 2 Gy montre un profil similaire à celui de l'expression de l'ARNm à savoir une augmentation rapide et transitoire (30 min) suivie d'une déplétion modérée à 1 heure. Une seconde induction se met en place entre 3 et 6 heures puis le taux de protéine revient à son niveau basal. L'irradiation à

4 Gy, induit une expression similaire et plus prononcée qu'à 2 Gy. Ce profil diffère donc de l'expression de l'ARNm qui montre une déplétion importante entre 3 et 6 heures après l'irradiation.

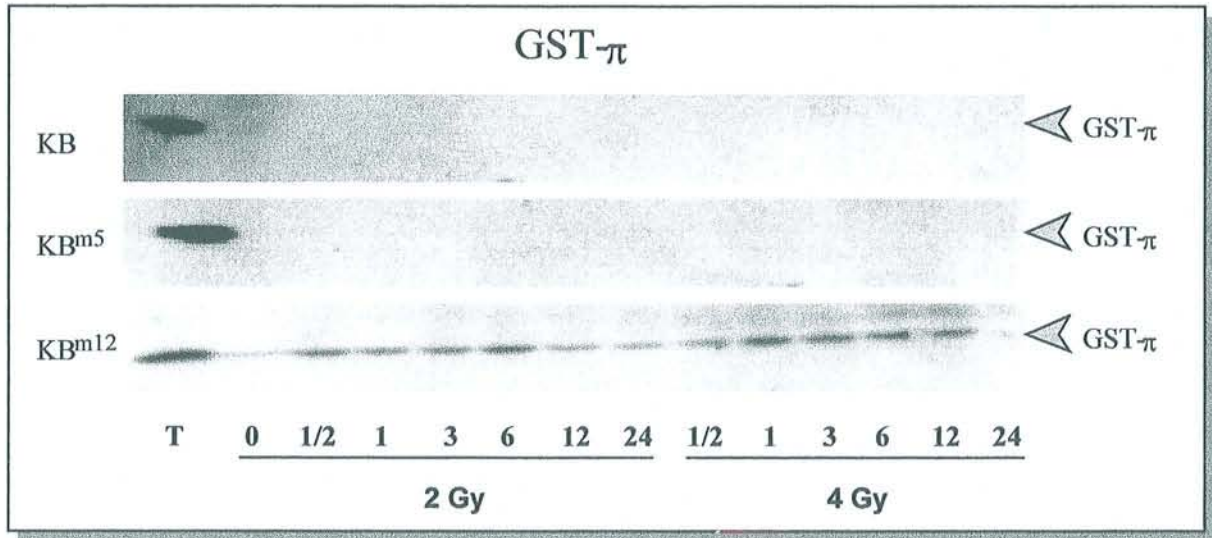


Figure 50 : Immunoblots de la GST- π sur KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

X.3.2.2 *MnSOD*

L'ARNm de la MnSOD est détecté dans les trois lignées KB, KB^{m5} et KB^{m12}. L'irradiation à 2 Gy provoque une déplétion rapide (30 min) du taux d'ARNm qui varie selon les lignées de $0,31 \pm 0,07$ pour KB à $0,76 \pm 0,17$ pour KB^{m5} (Tableau 27). Une heure après l'irradiation, les RER normalisés retrouvent leur taux basal (Figure 51) qui ne varient plus pendant la durée de l'analyse. Seul le clone KB^{m5} montre une surexpression de l'ARNm avec toutefois des différences non significatives avec les valeurs de KB et KB^{m12} car les écarts-type sont importants.

Le profil d'expression de l'ARNm de la MnSOD après une irradiation à 4 Gy (Figure 52) est identique pour les temps précoces avec toutefois une diminution plus marquée ($0,18 \pm 0,15$ pour KB^{m5}) et plus longue (jusqu'à 3 heures pour KB) du taux d'ARNm. Contrairement à l'irradiation de 2 Gy, le niveau d'expression des ARNm de la MnSOD subit une induction

entre 3 et 6 heures après l'irradiation de 4 Gy. Elle reste modérée avec des valeurs de RER normalisés de $1,99 \pm 1,08$; $1,62 \pm 0,38$; $1,70 \pm 0,68$ respectivement pour KB, KB^{m5} et KB^{m12}. Une légère déplétion est observée à 12 heures avant que le taux d'expression revienne à son niveau de base.

Tableau 27 : RER normalisés de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB		KB ^{m5}		KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy
0	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00
0,5	0,31 0,07	1,20 0,38	0,76 0,17	0,79 0,10	0,72 0,20	0,84 0,18
1	1,02 0,25	0,53 0,16	1,72 0,91	0,18 0,15	0,87 0,12	0,63 0,06
3	1,10 0,15	0,66 0,25	1,45 0,47	1,62 0,38	0,81 0,25	1,22 0,30
6	0,99 0,11	1,99 1,08	0,76 0,17	1,05 0,13	0,89 0,23	1,70 0,68
12	0,86 0,08	0,75 0,18	1,11 0,38	0,52 0,33	0,70 0,29	0,68 0,15
24	0,64 0,34	0,78 0,30	0,84 0,33	1,01 0,62	0,94 0,13	1,04 0,07
48	2,67 1,97	1,20 0,24	4,11 2,74	1,17 0,27	1,00 0,41	2,29 0,69

La protéine MnSOD est détectée en western-blot dans la lignée KB et dans le clone KB^{m5} mais elle n'est pas mise en évidence dans KB^{m12} (Figure 53). Après une irradiation de 2 Gy, KB montre une augmentation progressive du taux de protéines au cours du temps. Une dose de 4 Gy donne un profil différent car deux inductions sont observées à ½-1 heure et 6 heures après l'irradiation. La MnSOD est bien détectée dans le clone KB^{m5} suite aux irradiations à 2 et 4 Gy. Les faibles variations d'amplitude observées peuvent être attribuées aux variations expérimentales notamment au niveau de la quantité de protéines déposées. Dans KB^{m12}, la MnSOD n'est pas détectée quelle que soit la dose appliquée. Ces données ont été confirmées sur au moins 2 expériences indépendantes.

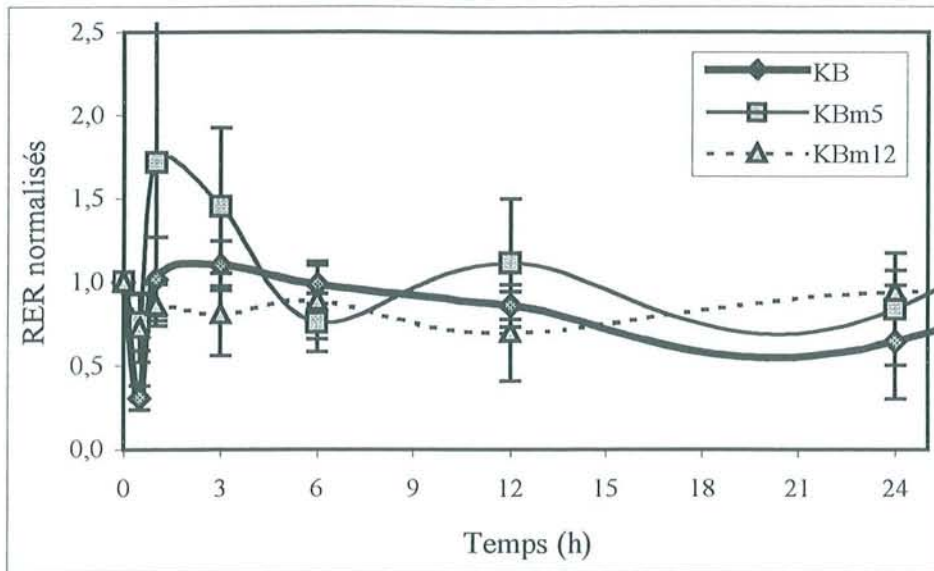


Figure 51 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy.

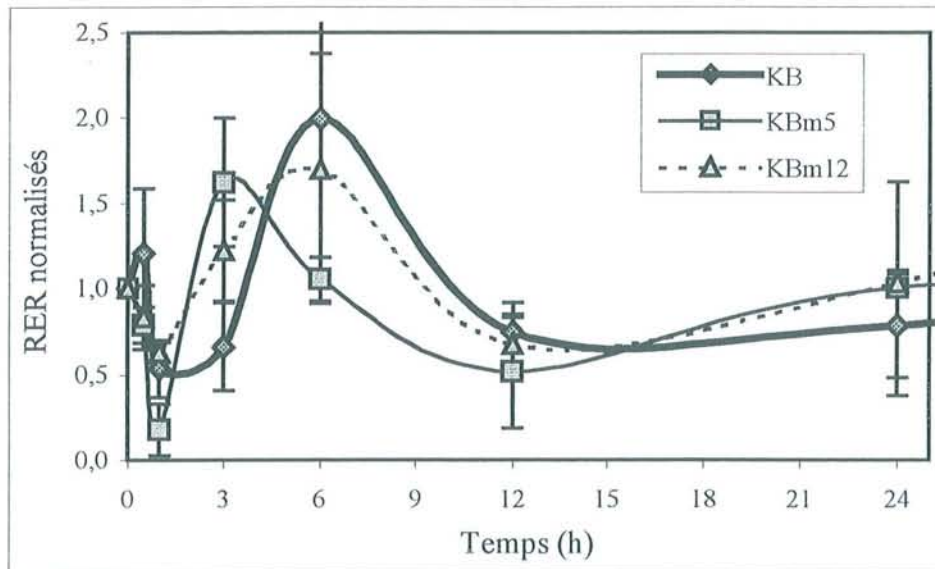


Figure 52 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy.

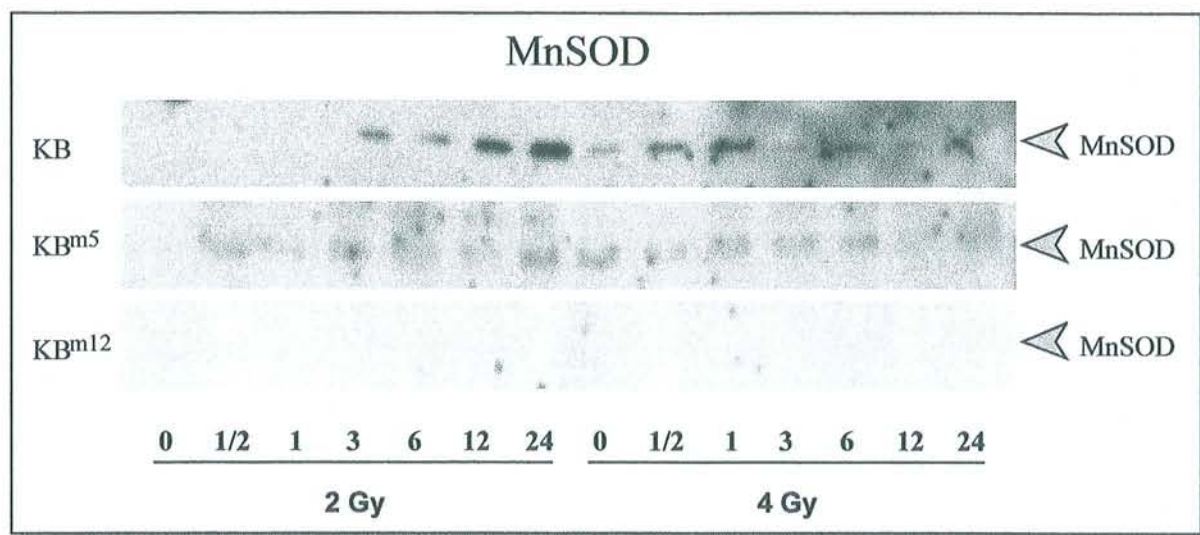


Figure 53 : Immuno-blots de la MnSOD sur KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

X.3.2.3 *MT2A*

Contrairement à GST- π , l'ARNm de la MT2A est amplifié dans la lignée mère et dans les deux clones. L'irradiation à 2 Gy provoque des variations d'expression (Tableau 28). Ainsi la lignée mère KB montre une induction en deux temps : la première, de faible amplitude ($1,21 \pm 0,03$ à 3 heures), débute immédiatement après l'irradiation et se prolonge pendant 6 heures. Puis la seconde prend place avec un pic maximal à 12 heures ($2,30 \pm 0,00$). Le suivi pendant 48 heures ne permet pas d'observer de retour à un taux d'expression basal. Les deux clones ont un profil différent (Figure 54) dans le sens où ils subissent une faible déplétion non significative de leur taux d'ARNm immédiatement après l'irradiation à 2 Gy, suivi d'une induction (comme KB) mais à 6 heures ($1,75 \pm 0,16$ et $1,61 \pm 0,16$ respectivement pour KB^{m5} et KB^{m12}). Alors que le taux d'ARNm revient au niveau du témoin après 24 heures, une diminution importante est observée à 48 heures.

Les profils d'expression après une irradiation à 4 Gy diffèrent également selon les lignées cellulaires (Figure 55). Ainsi KB montre une induction à 3 heures ($1,80 \pm 0,00$) suivi d'une déplétion à 6 heures et d'un retour à un niveau basal dès 12 heures. Le clone KB^{m5} ne présente pas la même réponse à l'irradiation car l'induction maximale s'effectue plus tardivement à 12 heures.

Tableau 28 : RER normalisés de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.

Temps (h)	KB		KB ^{m5}		KB ^{m12}	
	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy	2 Gy	4 Gy
0	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00	1,00 0,00
0,5	1,12 0,00	0,66 0,00	0,98 0,02	1,07 0,00	1,00 0,34	1,02 0,16
1	1,17 0,26	0,79 0,23	1,18 0,49	0,83 0,00	0,90 0,06	1,01 0,28
3	1,21 0,03	1,80 0,00	0,79 0,00	0,79 0,00	1,13 0,06	0,85 0,12
6	1,10 0,00	0,45 0,00	1,75 0,16	1,00 0,00	1,61 0,16	0,79 0,01
12	2,30 0,00	0,92 0,36	1,24 0,17	1,85 0,00	0,76 0,14	1,02 0,23
24	1,63 0,19	0,71 0,24	1,19 0,01	0,86 0,00	0,92 0,32	0,81 0,01
48	1,78 0,16	0,69 0,22	0,38 0,13	0,63 0,00	0,42 0,11	0,69 0,05

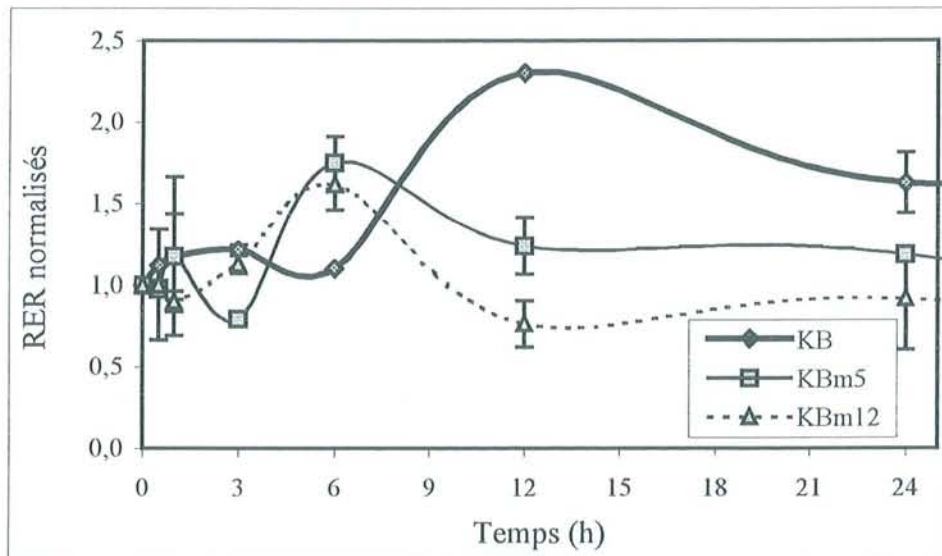


Figure 54 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy.

Le clone KB^{m12} ne montre pas de variations significatives. Seule une légère diminution du taux d'ARNm est mise en évidence entre 3 et 6 heures ($0,79 \pm 0,01$). Après les éventuelles inductions, une sous-expression du taux d'ARNm est observée pour les trois lignées qui ne retrouvent donc pas totalement leur niveau d'expression basal ce qui est également le cas lors d'une irradiation à 2 Gy (hormis pour KB).

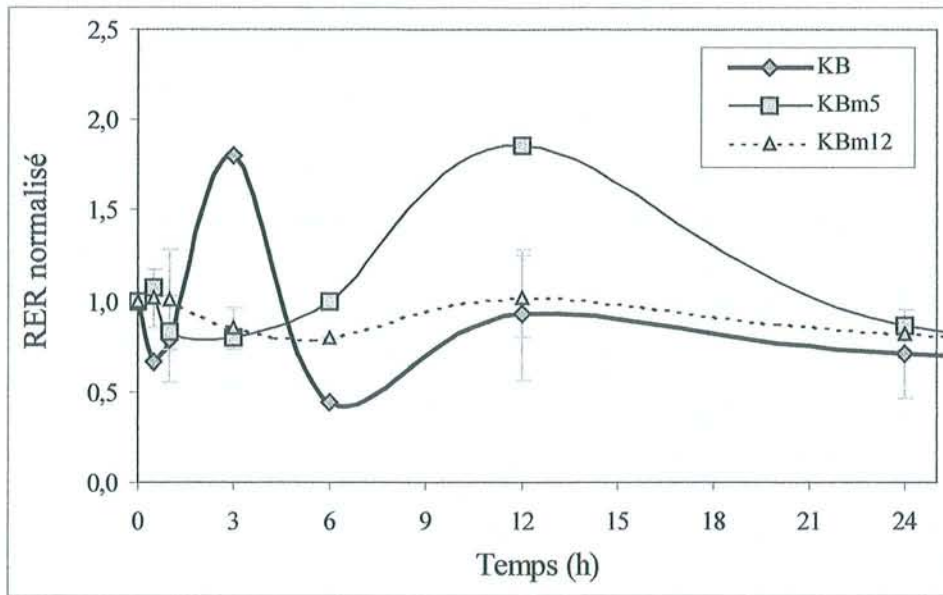


Figure 55 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy.

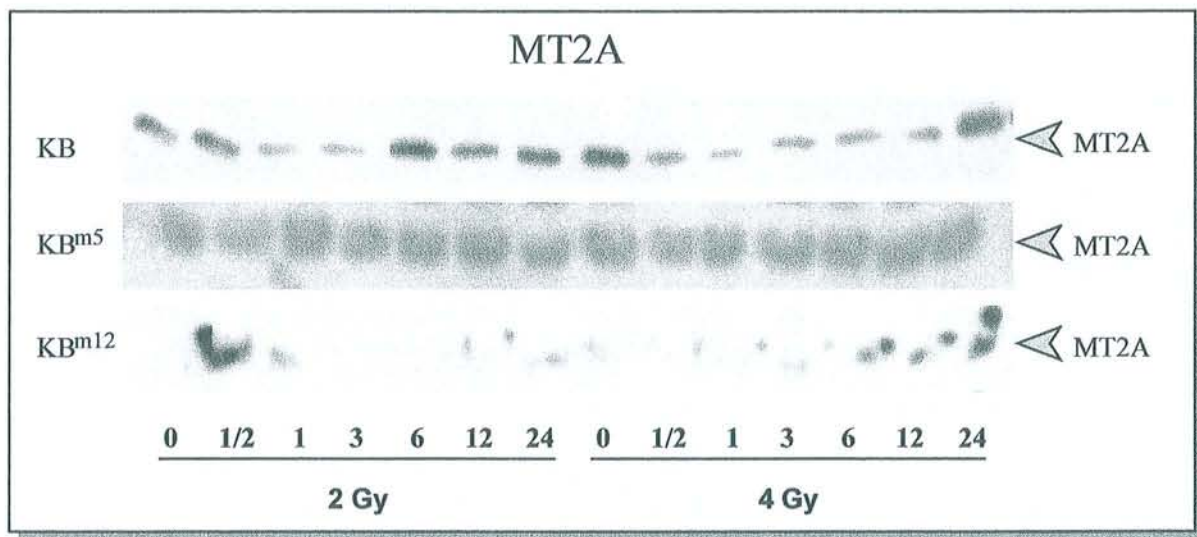


Figure 56 : Immuno-blots de la MT2A sur KB, KB^{m5} et KB^{m12}.

Comme pour la MnSOD, la protéine MT2A est détectée dans la lignée mère KB ainsi que dans le clone KB^{m5} mais pas dans KB^{m12} (Figure 56). KB montre une diminution de l'expression de la MT2A à 1 et 3 heures après l'irradiation à 2 Gy, alors qu'une induction est

observée entre 6 et 24 heures. L'irradiation à 4 Gy produit une déplétion durable du taux de protéines dans KB. A l'inverse, l'expression de la MT2A dans le clone KB^{m5} semble stable après irradiations à 2 et 4 Gy. Dans le clone KB^{m12}, la protéine n'est pas mise en évidence ou très faiblement pour certains temps.

X.4 Discussion

X.4.1 Expression basale de GST- μ et GST- π

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que l'ion superoxyde ou le radical hydroxyle sont générées à partir de l'action de différentes drogues et des radiations ionisantes sur l'eau. Les ERO, qui induisent la peroxydation des lipides et l'altération de l'ADN sont notamment détoxifiées par les isoenzymes de la famille des glutathion *S*-transférases. Le glutathion et les enzymes qui y sont liées comme la gamma glutamyl cystéine synthase, les glutathion peroxydase / réductase ou les glutathion *S*-transférases sont décrites pour être impliquées dans la modulation de la sensibilité envers les substances génotoxiques telles que les molécules de chimiothérapie et les radiations ionisantes (94, 337, 338). L'augmentation de la détoxification due à la surexpression du système GST/GSH dans les tumeurs, a été reportée comme jouant un rôle dans la chimiorésistance (94). Les GSTs sont une famille de 5 isoenzymes avec des fonctions spécifiques. Les variations d'expression des GSTs peuvent modifier la détoxification des ERO menant à une modulation de la radiosensibilité. Si le phénotype GST- μ nul, particulièrement impliqué dans la carcinogenèse a été découvert (96), une telle déficience n'a jamais été mis en évidence pour le l'isotype π . Malgré plusieurs études concernant la détoxification des drogues et leur résistance, l'implication des GSTs dans la résistance aux radiations ionisantes a été moins étudiée. Malgré tout, les radiations ionisantes sont généralement décrites comme ayant un effet inducteur sur le taux cellulaire de GST (339) ce qui permet la détoxification des ERO.

A notre connaissance, alors que le phénotype nul GST- μ a été largement étudié dans les cancers des VADS (340) et reporté comme étant lié à la carcinogenèse et à la chimiosensibilité tumorale, (96), aucune donnée n'est reportée concernant un lien entre l'expression de l'ARNm de GST- μ et la radiosensibilité. Dans cette étude, l'induction de l'expression de l'ARNm de GST- μ a été observée dans KB^m avec une valeur de RER (1,06) proche de la valeur moyenne déterminée dans les clones (1,2). Malgré tout, dans les clones

cellulaires sélectionnés après irradiation, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les valeurs de RER de l'ARNm de GST- μ et la radiosensibilité.

La grande variabilité d'expression de l'ARNm de GST- π a certainement une influence sur la radiosensibilité des clones, mais aucune corrélation n'a été trouvée entre le niveau d'expression basale de l'ARNm de GST- π et les paramètres radiobiologiques calculés à partir du modèle linéaire et quadratique. Il a été montré que le taux cellulaire de GST- π peut agir comme un modulateur de la radiosensibilité au niveau des dommages sublétaux mais son action ne semble pas être déterminante dans les dommages potentiellement létaux qui déterminent la radiosensibilité (341). Dans le modèle KB, l'ARNm de GST- π semble plus affecté par l'irradiation fractionnée initiale (5x2 Gy) que l'isotype μ . Ces observations sont en accord avec de précédentes données montrant que l'induction de l'ARNm de GST- π dans des lignées cellulaires de cancer analysées après irradiation (339). Néanmoins, d'autres études (342) montrent des résultats différents qui peuvent être expliqués par la différence du type d'analyse (analyses d'activité ou de protéine mais pas de l'ARNm).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les variations de radiosensibilité dont certaines concernent les GSTs (mutation de gènes, stabilisation des ARNm ou expression des protéines) ou implique des mécanismes alternatifs. La régulation transcriptionnelle des GST- μ et π (telle que la stabilisation de l'ARNm) a été décrite comme un facteur potentiel de résistance (343). Les mutations des gènes de GSTs et la modification de leur activité protéique ont été étudiées et il a été montré que cela pouvait moduler l'induction de la carcinogenèse (344) mais aucune relation avec la sensibilité n'a été observée. Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la validité de l'expression des protéines des GSTs, notamment l'isotype π , comme marqueurs de la radio/chimiosensibilité (345). Peu de données sont disponibles dans les modèles des VADS mais l'expression de la protéine GST- π est liée à une faible valeur pronostique (342).

Les voies de détoxification ne sont pas restreintes aux isoenzymes des GSTs. Des études ont montré que la modulation du niveau d'expression de la SOD, qui permet la conversion de l'ion superoxyde en H₂O₂ et O₂, peut altérer la radiosensibilité (336). Le système du glutathion et notamment le taux de GSH a aussi été décrit comme un marqueur potentiel de la résistance (96). Dans les tumeurs du larynx, l'augmentation du taux de GSH a été décrite comme conférant une résistance supplémentaire à la radiothérapie (95).

X.4.2 Cinétique d'expression

X.4.2.1 GST- π

Les cinétiques d'induction ont été réalisées à des doses (2 et 4 Gy) proches de celles utilisées en radiothérapie. Dans KB et KB^{m5}, aucun signal n'est détecté alors que l'évaluation des taux de base permet de mettre en évidence une faible expression. Ceci est probablement dû au changement de PCR car les cinétiques ont été réalisées en PCR « capillaire » qui semble donc moins sensible que la PCR « classique » en tubes à parois fines.

Après l'irradiation à 2 Gy, le clone KB^{m12} montre une surexpression simultanée du transcrite et de la protéine de GST- π entre ½ et 6 heures. La situation est différente lors d'une irradiation à 4 Gy car après une surexpression passagère, une déplétion du taux d'ARNm est observée entre 3 et 6 heures alors que le taux de protéine montre une surexpression pendant 12 heures. Il semble donc que dans ce modèle, l'irradiation induise la transcription de GST- π , la protéine étant alors produite à partir du stock d'ARNm. Celui-ci diminue fortement après une irradiation à 4 Gy car l'expression de la protéine est importante et durable contrairement à une dose de 2 Gy. Cette différence peut être due à une régulation traductionnelle. Sur des fibroblastes murins et des cellules de carcinome de poumon humain, Stammler *et al.* observent une surexpression dose-dépendante de l'ARNm de la GST- π après des irradiations de 5, 10 et 20 Gy (339). Dans une étude similaire, une surexpression radio-induite de GST- π est observée sans qu'une réponse commune entre les lignées ne soit mise en évidence (346).

L'absence d'ARNm explique celle de la protéine dans KB et KB^{m5}. Il est possible que l'irradiation fractionnée initiale de KB (5x2 Gy) ait provoqué une dérégulation du contrôle transcriptionnel (comme une déméthylation de l'ADN, une stabilisation de l'ARNm, une augmentation de l'efficacité de la transcription etc..) du gène de la GST- π dans certains clones cellulaires. Tanita *et al.* rapportent une perte d'expression de la protéine GST- π après une radiothérapie de carcinomes des VADS (342). Ainsi, l'expression de la GST- π contribue certainement à la mise en place de la radiorésistance importante du clone KB^{m12} ($\alpha=0,077$, $\beta=0,055$, $SF_2=0,703$, $MID=3,339$).

Afin d'avoir plus d'informations concernant la détoxification des ERO générées après irradiation, il serait nécessaire de suivre le taux intracellulaire de glutathion également impliqué dans la sensibilité à l'irradiation (95, 96).

L'hétérogénéité clonale de l'expression radio-induite de la GST- π observée ici, montre qu'une irradiation peut provoquer des changements importants d'expression qui contribuent aux variations de sensibilité.

X.4.2.2 *MnSOD*

Les ions superoxyde générés après une irradiation sont détoxifiés par les SOD. Seule la MnSOD, mitochondriale (336, 347), est inductible notamment par les radiations ionisantes.

Le suivi de l'expression de l'ARNm de la MnSOD montre des variations. Après une irradiation de 2 Gy, une diminution du taux d'ARNm est relevée dans KB. Celle-ci est plus faible pour les clones. Une déplétion rapide du taux d'ARNm de la MnSOD est observée entre ½ et 1 heure (voire 3 heures pour KB) après une irradiation de 4 Gy. Le niveau d'ARNm de la MnSOD augmente 3 à 6 heures après une irradiation à 4 Gy, mais pas à 2 Gy. Ces données indiquent probablement que le stock endogène initial d'ARNm de MnSOD est suffisant pour détoxifier les ions superoxyde induits par les faibles doses de radiations (2 Gy) mais pas par une dose plus importante (4 Gy) provoquant l'induction d'ARNm de la MnSOD.

Yanagisawa *et al.* ont suivi la quantité de MnSOD après des irradiations de 10 et 20 Gy dans des cellules KB (348). Ils ont observé une déplétion initiale à 3 heures suivie d'une augmentation du taux à partir de 12 heures. Les résultats obtenus ici au niveau transcriptionnel vont dans le même sens puisqu'une déplétion en ARNm d'intensité équivalente est observée en réponse aux irradiations. Toutefois, dans notre modèle, l'expression protéique n'est pas comparable. En effet, alors que dans KB^{m5} la protéine MnSOD est exprimée de façon stable, quelle que soit la dose et le temps, celle-ci n'est pas mise en évidence dans KB^{m12}. Dans KB, l'irradiation de 2 Gy provoque une accumulation de la protéine à partir de 3 heures mais le profil diffère lors d'une exposition à 4 Gy puisqu'une surexpression est détectée après ½-1 heure et à 6 heures. Aucune relation n'est donc mise en évidence entre l'expression du transcrite et de la protéine ce qui suppose que des mécanismes de régulation sont présents au niveau post transcriptionnel et traductionnel notamment pour KB^{m12} dont l'expression protéique est totalement réprimée.

Dans des cellules résistantes issues de KB, Yanagisawa *et al.* observent une réponse différente de celle de KB puisque seule une augmentation dose-dépendante de MnSOD est mise en

évidence (348). La diversité de la réponse fait donc penser à celle observée avec notre modèle KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} qui en dérivent.

Une étude récente met en évidence le rôle que pourrait jouer la MnSOD dans la régulation de l'apoptose (158). Il semble que celle-ci régule négativement l'apoptose par des mécanismes mal identifiés mais probablement en relation avec la libération de cytochrome c par les mitochondries ce qui induit le clivage des caspases. Les résultats présentés pour les clones vont dans ce sens puisque KB^{m5}, qui exprime la MnSOD à un niveau basal, montre un taux d'apoptose inférieur à celui de KB^{m12} dont la protéine n'est pas détectable.

Afin de compléter l'étude de l'implication de la MnSOD dans la radiosensibilité, il serait nécessaire d'étudier la catalase et la glutathion peroxydase. En effet ces deux enzymes prennent le relai des SOD en produisant de l'O₂ et du H₂O à partir du H₂O₂. Il a été supposé que la diminution de leur expression ou activité enzymatique pouvait provoquer une accumulation d'H₂O₂, toxique à long terme pour les cellules (336). Ce phénomène peut d'ailleurs être renforcé par une surexpression importante de la MnSOD qui produit alors trop de H₂O₂, celui-ci provoquant la formation de radicaux hydroxyles toxiques pour les cellules (349). Ces effets contraires de la MnSOD selon le taux d'expression sont à la base de la thérapie génique proposée par Urano *et al.* (103).

X.4.2.3 MT2A

L'effet des radiations ionisantes sur l'expression des métallothionéines a été peu étudié. A notre connaissance, aucune étude n'a d'ailleurs suivi, simultanément, la cinétique d'expression de l'ARNm et de la protéine MT2A en réponse à une irradiation modérée sur une lignée cellulaire humaine de carcinome des VADS.

Les cinétiques d'expression de l'ARNm de la MT2A observées dans KB et les clones en réponse aux doses de 2 et 4 Gy sont difficiles à interpréter. En effet, KB montre une surexpression majeure et durable 12 heures après une irradiation de 2 Gy alors qu'en réponse à une dose de 4 Gy, la surexpression est plus rapide mais plus faible. Mais le clone KB^{m5} montre une situation inverse car l'induction est plus rapide après une irradiation à 4 Gy qu'à 2 Gy. KB^{m12} ne montre aucune variation d'expression lors d'une irradiation à 4 Gy, alors qu'une induction passagère est observée lors d'une irradiation à 2 Gy. Certains auteurs ont également observé un comportement variable selon les lignées et les doses employées (350).

Les inductions d'ARNm de MT2A observées pour KB et les clones sont similaires et ne dépendent pas de la dose de radiations. Ceci suppose que le taux d'induction de la MT2A n'est pas proportionnel à la dose d'irradiation. Les cellules réagissent en induisant l'expression de l'ARNm à des temps différents selon la dose.

Les profils d'expression des protéines MT2A ne correspondent pas à ceux des ARNm. Ainsi dans KB, la protéine est sous-exprimée entre 1 et 3 heures après l'irradiation à 2 Gy puis suivie d'une surexpression durable à partir de 6 heures. Après une dose de 4 Gy, une sous-expression durable est observée. Dans KB^{m5}, la stabilité de l'expression de la protéine ne reflète pas les variations du taux d'ARNm. Dans KB^{m12}, la protéine MT2A n'est presque pas mise en évidence, alors qu'une surexpression de l'ARNm est observée après une irradiation à 2 Gy. Ce manque de concordance entre l'expression de la protéine et celle de son ARNm implique la présence d'une régulation post-transcriptionnelle (stabilisation de l'ARNm) et/ou traductionnelle. Toutefois, il a été montré que ces phénomènes sont minoritaires et que l'expression de la MT2A est principalement régulée au niveau transcriptionnel (105, 106).

Avec une irradiation UV, Hansen *et al.* ont montré que le promoteur des MT avait une réponse biphasique constituée d'une déplétion rapide de 0,5 fois du gène rapporteur suivi d'une induction d'environ 2,5 fois après 4 heures (351). Ces taux sont similaires à ceux observés dans nos lignées bien que l'induction due aux rayons gamma soit moins efficace que les UV (350). Des études *in vivo* chez le rat ont rapporté que les pics d'ARNm de MT2A se situent généralement 9 heures après une dose unique de 20 Gy alors que l'induction maximale de la protéine se produit à 72 heures (352, 353). Toutefois, chez la souris, Koropatnick *et al.* détectent l'expression simultanée du transcrite et de la protéine, 9 heures après irradiation (354). D'autres études employant des doses uniques plus faibles (2-10 Gy), n'ont pas permis de mettre en évidence d'induction d'ARNm de la MT2A ni de la protéine (350, 354, 355).

L'expression de l'ARNm et de la protéine de la MT2A ne montre pas de relation avec la radiosensibilité de la lignée et des clones étudiés. L'hétérogénéité de la réponse des MT aux radiations ionisantes est connue entre les espèces et les organes (352-354, 356-359). L'analyse des clones issus de KB permet de montrer que cette hétérogénéité est également présente au niveau cellulaire car aucune réponse uniforme n'est observée, et chaque clone cellulaire exprime une réponse qui lui est propre.

RESUME

Au niveau basal, les clones montrent peu de variations d'expression du taux d'ARNm de GST- μ par rapport à la lignée mère KB. A l'inverse, GST- π présente d'importantes différences d'expression. Dans les deux cas, elles ne sont pas corrélées à la radiosensibilité ce qui indique que d'autres facteurs, liés ou non aux processus de détoxification, déterminent cette sensibilité.

L'expression de GST- π , MnSOD et MT2A a été suivie (ARNm et protéine) pendant 48 heures après irradiation à 2 et 4 Gy dans KB, KB^{m5} et KB^{m12}.

- GST- π (ARNm/protéine) n'est clairement mis en évidence que dans le clone KB^{m12} dont les différences d'induction, selon la dose, indiquent la présence d'une régulation traductionnelle. La répression transcriptionnelle (pas d'ARNm), observée dans KB et KB^{m5} explique l'absence de protéine. Ces résultats supposent que l'irradiation initiale de KB a modifié le contrôle transcriptionnel.
- Les variations d'expression de MnSOD en réponse aux irradiations supposent que le stock endogène initial d'ARNm est suffisant pour détoxifier les ions superoxyde induits par une dose de 2 Gy mais pas par une plus importante de 4 Gy, ce qui cause l'induction d'ARNm de la MnSOD. L'expression protéique ne suit pas les mêmes profils indiquant la présence d'une régulation post transcriptionnelle et/ou traductionnelle (ainsi KB^{m12} est totalement réprimée).
- Les expressions transcriptionnelles et protéiques radio-induites de la MT2A ne montrent pas de liens entre elles. Le taux d'induction ne semble pas dose-dépendant. Ceci confirme le comportement hétérogène, déjà observé, de la réponse des MT aux radiations ionisantes.

La réponse des gènes GST- π , MnSOD et MT2A aux radiations ionisantes ne montre pas de liaison avec la radiosensibilité. Il est donc nécessaire d'analyser d'autres marqueurs de la détoxification.

Chapitre XI

Réalisation d'un système d'analyse automatique des sphéroïdes.

Aide à l'innovation ANVAR n° A9807066L/AT

Brevet Français n° 99 02349

XI Réalisation d'un système d'analyse automatique des sphéroïdes.

XI.1 Objectifs

L'étude de l'implication de plusieurs paramètres et de l'hétérogénéité cellulaire dans la sensibilité aux radiations ionisantes ont été réalisées sur des cultures cellulaires en monocouche. Ce type de culture présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre tant au niveau de la culture qu'à celui de l'analyse. Mais il ne prend pas en compte la structure tridimensionnelle pourtant essentielle à la réponse cellulaire et tumorale (160, 215).

Il a été montré que le modèle du sphéroïde tumoral multicellulaire permet de mimer le comportement des micro-tumeurs *in vivo* notamment lors d'irradiations (164, 360). L'utilisation de ce type de culture cellulaire en 3 dimensions permet donc d'affiner l'analyse de la sensibilité aux radiations ionisantes.

Malgré l'intérêt et la puissance de ce modèle, un obstacle majeur limite son développement. En effet, l'analyse de la réponse d'une population de sphéroïdes à un traitement est fastidieuse. Il s'agit non seulement de dénombrer quotidiennement les sphéroïdes survivants aux différentes doses du traitement mais également de mesurer le diamètre moyen de chacun d'entre eux. Afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, il est nécessaire d'employer plusieurs dizaines de sphéroïdes par point expérimental et bien entendu, de répéter les expériences au moins trois fois.

Quant à la culture, bien qu'assez simple, elle reste plus compliquée qu'en monocouche (changements fréquents de milieu, filtrations, isolements).

Ces facteurs de culture et surtout d'analyse rendent l'utilisation des sphéroïdes relativement délicate. Des systèmes d'analyse d'image peuvent être utilisés pour semi-automatiser l'analyse mais aucun système actuellement présent sur le marché n'est adapté au dénombrement, à la mesure et au suivi de culture de sphéroïdes. De plus, aucun de ces systèmes ne présente d'automatisation nécessaire au traitement d'échantillons en nombre important.

Cette situation nous a amené à développer un système complet de gestion et d'analyse des sphéroïdes. Celui-ci doit permettre la réutilisation des échantillons, l'analyse doit donc d'être réalisée en conditions stériles et non destructrices. Le procédé est basé sur un automate passeur d'échantillons qui procède au déplacement de boîtes de culture contenant les sphéroïdes. Une caméra assure les prises de vue qu'un logiciel se charge d'analyser. Les résultats sont alors affichés sous forme de tableaux (et d'histogrammes).

L'ensemble du projet a fait l'objet de deux aides à l'innovation accordées par l'ANVAR (Agence Nationale pour la Valorisation de la Recherche). L'antériorité et la protection du projet ont été assurés par le dépôt d'une enveloppe Soleau à l'INPI (Institut National de la Propriété Industrielle) puis d'un brevet N° 99 02349. Le système est actuellement en phase de développement industriel. Aucune publication n'a encore pu être réalisée sur ce chapitre pour des raisons de confidentialité.

XI.2 Logiciel

XI.2.1 Configuration du logiciel

L'interface est composée d'une première fenêtre où se déroule les acquisitions et les traitements d'image, d'une seconde affichant les résultats et d'une troisième proposant une représentation graphique sous forme d'histogrammes.

Avant de procéder au comptage des sphéroïdes, il est nécessaire de configurer le logiciel. Tous les réglages sont sauvegardés évitant ainsi la reconfiguration complète à chaque utilisation. Toutefois, il est recommandé d'effectuer la calibration avant chaque utilisation notamment pour prendre en compte les variations d'intensité lumineuse.

Quatre caméras peuvent être connectées et gérées par le logiciel. Un commentaire particulier ainsi qu'un coefficient de calibration (renvoyé par la fonction de calibration) sont affectés à chaque caméra.

Le réglage de la caméra choisie est réalisé par l'intermédiaire d'une fonction qui lui est dédiée. Elle affiche une image « Live » permettant la mise au point de la caméra et le réglage de la luminosité.

Le grossissement adopté lors du comptage avec un microscope est alors sélectionné. Par défaut, il existe les grossissements 4x, 10x, 20x, 40x et « autre » permettant de saisir son propre grossissement. Ce paramètre intervient dans le calcul du coefficient de calibration de la caméra.

Il est possible de filtrer les valeurs obtenues à l'aide de 2 fonctions. Le seuillage de taille élimine du tableau de résultats les objets dont la taille est inférieure au seuil sélectionné. Par exemple, si un diamètre seuil de 20 μm est entré, tous les objets dont le diamètre est inférieur à 20 μm ne seront pas pris en compte dans les résultats (bien qu'ils soient repérés puis comptés). Ceci permet de ne pas prendre en compte les débris cellulaires, cellules isolées, petits sphéroïdes etc... Un second filtre dit de forme est disponible. Lorsqu'il est appliqué, seuls les objets « suffisamment ronds » sont pris en compte. Le logiciel détermine la surface et le diamètre des objets trouvés et calcule leur rotondité en effectuant le rapport de la surface sur le périmètre. Moins l'objet est rond, plus le chiffre s'éloigne de 1 (valeur pour un cercle parfait). L'utilisateur entre donc l'écart qu'il estime pouvoir accepter lors de son comptage. Exemple: si la valeur entrée est de : 0,5, l'ordinateur ne conservera que les objets dont la rotondité est comprise entre 0,5 (1-0,5) et 1,5 (1+0,5).

Un histogramme permet de visualiser en temps réel la distribution de la population analysée. Il est réajustable à tout moment permettant ainsi de ne cibler qu'une population d'objets. L'axe des ordonnées est réajusté automatiquement en fonction du nombre d'objets comptés.

Il est possible d'activer un traitement spécial de l'image qui permet de séparer des objets accolés puis de les reconstruire virtuellement.

Lorsque ces paramètres sont configurés, la calibration est réalisée. Elle permet d'établir une relation entre le nombre de pixels comptés et le diamètre réel de l'objet. Pour cela, trois calibres de taille différentes (exemple: 200, 400, 600 μm) sont analysés à trois reprises. La droite de régression est alors calculée et la pente (donc le coefficient multiplicatif entre le nombre de pixels et le diamètre réel de l'objet) est automatiquement affichée dans la zone « coefficient » de la caméra choisie. Ce coefficient est affecté par la quantité de lumière, il semble donc nécessaire de calibrer le logiciel à chaque utilisation.

XI.2.2 Analyse d'image

L'analyse de l'image se déroule en plusieurs étapes pour aboutir à un tableau de résultats exploitable sur un tableur. Le processus d'analyse est résumé à la Figure 57.

XI.2.2.1 Acquisition

L'acquisition d'une image se fait via la bibliothèque MIL (Matrox Imaging Library). L'image est alors convertie afin de ne pas dépendre d'une API (Application Programming Interface) propriétaire et donc d'améliorer l'évolutivité et la conversion du logiciel sur d'autres plateformes. L'acquisition peut être simple ce qui permet de réaliser des acquisitions à la volée, ou en série pour réaliser des acquisitions successives associées à un commentaire choisi parmi dix stockés en mémoire.

XI.2.2.2 Binarisation

C'est la conversion en noir et blanc de l'image saisie en niveaux de gris. Ceci implique de trouver automatiquement le seuil de binarisation optimal.

Il s'effectue en lissant l'histogramme de répartition des valeurs de gris de l'image afin d'identifier les deux pics de niveaux de gris. Le premier maximum correspond aux valeurs « sombres » donc les pixels constituant le fond, le second pic est constitué des pixels des sphéroïdes donc « clairs ». Le seuil est choisi comme étant le minimum entre ces deux pics. C'est à dire que les valeurs de niveaux de gris inférieures à ce niveau prendront la valeur 0 (noir), les valeurs supérieures prendront la valeur 1 (blanc). L'image est alors uniquement constituée de pixels noirs (=0) et blancs (=1).

XI.2.2.3 Extraction simple

L'image sur laquelle le logiciel travaille n'est pas débruitée par des filtres d'érosion/dilatation afin de ne pas altérer l'image.

L'image est parcourue de manière à repérer les pixels blancs. Pour cela, chaque pixel est analysé successivement. Lorsqu'un pixel blanc (donc un éventuel sphéroïde) est repéré, il est placé dans une matrice de stockage avec les pixels adjacents de même couleur. L'image est

donc décomposée en une succession de sous-images contenant chacune un objet qui sera traité de façon à déterminer sa surface et son périmètre.

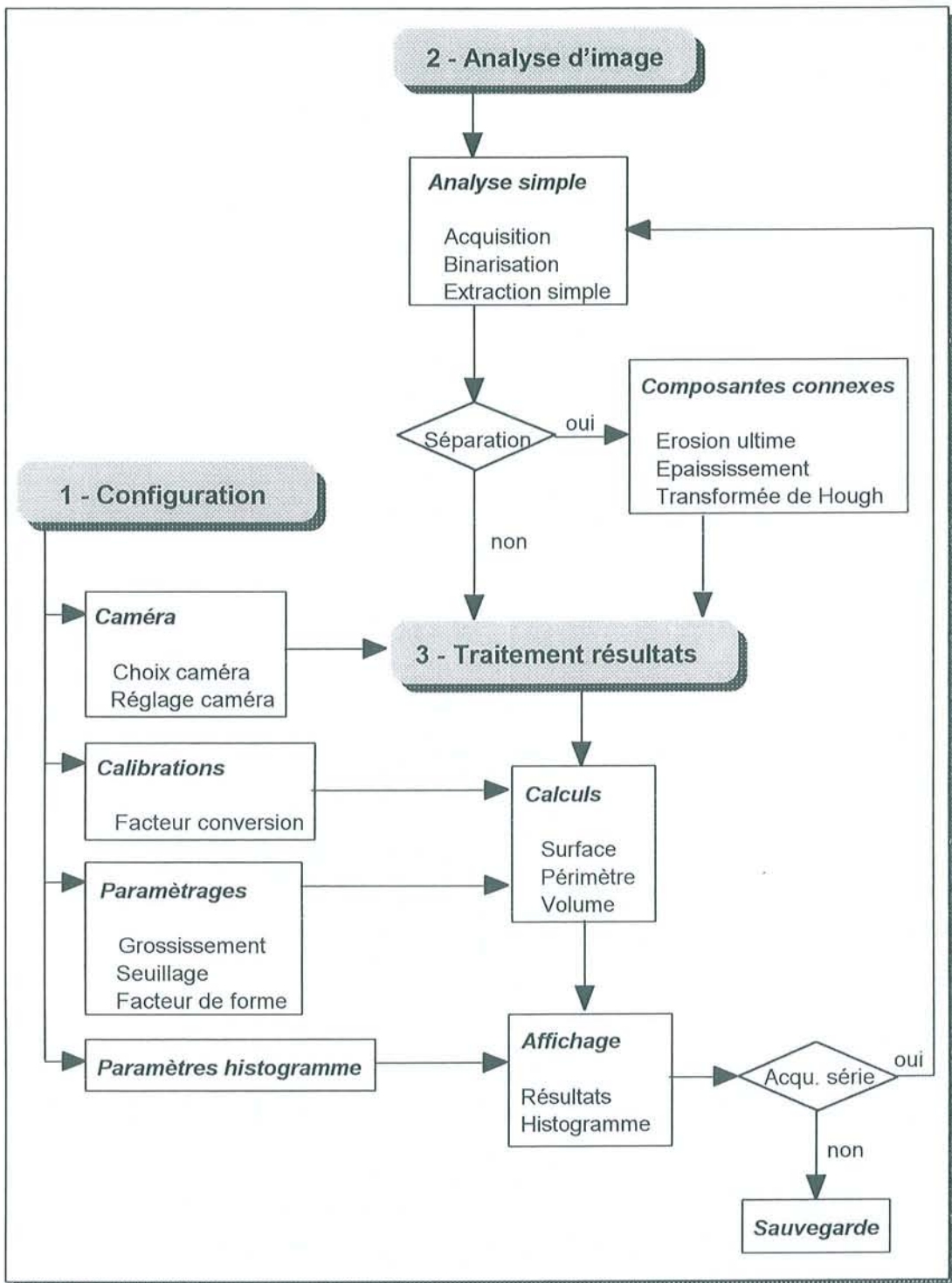


Figure 57 : Organigramme fonctionnel du logiciel d'analyse d'image.

XI.2.2.4 Extraction des composantes connexes (si activé)

Il est possible d'activer cette fonction permettant de séparer les objets accolés. En contrepartie d'une meilleure précision dans les comptages, le temps de calcul se trouve allongé. Le traitement de l'image est divisé en 4 parties.

XI.2.2.4.1 Extraction

Le traitement de l'image commence par une extraction simple retournant un ensemble de sous-images à traiter (voir ci-dessus).

XI.2.2.4.2 Erosion ultime

L'érosion n'est pas utilisée ici dans le but d'éliminer le bruit de fond mais pour déterminer le nombre d'objets composant la sous-image.

L'image est parcourue et le voisinage de chaque pixel est analysé, s'il a un voisin noir, il devient noir ; s'il n'a que des voisins blancs, il conserve sa valeur d'origine (noir=0, blanc=1). Mathématiquement, il s'agit d'un « ET logique ». L'opération est répétée n fois jusqu'à la disparition des composantes (on a alors une image noire). Le logiciel travaille sur la sous image n-1 et compte le nombre de pixels isolés restant ce qui indique le nombre initial d'objets connexes.

Les sous-images comportant un seul objet ne sont pas traitées et l'image d'origine est utilisée pour réaliser l'extraction. Seules les sous-images présentant des composantes connexes sont traitées ceci afin d'alléger le traitement de l'image.

XI.2.2.4.3 Epaisseur

Une dilatation est l'opération inverse de l'érosion et fonctionne selon le principe suivant : si un pixel a un voisin blanc, il devient blanc. S'il ne possède que des voisins noirs, il est conservé dans sa couleur d'origine. Mathématiquement, il s'agit d'un « OU logique ». L'épaississement permet en plus de dilater les composantes sans que les bords entrent de nouveau en contact grâce à un algorithme de détection de collisions.

Les sous-images sélectionnées sont épaissies n-1 fois ce qui permet de retrouver l'image initiale avec des objets non accolés (contrairement à une dilatation).

XI.2.2.4.4 Transformée de Hough

Cet ensemble de traitements et fonctions permet de « reconstruire virtuellement » la partie manquante du sphéroïde afin de déterminer les caractéristiques géométriques des objets extraits.

La sous-image est parcourue, comme lors d'une extraction simple, pour en extraire les objets désormais séparés.

Le logiciel procède alors à un « vote pour le centre ». Pour chacun des pixels constituant le pourtour de l'objet, la tangente est calculée par la méthode des moindres carrés. Celle-ci permet de trouver la droite perpendiculaire à la tangente passant par le pixel concerné. L'opération est répétée pour tous les points du pourtour de l'objet. L'ensemble des droites tracées permet d'identifier un ensemble de points dans la zone centrale de l'objet où la majorité des droites passent. Chacun des points identifiés peut prétendre être le centre.

Plusieurs centres par objet sont alors disponibles. Le meilleur rayon pour chacun des centres est recherché et seul le meilleur est retenu.

Le rayon étant disponible, il est simple de calculer le diamètre, la surface, le périmètre et le volume estimé de chacune des composantes considérées.

XI.2.2.5 Résultats

La surface réelle (extraction simple) ou calculée (reconstruction par extraction des composantes connexes) en pixels de chaque objet est converti en μm . A partir de la surface, le diamètre, le périmètre et le volume sont calculés e assumant une géométrie sphérique parfaite. Les résultats sont alors affichés dans un tableau.

XI.2.3 Divers

Un fichier d'aide, disponible en ligne, a été écrit afin d'éviter le recours à un manuel. L'impression des résultats est possible ainsi que la configuration de l'impression. La sauvegarde des tableaux de résultats s'effectue sur la totalité des données ou seulement sur les données utiles pour les sphéroïdes ou les essais clonogéniques ceci dans un souci de simplification des résultats et d'économie de place.

XI.3 Automate

Un prototype dit « de paille » a été réalisé pour démontrer la faisabilité du système. Sa conception s'est inspirée d'un passeur d'échantillons développé en 1986 par la société Ingelcor. Ce prototype, représenté Figure 58 et Figure 59, a également permis d'affiner le concept même du procédé. L'automate décrit ci-dessous est le projet de prototype actuellement en cours de développement en collaboration industrielle.

L'automate assure le passage des boîtes de culture de type P6 à P96 (6 puits à 96 puits) contenant les sphéroïdes devant une caméra. Un support monté sur 2 rails de guidage et se déplaçant selon un axe X, vient chercher la boîte inférieure. Les boîtes de culture doivent impérativement rester stériles donc fermées car les sphéroïdes sont remis en culture. La boîte est alors placée sous la caméra qui se déplace sur un axe Y. La combinaison des 2 mouvements permet de réaliser un balayage complet de chacun des puits composant la boîte (donc entre 6 et 96 puits/boîte).

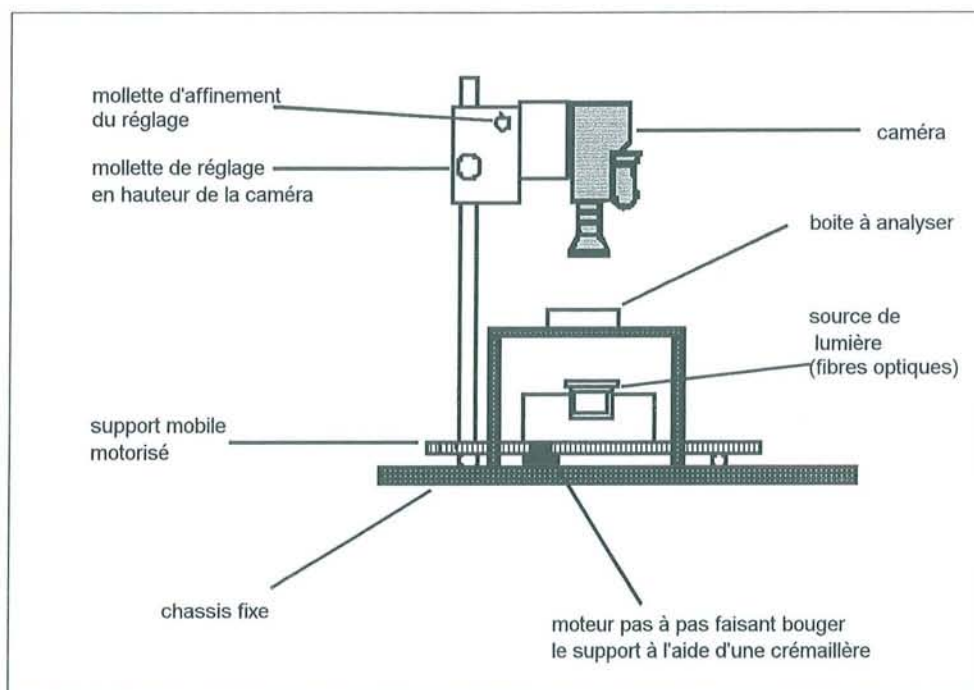


Figure 58 : Schéma vu de profil du prototype du compteur de sphéroïdes.

Le grossissement optique est calculé en fonction de la précision nécessaire ainsi que de celle du capteur (nombre de pixel). La précision du comptage doit être inférieure à 5 μm afin qu'elle soit comparable à celle obtenue lors d'un comptage « manuel ». Il en résulte que le nombre de prise de vue par puits dépend certes du grossissement nécessaire pour atteindre cette précision de 5 μm mais également de la surface du puits (donc du type de boîte) et de la qualité du capteur. Les déplacements en X/Y, pilotés par le PC, sont également assujettis aux paramètres précédents. L'utilisation de moteurs pas à pas est rendue nécessaire par la précision des déplacements qui doivent être doux afin d'éviter des mouvements de liquide trop importants et préjudiciables à la qualité du comptage.

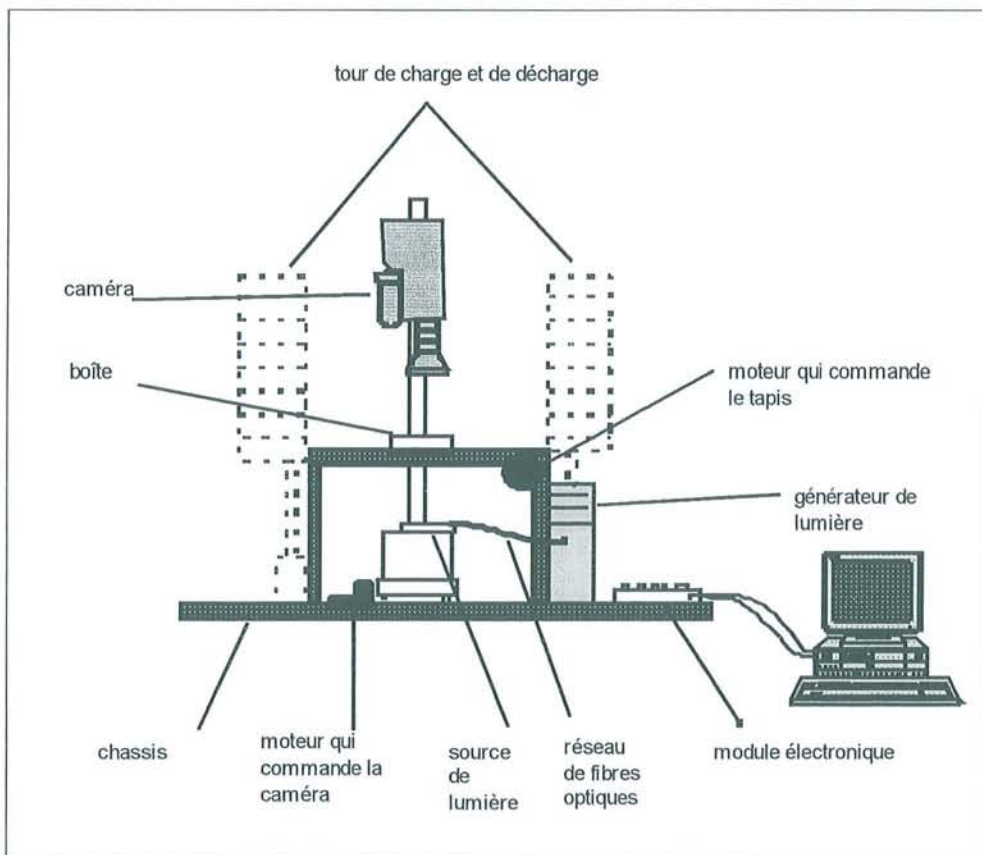


Figure 59: Schéma vu de face du prototype du compteur de sphéroïdes.

L'un des points les plus importants pour le comptage concerne la qualité de l'image acquise qui doit être très fortement contrastée. Les sphéroïdes doivent apparaître blancs sur fond noir ou l'inverse. Les nuances de gris sont à éviter autant que possible. Ceci permet d'améliorer la

qualité de la binarisation. Ces conditions de prise de vue sont obtenues avec un éclairage annulaire à fibre optique sur fond noir. La stabilité de l'intensité lumineuse est contrôlée afin que les mesures soient reproductibles d'un comptage à l'autre. De plus, un traitement informatique égalise l'histogramme de répartition des niveaux de gris composant l'arrière plan ce qui permet d'améliorer la binarisation notamment sur des images acquises au bord des puits où les réflexions lumineuses sont importantes.

Lorsque la totalité des puits est analysée, la boîte est stockée dans une tour de déchargement. Bien que le système ne soit pas encore implémenté, il est prévu d'identifier les boîtes contenant les sphéroïdes à l'aide de codes barre.

Le système global est piloté à partir du logiciel de la manière la plus complète possible (mise en fonction, calibration, réglages caméra, type de boîtes etc...) ceci dans un souci de simplification.

XI.4 Validation

XI.4.1 Principes

La lignée KB utilisée lors de la première partie de ce travail forme des agrégats mais pas de sphéroïdes complets. Les sphéroïdes utilisés pour la validation du système ont donc été formés à partir de la lignée FaDu. En effet, cette lignée s'agrège rapidement et les sphéroïdes formés ont une croissance régulière lorsque le milieu de culture est renouvelé fréquemment.

Le logiciel seul a été testé ce qui signifie que lors des tests, l'automate n'a pas été utilisé. La caméra a donc été montée sur un microscope inversé Olympus et reliée à une carte d'acquisition Matrox Météor pour permettre la prise d'images et leur analyse par le logiciel.

La validation du logiciel repose sur plusieurs points. Elle consiste d'abord à observer la répétabilité des mesures effectuées par le logiciel grâce à 3 mesures successives d'une même image. Puis l'erreur de comptage est estimée par rapport à un comptage « oculaire » à l'aide d'un microscope inversé. Ceci permet de corrélérer la répétabilité, l'erreur et le diamètre des sphéroïdes sur les deux séries indépendantes de mesures réalisées.

XI.4.2 Résultats

Le suivi de la croissance des sphéroïdes s'est déroulé pour les 2 expériences respectivement sur 10 et 15 jours et ont permis de réaliser 5 et 7 comptages. Le nombre total de sphéroïdes, comptés en triplicate, est de 335.

La répétabilité mesurée pour chaque sphéroïde lors des 3 comptages montre un écart-type qui varie de 0,010 à 1,050. La moyenne de l'écart-type est de $0,268 \pm 0,185$ ce qui indique que le comptage réalisé par le logiciel est stable. Ces faibles erreurs de répétabilité sont certainement dues aux variations lumineuses. En effet le logiciel est testé à l'aide d'une caméra montée sur un microscope dont la lumière ne présente pas une stabilité absolue. Le prototype final devra donc tenir compte de cet aspect.

Sur les deux expériences, l'erreur moyenne de comptage qu'effectue le logiciel par rapport à l'utilisateur est de -0,9 % avec des extrêmes allant de -15,4 % à +11,5 %. Il faut noter que la précision des mesures réalisées par l'expérimentateur est de $\pm 12,5 \mu\text{m}$ (limité par le grossissement et la précision de l'oculaire réticulé). De plus, le diamètre moyen du sphéroïde déterminé par l'utilisateur est la moyenne du plus petit et du plus grand diamètre. Ce résultat, proche de zéro, n'est pas représentatif des variations observées quotidiennement. Ceci indique toutefois que les diamètres déterminés par le manipulateur et par le logiciel sont équivalents à 0,9 % près en moyenne.

Une excellente corrélation est mise en évidence entre les diamètres déterminés par l'expérimentateur et l'utilisateur ($y = 0,986 x + 6,634$ et $r^2 = 0,998$). L'ordonnée à l'origine qui vaut $6,634 \mu\text{m}$ représente l'erreur systématique moyenne réalisée par le logiciel lors d'un comptage. La pente de 0,986 indique que le logiciel tend à mesurer une valeur très légèrement plus faible que l'expérimentateur. Toutefois ces valeurs restent proches de 0 et de 1 ce qui indique une très forte corrélation entre les deux types de comptages. Ces résultats confirment également le faible pourcentage d'erreur moyen de -0,9 %.

Les corrélations sont réalisées entre le diamètre des sphéroïdes, les écarts-type et les erreurs de comptage. Aucune relation n'est mise en évidence entre l'erreur de comptage et la répétabilité des mesures ($y = -0,362 x - 0,772$ et $r^2 = 3,984 \cdot 10^{-4}$) ce qui indique que l'erreur réalisée par le compteur par rapport à l'expérimentateur ne dépend pas de la précision du comptage automatique. De la même façon, aucune relation n'est observée entre l'écart-type et

le diamètre déterminé par le compteur ($y = 9,222 \cdot 10^{-5} * x + 0,231$ et $r^2 = 0,01$) ce qui montre que la précision des mesures du compteur ne dépend pas de la valeur du diamètre. Le même fait est observé lorsque le pourcentage d'erreur est comparé au diamètre déterminé par le compteur ($y = 5,44 \cdot 10^{-3} * x - 3,076$ et $r^2 = 0,109$). Toutefois la répartition des points montre que les erreurs sont plus importantes lorsque le diamètre des sphéroïdes est inférieur à 200 μm .

Cette observation nous a amené à séparer les sphéroïdes en deux classes selon que leur diamètre est supérieur ou inférieur à 200 μm . Il apparaît alors que la corrélation entre les deux types de comptages (automatique et oculaire) reste inchangée lorsque le diamètre des sphéroïdes est supérieur à 200 μm ($y = 0,987 * x + 6,036$ et $r^2 = 0,997$). Dans le cas contraire, les valeurs sont plus dispersées et la corrélation qui en découle est moins satisfaisante ($y = 0,957 * x + 11,146$ et $r^2 = 0,963$). De plus l'erreur systématique (l'ordonnée à l'origine) est deux fois plus importante. Ces données indiquent donc que l'erreur de comptage est relativement plus prononcée lorsque les sphéroïdes ont un diamètre inférieur à 200 μm . La bonne répétabilité des mesures du logiciel montre que celui-ci n'est pas en cause. Aucune différence significative ($P=0,4358$) n'est d'ailleurs mise en évidence lors de la comparaison des écart-types des deux groupes. A l'inverse, la comparaison des pourcentages d'erreur des mesures fait apparaître une différence très significative ($P<0,0001$) entre les deux groupes. Ceci signifie qu'une erreur est réalisée par l'expérimentateur lorsque le diamètre des sphéroïdes est inférieur à 200 μm . Il s'agit en fait d'une approximation due au grossissement et à la précision de l'oculaire réticulé du microscope qui impose une limite à $\pm 12,5 \mu\text{m}$ lors du comptage. Les régressions analysées précédemment sur la totalité des sphéroïdes restent valables lorsque le diamètre des sphéroïdes est supérieur à 200 μm .

Les histogrammes de distribution des sphéroïdes montrent qu'il est possible de suivre l'évolution d'une population importante de sphéroïdes cultivés en spinner sous agitation.

XI.4.3 Conclusion

Les tests de validation du logiciel d'analyse des sphéroïdes montrent que celui-ci permet de réaliser le dénombrement et la mesure des sphéroïdes de manière stable et avec une faible erreur comparé à l'expérimentateur. De plus, ce système se révèle plus précis que l'œil lorsque le diamètre des sphéroïdes est inférieur à 200 μm . Toutefois la limite inférieure de

précision du compteur, qui dépend principalement de la qualité et des performances du capteur et de la lumière, reste à déterminer.

Le gain de temps est difficile à estimer car un comptage oculaire s'effectue habituellement sur des sphéroïdes préalablement isolés en boîtes 24 puits alors qu'ici les sphéroïdes sont simplement prélevés du spinner et placés dans des boîtes de Pétri. Toutefois des expériences supplémentaires avec des sphéroïdes placés en boîte 24 puits font apparaître un gain de temps de 4 à 5 fois. En fait, lorsque les sphéroïdes sont placés en boîte de Pétri pour être comptés, la prise d'image peut comporter plusieurs sphéroïdes ce qui diminue d'autant le temps total d'analyse.

Ce compteur de sphéroïdes se révèle donc être, pour son aspect analytique tout du moins, un outil performant permettant une réelle simplification de l'analyse des sphéroïdes quelle que soit la méthode de culture employée.

RESUME

Malgré l'intérêt du modèle sphéroïde, celui-ci reste peu utilisé de par les difficultés techniques de culture et surtout d'analyse. Un compteur-analyseur de sphéroïdes, a donc été développé.

Son utilisation nécessite au préalable la calibration du système et le réglage des paramètres de comptage (grossissement, seuil, rotondité) et d'affichage. L'analyse d'image se déroule selon la séquence : acquisition, binarisation (par seuillage automatique), extraction simple, traitement des résultats par calculs de surface-périmètre-volume, affichage, sauvegarde. Une extraction des composantes connexes peut éventuellement être réalisée lorsque les sphéroïdes sont accolés. L'automate, piloté par un PC, assure le double déplacement de la caméra et des boîtes de culture (6-96 puits) contenant les sphéroïdes selon des axes perpendiculaires. L'éclairage uniforme est assuré par une fibre optique circulaire.

La validation montre la stabilité des comptages ainsi que de très faibles erreurs de mesure notamment lorsque le diamètre des sphéroïdes est inférieur à 200 μm . Ce système devrait permettre l'essor des sphéroïdes en oncologie préclinique.

Conclusion générale et perspectives

Le traitement des cancers des voies aéro-digestives supérieures est principalement basé sur la radiothérapie seule ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie. Un taux de récurrences de 15 à 20 % est observé dans les 2 à 3 ans qui suivent le traitement. Ces tumeurs sont généralement résistantes aux traitements basés sur l'utilisation de radiations ionisantes.

Afin d'étudier le problème de la résistance aux radiations ionisantes dans les cancers épidermoïdes des VADS, plusieurs facteurs ont été étudiés.

La première étape du travail a consisté à créer un modèle cellulaire de résistance aux radiations. L'irradiation fractionnée de la lignée KB a permis d'isoler une fraction survivante KB^m et d'isoler 13 clones. Leur caractérisation a permis de mettre en évidence une radiosensibilisation variable reflétant l'hétérogénéité cellulaire. Les fractions survivantes obtenues après irradiation d'une autre lignée, FaDu, ne montrent pas d'augmentation de la résistance. C'est pourquoi cette lignée n'a pas été étudiée plus précisément.

Les caractéristiques radiobiologiques de ces clones ont été analysés (durée de phase S, temps potentiel de doublement, labelling index et temps de doublement) et corrélés aux paramètres de radiosensibilité déterminés d'après le modèle linéaire-quadratique. L'absence de corrélation indique une indépendance de la radiosensibilité par rapport à la prolifération cellulaire.

Aucune accumulation de la protéine p53 n'est observée après irradiation. Le caractère sauvage du gène p53 suggère donc la présence d'une répression post-transcriptionnelle ou traductionnelle inhabituelle. De plus, en réponse à des irradiations de 2 ou 4 Gy, communément utilisées en radiothérapie, les clones montrent des arrêts du cycle cellulaire en phase G₂/M mais pas à la transition G₁/S. Ceci confirme le rôle déterminant de la protéine p53 dans l'arrêt radio-induit en G₁/S.

Le suivi à long terme de la mort cellulaire radio-induite indique l'absence de mort nécrotique aux faibles doses utilisées mais la présence d'une apoptose tardive et modérée comparable à celle relevée dans la littérature. Les taux d'apoptose observés ne permettent toutefois pas d'établir de lien avec la radiosensibilité.

Des gènes de détoxification, connus pour être impliqués dans les variations de radiorésistance, tels que les glutathion S-transférases π et μ , la superoxyde dismutase et la métallothionéine

2A ont été suivi au niveau de l'expression de l'ARNm et des protéines. Bien que d'importantes différences d'expression avant et après irradiation aient été mises en évidence entre les clones, aucune corrélation n'est observée. La détoxification des espèces réactives de l'oxygène générées par les irradiations ne semble donc pas être le facteur déterminant des variations de radiosensibilité des clones issus de KB.

Ces résultats amènent plusieurs perspectives de travail au niveau de l'induction d'apoptose et de la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Il semble établi que l'apoptose radio-induite de ce modèle est indépendante de p53 de plus l'hypothèse a été émise que cette induction tardive serait liée à l'activation p53-indépendante de la céramide synthase en réponse à l'augmentation du nombre de lésions de l'ADN non réparées. Il semble donc intéressant d'évaluer plus finement l'induction d'apoptose. Ainsi, l'ajout de céramides exogènes devrait nous renseigner sur la capacité de KB et des clones à entrer en apoptose par l'intermédiaire de cette voie. Il serait alors nécessaire de suivre, en parallèle, l'augmentation du taux de céramides et d'apoptose en réponse à l'irradiation. Finalement, l'inactivation spécifique de la céramide synthase par la Fumonisine B₁ (FB₁) permettrait de confirmer l'hypothèse d'une activation p53-indépendante de la céramide synthase (car KB n'exprime pas la protéine p53) ce qui actuellement n'est pas démontré.

Le travail présenté ici sur les processus de détoxification se situe au niveau de l'expression radio-induite des transcrits et des protéines. Une analyse plus globale de ces processus permettrait d'estimer la capacité de détoxification des espèces réactives de l'oxygène en réponse à l'irradiation et ainsi de savoir si les processus de détoxification sont impliqués dans les variations de radiosensibilité des clones issus de KB. Il est par exemple possible de mesurer le taux intracellulaire de glutathion, lié à la radiosensibilité, par cytométrie en flux au cours du temps. Ceci permet de refléter des variations d'activité des enzymes impliquées dans le cycle du glutathion et donc de cibler plus précisément l'enzyme à analyser.

La réparation des dommages de l'ADN, qui n'a pas pu être étudiée, est l'un des aspects les plus importants de la réponse à l'irradiation et de la résistance. La cinétique de réparation ainsi que le taux de dommages non réparés peuvent être liés à la radiosensibilité. Il serait intéressant de suivre ces processus par « essais comètes » afin de préciser leur implication dans les variations de radiosensibilité des clones et de KB.

Ce travail réalisé sur des cellules en monocouche pourrait se prolonger par une étude comparable avec le modèle tridimensionnel du sphéroïde tumoral multicellulaire. Il est en effet connu que la radiorésistance n'est pas la même selon le mode de culture des cellules tumorales. Les caractéristiques des sphéroïdes sont proches de celle des tumeurs ce qui en fait un modèle de choix en radiothérapie. Malgré leurs avantages sur les cultures classiques en monocouche, leur utilisation reste peu développée car leur culture est particulièrement délicate et l'analyse journalière et manuelle de centaines de sphéroïdes est fastidieuse et contraignante. La technique de culture préalable aux analyses de radiosensibilité a été améliorée et standardisée. De plus, un procédé d'analyse automatique des sphéroïdes basé sur un automate passeur d'échantillons couplé à un logiciel d'analyse d'image a été conçu et développé avec plusieurs partenaires. Ce système, actuellement en phase de développement industriel, a fait l'objet de deux aides à l'innovation accordées par l'ANVAR et d'un brevet. La disponibilité de ce système d'analyse automatique devrait permettre l'essor de l'utilisation des sphéroïdes notamment en recherche oncologique préclinique.

Références bibliographiques

1. Koscielny S, Rezvani A, Laplanche A, Estève J, Ferlay J. Estimation de l'incidence des cancers en France : 1983-1987, p. 144. Paris: Les éditions INSERM, 1996.
2. Ménégot F, Chérié-Chaline L. Le cancer en France : Incidence et mortalité. Situation en 1995. Evolution entre 1975 et 1995., p. 182: La documentation française, 1999.
3. Vokes E E, Weichselbaum R R, Lippman S M, Hong W K. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 328: 184-94, 1993.
4. Jensen O M, Esteve J, Moller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur J Cancer.* 26: 1167-256, 1990.
5. Adenis L, Lefebvre J L, Cambier L. Registry of cancers of the upper respiratory and digestive tract at the Northern and Pas-de-Calais departments from 1984 to 1986. *Bull Cancer.* 75: 745-50, 1988.
6. Boyle P, Macfarlane G J, Blot W J, Chiesa F, Lefebvre J L, Azul A M, de Vries N, Scully C. European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programme: oral carcinogenesis in Europe. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 31B: 75-85, 1995.
7. Spitz M R. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol.* 21: 281-8, 1994.
8. Hill C, Benhamou E, Doyon F, Flamant R. Evolution de la mortalité par cancer en France entre 1950 et 1985., p. 337. Paris: Les éditions INSERM, 1989.
9. Macfarlane G J, Zheng T, Marshall J R, Boffetta P, Niu S, Brasure J, Merletti F, Boyle P. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 31B: 181-7, 1995.
10. Tuyns A J, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer.* 41: 483-91, 1988.
11. Bundgaard T, Bentzen S M, Sogaard H. Histological differentiation of oral squamous cell cancer in relation to tobacco smoking. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 31B: 118-21, 1995.
12. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis.* 25: 711-6, 1972.

13. Yeudall W A, Paterson I C, Patel V, Prime S S. Presence of human papillomavirus sequences in tumour-derived human oral keratinocytes expressing mutant p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 31B: 136-43, 1995.
14. Watts S L, Brewer E E, Fry T L. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 71: 701-7, 1991.
15. Lefebvre J, Joveniaux A, Ton Van J. Epidemiological study of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *In: Processing ECCO 7, Jerusalem, 1993, pp. 680.*
16. Schottenfeld D, Fraumeni J. *Cancer epidemiology and prevention.* Philadelphia: WB Saunders, 1982.
17. Lund V J, Howard D J. Head and neck cancer in the young: a prognostic conundrum? *J Laryngol Otol.* 104: 544-8, 1990.
18. Prasad M P, Mukundan M A, Krishnaswamy K. Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 31B: 155-9, 1995.
19. Steinmetz K A, Potter J D. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control.* 2: 427-42, 1991.
20. Smans M, Muir C, Boyle P. *Atlas of cancer mortality in the European Economic Community, Vol. 107.* Lyon, 1992.
21. Vautrin G m d C A. *Protocoles d'investigations et de traitements pour les cancers, p. 323.* Nancy, 1991.
22. Sarini J. *Cancers des voies aéro-digestives supérieures 197-1983. Etude du centre Oscar Lambret. A propos de 5161 cas.* Faculté de médecine, pp. 299. Lille: Lille II, 1995.
23. American J C O C. *Manuel for staging of cancer., 3 edition.* Philadelphia: Lippincott J.B., 1988.
24. Al-Sarraf M, Amer M H, Vaishampayan G, Loh J, Weaver A. A multidisciplinary therapeutic approach for advanced previously untreated epidermoid cancer of the head and neck: preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 5: 1421-3, 1979.
25. Catimel G. Head and Neck Cancer : Guidelines for Chemotherapy. *Drugs.* 51: 73-88, 1996.
26. Morton R P, Rugman F, Dorman E B, Stoney P J, Wilson J A, McCormick M, Veevers A, Stell P M. Cisplatinium and bleomycin for advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomised factorial phase III controlled trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 15: 283-9, 1985.
27. Gregoire V, Beauvain M, Rosier J F, De Coster B, Bruniaux M, Octave-Prignot M, Scalliet P. Kinetics of mouse jejunum radiosensitization by 2',2'-

- difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and its relationship with pharmacodynamics of DNA synthesis inhibition and cell cycle redistribution in crypt cells. *Br J Cancer*. 76: 1315-21, 1997.
28. Dimery I W, Hong W K. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 85: 95-111, 1993.
 29. Al-Sarraf M, Hussein M. Head and neck cancer: present status and future prospects of adjuvant chemotherapy. *Cancer Invest*. 13: 41-53, 1995.
 30. Gregoire V, Beauduin M, Bruniaux M, De Coster B, Octave Prignot M, Scalliet P. Radiosensitization of mouse sarcoma cells by fludarabine (F-ara-A) or gemcitabine (dFdC), two nucleoside analogues, is not mediated by an increased induction or a repair inhibition of DNA double-strand breaks as measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol*. 73: 511-20, 1998.
 31. Rosier J F, Beauduin M, Bruniaux M, De Bast M, De Coster B, Octave-Prignot M, Scalliet P, Gregoire V. The effect of 2'-2' difluorodeoxycytidine (dFdC, gemcitabine) on radiation-induced cell lethality in two human head and neck squamous carcinoma cell lines differing in intrinsic radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology*. 75: 245-251, 1999.
 32. Fety R, Rolland F, Barberi-Heyob M, Merlin J L, Conroy T, Hardouin A, Riviere A, Milano G. Clinical randomized study of 5FU monitoring versus standard dose in patients with head and neck cancer: preliminary results. *Anticancer Res*. 14: 2347-52, 1994.
 33. Wong C, Ang K, Fletcher G. Definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the tonsillar fossa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 16: 657-662, 1989.
 34. Puck T, Marcus P. Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 103: 653-666, 1956.
 35. Hewitt H, Wilson C. A survival curve for mammalian leukemia cells irradiated in vivo. *Brit J Cancer*. 13: 69-75, 1959.
 36. Kember N F. An in vivo cell survival system based on the recovery of rat growth cartilage from radiation injury. *Nature*. 207: 501-3, 1965.
 37. Withers H R. The dose-survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin. *Br J Radiol*. 40: 187-94, 1967.
 38. Withers H R, Elkind M M. Radiosensitivity and fractionation response of crypt cells of mouse jejunum. *Radiat Res*. 38: 598-613, 1969.
 39. Suit H. Radiation biology : a basis for radiotherapy. *In: L. Fibeger (ed.) Textbook of radiotherapy*, pp. 75-121. Philadelphia, 1973.
 40. Le Bourgeois J, Chavaudra J, Eschwege F. Radiothérapie oncologique. Cancers de l'ovaire. *In: Hermann (ed.)*, pp. 307-317. Paris, 1992.

41. Tepper J. Clonogenic potential of human tumors. A hypothesis. *Acta Radiol Oncol.* 20: 283-8, 1981.
42. Elkind M, Sutton H. X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature.* 184: 1293-1295, 1959.
43. Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise E P, Joiner M C. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol.* 63: 639-50, 1993.
44. Scalliet P, Mornex F, Lartigau E. Apport récents de la radiobiologie à la pratique de la radiothérapie. *Bull Cancer/Radiother.* 80: 403-415, 1993.
45. Lea D, Catcheside D. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberration in *Trandescantia*. *J Genet.* 44: 216-245, 1942.
46. Thames H D, Hendry J H. Fraction in radiotherapy. London, 1987.
47. Kellerer A, Rossi H. The theory of dual radiation action. *Current topics Rad Res.* 8: 85-158, 1972.
48. Fertil B, Deschavanne P J, Lachet B, Malaise E P. In vitro radiosensitivity of six human cell lines: a comparative study with different statistical models. *Radiat Res.* 82: 297-309, 1980.
49. Thames H D. An 'incomplete-repair' model for survival after fractionated and continuous irradiations. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 47: 319-39, 1985.
50. Scalliet P, Cosset J M, Wambersie A. Application of the LQ model to the interpretation of absorbed dose distribution in the daily practice of radiotherapy. *Radiother Oncol.* 22: 180-9, 1991.
51. Deacon J, Peckham M J, Steel G G. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol.* 2: 317-23, 1984.
52. Malaise E P, Fertil B, Deschavanne P J, Chavaudra N, Brock W A. Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts. *Radiat Res.* 111: 319-33, 1987.
53. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise E P. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res.* 99: 73-84, 1984.
54. Fertil B, Malaise E P. The mean inactivation dose: experimental versus theoretical. *Radiat Res.* 108: 222-5, 1986.
55. Weichselbaum R R, Rotmensch J, Ahmed-Swan S, Beckett M A. Radiobiological characterization of 53 human tumor cell lines. *Int J Radiat Biol.* 56: 553-60, 1989.
56. Fertil B, Malaise E P. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 11: 1699-707, 1985.

57. Ling C C, Chen C H, Fuks Z. An equation for the dose response of radiation-induced apoptosis: possible incorporation with the LQ model. *Radiother Oncol.* 33: 17-22, 1994.
58. Griffon G, Marchal C, Merlin J L, Parache R M, Bey P. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. *Eur J Cancer* 31A. 1: 85-91, 1995.
59. West C M, Davidson S E, Roberts S A, Hunter R D. Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br J Cancer.* 68: 819-23, 1993.
60. Sheridan M T, Cooper R A, West C M. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma [see comments]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 44: 507-12, 1999.
61. Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, Budach W, Gioioso D, Pardo F, Okunieff P, Bleehen N, Urtasun R, Suit H. Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 25: 243-9, 1993.
62. Mornex F, Bertrand S, N'Guyen M J, Devriendt D, Beauchesne P, Buronfosse A, Lambin P, Kirchner A L, Bonmartin A, Dore J F. Biological bases of radioresistance of high grade malignant astrocytoma. *Bull Cancer Radiother.* 81: 342-50, 1994.
63. Begg A C. Cell proliferation in tumors. *In: G. G. Steel (ed.) Basic clinical radiobiology*, pp. 14-22. Boston: Edwards Arnold Publishers, 1993.
64. Steel G G. *The growth kinetics of tumours, Vol. 1.* Oxford: Oxford University Press, 1977.
65. Begg A C, McNally N J, Shrieve D C, Karcher H. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry.* 6: 620-6, 1985.
66. Steel G G. The growth rate of tumours. *In: G. G. Steel (ed.) Basic clinical radiobiology*, pp. 8-13. Boston: Edwards Arnold Publishers, 1993.
67. Steel G G. Combinaison of radiotherapt and chemotherapy. *In: G. G. Steel (ed.) Basic clinical radiobiology*, pp. 151-162. Boston: Edwards Arnold Publishers, 1993.
68. Steel G G. The radiobiology of tumours. *In: G. G. Steel (ed.) Basic clinical radiobiology*, pp. 108-119. Boston: Edwards Arnold Publishers, 1993.
69. Withers H R, Taylor J M, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* 27: 131-46, 1988.
70. Bentzen S M, Thames H D. Clinical evidence for tumor clonogen regeneration: interpretations of the data [see comments]. *Radiother Oncol.* 22: 161-6, 1991.

71. Vokes E E, Weichselbaum R R. Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors [published erratum appears in *J Clin Oncol* 1990 Aug;8(8):1447] [see comments]. *J Clin Oncol.* 8: 911-34, 1990.
72. Trott K R, Maciejewski B, Preuss-Bayer G, Skolyszewski J. Dose-response curve and split-dose recovery in human skin cancer. *Radiother Oncol.* 2: 123-9, 1984.
73. Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini M G, Gray J W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80: 5573-7, 1983.
74. Zietman A L, Suit H D, Ramsay J R, Silobrcic V, Sedlacek R S. Quantitative studies on the transplantability of murine and human tumors into the brain and subcutaneous tissues of NCr/Sed nude mice. *Cancer Res.* 48: 6510-6, 1988.
75. Geara F, Girinski T A, Chavaudra N, Cosset J M, Dubray B, Brock W A, Malaise E P. Estimation of clonogenic cell fraction in primary cultures derived from human squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 21: 661-5, 1991.
76. Thomlinson R, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* 9:, 1955.
77. Kallman L, Jardine L, Johnson C. Effects of different schedules of dose fractionation on the oxygenation status of a transplantable mouse sarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 44: 369-377, 1970.
78. Gatenby R A, Kessler H B, Rosenblum J S, Coia L R, Moldofsky P J, Hartz W H, Broder G J. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 14: 831-8, 1988.
79. Cano E, Hazzalin C A, Mahadevan L C. Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen- activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol.* 14: 7352-62, 1994.
80. Stecca C, Gerber G B. Adaptive response to DNA-damaging agents - A review of potential mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 55: 941-951, 1998.
81. Ibuki Y, Goto R. Adaptive response to low doses of gamma-ray in Chinese hamster cells: determined by cell survival and DNA synthesis. *Biol Pharm Bull.* 17: 1111-3, 1994.
82. el-Deiry W S, Kern S E, Pietenpol J A, Kinzler K W, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1: 45-9, 1992.
83. Hainaut P. p53 à l'échelle atomique : les multiples reflets d'un cristal. *Bull Cancer.* 84: 747-751, 1997.
84. Chiarugi V, Ruggiero M. Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process. *Tumori.* 82: 205-209, 1996.

85. Feldmann G. Apoptosis or programmed cell death. *Ann Pathol.* 15: 92-109, 1995.
86. Harris C C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst.* 88: 1442-55, 1996.
87. Huang L C, Clarkin K C, Wahl G M. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G(1) arrest. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 4827-4832, 1996.
88. Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M, Harris C C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-78, 1994.
89. Beckman K B, Ames B N. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 272: 19633-6, 1997.
90. Wallace S S. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res.* 150: S60-79, 1998.
91. Ward J F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 35: 95-125, 1988.
92. Brenner D J, Ward J F. Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 61: 737-48, 1992.
93. Oberley L W, Buettner G R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* 39: 1141-1149, 1979.
94. Tew K D. Glutathione-associated enzyme in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 54: 4313-4320, 1994.
95. Mulder T P, Manni J J, Roelofs H M, Peters W H, Wiersma A. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis.* 16: 619-24, 1995.
96. Lafuente A, Maristany M, Arias C, Cuchi A, Lafuente M J, Molina R, Ballesta A, Trasserra J. Glutathione and glutathione S-transferases in human squamous cell carcinomas of the larynx and GSTM1 dependent risk. *Anticancer Res.* 18: 107-111, 1998.
97. Britten R A, Warenus H M, White R, Peacock J. BSO-induced reduction of glutathione levels increases the cellular radiosensitivity of drug-resistant human tumor cells. *Int J Radiat Oncology Biol Phys.* 22: 769-772, 1992.
98. Mulder T P J, Verspaget H W, Sier C F M, Roelofs H M J, Ganesh S, Griffioen G, Peters W H M. Glutathione S-transferase p in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res.* 55: 2696-2702, 1995.

99. Szarka C E, Pfeiffer G R, Hum S T, Everly L C, Balslem A M, Moore D F, Litwin S, Goosenberg E B, Frucht H, Engstrom P F, Clapper M L. Glutathione S-transferase activity and glutathione S-transferase m expression in subjects with risk for colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 2789-2793, 1995.
100. Nazard-Stewart V, Motulsky A G, Eaton D L, White E, Hornung S K, Leng Z T, Stapleton P, Weiss N S. The glutathione S-transferase m polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res.* 53: 2313-2318, 1993.
101. Lafuente A, Pujol F, Carretero P, Pérez Villa J, Cuchi A. Human glutathione S-transferase m (GSTm) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett.* 68: 49-54, 1993.
102. Li N, Oberley T D. Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle. *J Cell Physiol.* 177: 148-160, 1998.
103. Urano M, Kuroda M, Reynolds R, Oberley T D, S. Clair D K. Expression of manganese superoxide dismutase reduces tumor control radiation dose: gene-radiotherapy. *Cancer Res.* 55: 2490-2493, 1995.
104. Liebmann J, Fisher J, Lipschultz C, Kuno R, Kaufman D C. Enhanced glutathione peroxidase expression protects cells from hydroperoxides but not from radiation or doxorubicin. *Cancer Research.* 55: 4465-4470, 1995.
105. Moffatt P, Denizeau F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab Rev.* 29: 261-307, 1997.
106. Samson S L, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 59: 257-88, 1998.
107. Darbon J M, Fesquet D, Cavadore J C. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire : les protéines modulatrices des complexes cdk-cyclines. *Médecine/sciences.* 11: 349-356, 1995.
108. Horton L E, Qian Y, Templeton D J. G1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms. *Cell Growth Differ.* 6: 395-407, 1995.
109. Suzuki-Takahashi I, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene.* 10: 1691-8, 1995.
110. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks S K, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene.* 10: 229-36, 1995.
111. Wolowiec D, Ffrench M. Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Médecine/sciences.* 12: 165-173, 1996.

112. Hwang A, Muschel R J. Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res.* 150: S52-9, 1998.
113. Morgan D O. Principles of CDK regulation. *Nature.* 374: 131-4, 1995.
114. Fisher R P, Morgan D O. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell.* 78: 713-24, 1994.
115. Mueller P R, Coleman T R, Kumagai A, Dunphy W G. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science.* 270: 86-90, 1995.
116. Hoffmann I, Karsenti E. The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 18: 75-9, 1994.
117. Coleman C N. Beneficial liaisons: radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiother Oncol.* 28: 1-15, 1993.
118. Little J B, Hahn G M, Frindel E, Tubiana M. Repair of potentially lethal radiation damage in vitro and in vivo. *Radiology.* 106: 689-94, 1973.
119. Guichard M, Weichselbaum R R, Little J B, Malaise E P. Potentially lethal damage repair as a possible determinant of human tumour radiosensitivity. *Radiother Oncol.* 1: 263-9, 1984.
120. Li C Y, Nagasawa H, Dahlberg W K, Little J B. Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced G1 arrest in established human tumor cell lines. *Oncogene.* 11: 1885-92, 1995.
121. Harper J W, Adami G R, Wei N, Keyomarsi K, Elledge S J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell.* 75: 805-16, 1993.
122. Levine A J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88: 323-31, 1997.
123. Brachman D G, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum R R. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Research.* 53: 3667-3669, 1993.
124. Slichenmyer W J, Nelson W G, Slebos R J, Kastan M B. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.* 53: 4164-8, 1993.
125. Little J B. Induction of gene expression by radiation : role of p53 in radiosensitivity. *In: Troisième colloque francophone de radiobiologie fondamentale., Nice, 15-20 Juin 1997* 1997.
126. Kao G D, McKenna W G, Maity A, Blank K, Muschel R J. Cyclin B1 availability is a rate-limiting component of the radiation-induced G(2) delay in HeLa cells. *Cancer Res.* 57: 753-758, 1997.

127. El-Deiry W S, Harper J W, O'Connor P M, Velculescu V E, Canman C E, Jackman J, Pietenpol J A, Burrell M, Hill D E, Wang Y, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54: 1169-74, 1994.
128. Chiarugi V, Cinelli M, Magnelli L. p53: radiosensitivity and antiangiogenic effects. *Mol Genet Metab.* 64: 7-11, 1998.
129. Little J B. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 7: 337-52, 1993.
130. Foray N, Priestley A, Arlett C F, Malaise E P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 72: 271-283, 1997.
131. Sarasin A. DNA lesions: mechanisms of recognition and repair. *Bull Cancer.* 84: 467-72, 1997.
132. Yarnold J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol.* 44: 1-7, 1997.
133. Olive P L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* 150: S42-51, 1998.
134. Szumiel I. Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res.* 150: S92-101, 1998.
135. Jeggo P A. DNA breakage and repair. *Adv Genet.* 38: 185-218, 1998.
136. Foray N, Arlett C F, Malaise E P. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look. *Biochimie.* 79: 567-575, 1997.
137. Canman C E, Lim D S. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene.* 17: 3301-8, 1998.
138. Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-57, 1972.
139. Meyn R E, Stephens L C, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev.* 15: 119-31, 1996.
140. Radford I R. Mouse lymphoma cells that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double-strand breakage as compared with cells that undergo mitotic death. *Int J Radiat Biol.* 59: 1353-69, 1991.
141. Story M D, Voehringer D W, Malone C G, Hobbs M L, Meyn R E. Radiation-induced apoptosis in sensitive and resistant cells isolated from a mouse lymphoma. *Int J Radiat Biol.* 66: 659-68, 1994.
142. Radford I R. p53 status, DNA double-strand break repair proficiency, and radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. *Int J Radiat Biol.* 66: 557-60, 1994.

143. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp Cell Res.* 248: 10-7, 1999.
144. Desoize B, Sen S. L'apoptose ou mort cellulaire programmée: concepts, mécanismes et apports en cancérologie. *Bull Cancer.* 79: 413-425, 1992.
145. Illidge T M. Radiation-induced apoptosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 10: 3-13, 1998.
146. Desoize B. Apoptosis and programmed cell death. *Bull Cancer.* 82: 70-6, 1995.
147. Li X, Traganos F, Melamed M R, Darzynkiewicz Z. Single-step procedure for labeling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides: detection of apoptosis and bromodeoxyuridine incorporation. *Cytometry.* 20: 172-80, 1995.
148. Martin S J, Green D R. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol.* 18: 137-53, 1995.
149. Larsen C J. The BCL2 gene, prototype of a gene family that controls programmed cell death (apoptosis). *Ann Genet.* 37: 121-34, 1994.
150. Kahn A. Bcl-2 inhibe t'il l'apoptose en s'opposant à l'action des radicaux oxygènes ? *Médecine/sciences.* 10: 208-209, 1994.
151. Kitada S, Krajewski S, Miyashita T, Krajewska M, Reed J C. Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene.* 12: 187-92, 1996.
152. Gajewski T F, Thompson C B. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence [comment]. *Cell.* 87: 589-92, 1996.
153. Korsmeyer S J, Shutter J R, Veis D J, Merry D E, Oltvai Z N. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol.* 4: 327-32, 1993.
154. Levade T, Jaffrézou J P, Andrieu N, Uy L. La voie sphingomyéline-céramide dans la réponse cellulaire aux effecteurs antitumoraux. *Médecine/sciences.* 12: 1219-1227, 1996.
155. Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res.* 150: S102-8, 1998.
156. Liao W C, Fuks Z, Persaud R, McLoughlin M, Ehleiter D, Kolesnick R, Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced DNA damage initiates late-phase apoptosis via activation of ceramides synthase. *In: 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, LA, March 1998* 1998.
157. Bennett M, Macdonald K, Chan S W, Luzio J P, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 282: 290-3, 1998.

158. Ueta E, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Manganese superoxide dismutase negatively regulates the induction of apoptosis by 5-fluorouracil, peplomycin and gamma-rays in squamous cell carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 90: 555-64, 1999.
159. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol.* 113: 101-22, 1987.
160. Sutherland R M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 240: 177-84, 1988.
161. Durand R E, Sutherland R M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res.* 71: 75-80, 1972.
162. Overgaard J, Hansen H S, Jorgensen K, Hjelm Hansen M. Primary radiotherapy of larynx and pharynx carcinoma--an analysis of some factors influencing local control and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 12: 515-21, 1986.
163. Durand R E. Repair during multifraction exposures: spheroids versus monolayers. *Br J Cancer Suppl.* 6: 203-6, 1984.
164. Sutherland R M, Inch W R, McCredie J A, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 18: 491-5, 1970.
165. Sutherland R M, Durand R E, Jones W B G. Modification by triacetoneamine-N-oxyl (TAN) of the radiation response of chinese hamster cells grown as a tumor model. *Radiat Res.* 47: 342, 1971.
166. Dertinger H, Hulser D. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat Environ Biophys.* 19: 101-7, 1981.
167. ter Haar G T, Walling J, Loverock P, Townsend S. The effect of combined heat and ultrasound on multicellular tumour spheroids. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 53: 813-27, 1988.
168. Olive P L, Durand R E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 13: 121-38, 1994.
169. Durand R E. Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in multicell spheroids in vitro. *Cancer Res.* 41: 3495-8, 1981.
170. Schwachofer J H, Crooijmans R P, Hoogenhout H, Kal H B, Schaapveld R Q, Wessels J. Differences in repair of radiation induced damage in two human tumor cell lines as measured by cell survival and alkaline DNA unwinding. *Strahlenther Onkol.* 167: 35-40, 1991.
171. Schwachofer J H, Crooijmans R P, van Gasteren J J, Hoogenhout J, Jerusalem C R, Kal H B, Theeuwes A G. Repair of sublethal damage in two human tumor cell lines grown as multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17: 591-5, 1989.

172. Schwachofer J H, Crooijmans R P, Hoogenhout J, Jerusalem C R, Kal H B, Theeuwes A G. Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19: 1191-7, 1990.
173. Schwachofer J H, Hoogenhout J, Kal H B, Koedam J, van Wezel H P. Radiosensitivity of different human tumor lines grown as xenografts determined from growth delay and survival data. *In Vivo.* 4: 253-7, 1990.
174. Olive P L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res.* 117: 79-92, 1989.
175. Luo C, MacPhail S H, Dougherty G J, Naus C C, Olive P L. Radiation response of connexin43-transfected cells in relation to the "contact effect". *Exp Cell Res.* 234: 225-32, 1997.
176. Sutherland R M, Durand R E. Hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 23: 235-46, 1973.
177. Gorlach A, Acker H. pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1227: 105-12, 1994.
178. Franko A J, Parliament M B, Allalunis-Turner M J, Wolokoff B G. Variable presence of hypoxia in M006 human glioma spheroids and in spheroids and xenografts of clonally derived sublines. *Br J Cancer.* 78: 1261-8, 1998.
179. Freyer J P. Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J Cell Physiol.* 176: 138-149, 1998.
180. Acker H. Microenvironmental conditions in multicellular spheroids grown under liquid-overlay tissue culture conditions. *Recent Results Cancer Res.* 95: 116-33, 1984.
181. Franko A J, Koch C J. The radiation response of hypoxic cells in EMT6 spheroids in suspension culture does model data from EMT6 tumors. *Radiat Res.* 96: 497-504, 1983.
182. Luk C K, Sutherland R M. Nutrient modification of proliferation and radiation response in EMT6/Ro spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 13: 885-95, 1987.
183. Durand R E, Biaglow J E. Radiosensitization of hypoxic cells of an in vitro tumor model by respiratory inhibitors. *Radiat Res.* 69: 359-66, 1977.
184. Schwachofer J H, Acker H, Crooijmans R P, Van Gasteren J J, Holtermann G, Hoogenhout J, Jerusalem C R, Kal H B. Oxygen tensions in two human tumor cell lines grown and irradiated as multicellular spheroids. *Anticancer Res.* 11: 273-9, 1991.
185. Nylen T, Acker H, Bolling B, Holterman G, Carlsson J. Influence of ionizing radiation on oxygen profiles in different types of multicellular spheroids. *Radiat Res.* 120: 213-26, 1989.

186. Mueller-Klieser W, Vaupel P. Improvement of tumor spheroid oxygenation by tetrachlorodecaoxide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 13: 49-54, 1987.
187. Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit H D, Jain R K. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res.* 59: 3776-82, 1999.
188. Griffon-Etienne G, Merlin J-L, Marchal C. Association of docetaxel/paclitaxel with irradiation in ovarian carcinoma cell lines in bidimensional (sulforhodamine B assay) and tridimensional (spheroids) cultures. *Anti-Cancer Drugs.* 7: 660-670, 1996.
189. Griffon-Etienne G, Merlin J L, Marchal C. In vitro evaluation of Taxol(R) combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett.* 109: 23-32, 1996.
190. Frasci G, Comella P, Scoppa G, Guida C, Gravina A, Fiore F, Casaretti R, Daponte A, Parziale A, Comella G. Weekly paclitaxel and cisplatin with concurrent radiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer: a phase I study. *J Clin Oncol.* 15: 1409-17, 1997.
191. Hicks K O, Fleming Y, Siim B G, Koch C J, Wilson W R. Extravascular diffusion of tirapazamine: effect of metabolic consumption assessed using the multicellular layer model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 42: 641-9, 1998.
192. Durand R E, Olive P L. Radiosensitisation and radioprotection by BSO and WR-2721: the role of oxygenation. *Br J Cancer.* 60: 517-22, 1989.
193. Ng C E, Keng P C, Sutherland R M. Characterization of radiation sensitivity of human squamous carcinoma A431 cells. *Br J Cancer.* 56: 301-7, 1987.
194. Luk C K, Keng P C, Sutherland R M. Radiation response of proliferating and quiescent subpopulations isolated from multicellular spheroids. *Br J Cancer.* 54: 25-32, 1986.
195. Rodriguez A, Alpen E L, Mendonca M, DeGuzman R J. Recovery from potentially lethal damage and recruitment time of noncycling clonogenic cells in 9L confluent monolayers and spheroids. *Radiat Res.* 114: 515-27, 1988.
196. Weichselbaum R R, Little J B, Tomkinson K, Evans S, Yuhas J. Repair of fractionated radiation in plateau phase cultures of human tumor cells and human multicellular tumor spheroids. *Radiother Oncol.* 2: 41-7, 1984.
197. Durand R E, Sutherland R M. Radiation studies with spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95: 103-15, 1984.
198. Jostes R F, Williams M E, Barcellos-Hoff M H, Hoshino T, Deen D F. Growth delay in 9L rat brain tumor spheroids after irradiation with single and split doses of X rays. *Radiat Res.* 102: 182-9, 1985.
199. Wheldon T E, Wilson L, Livingstone A, Russell J, O'Donoghue J, Gregor A. Radiation studies on multicellular tumour spheroids derived from human

- neuroblastoma: absence of sparing effect of dose fractionation. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 22: 563-6, 1986.
200. Durand R E. Repair and proliferation: major determinants of the multifraction radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15: 1147-52, 1988.
 201. Bates R C, Buret A, van Helden D F, Horton M A, Burns G F. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol.* 125: 403-15, 1994.
 202. Meredith J E, Jr., Fazeli B, Schwartz M A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 4: 953-61, 1993.
 203. Cole L, Ellis M. Radiation-induced changes in nucleic acids: Release of soluble deoxypolynucleotides in the speel. *Radiat. Res.* 508-517, 1957.
 204. Schreck R. Cinemicrophotographic observations and theoretical considerations on reactions of lymphocytes to X-rays. *Radiology.* 65: 912-919, 1955.
 205. Sutherland R M, Durand R E. Cell contact as a possible contribution to radiation resistance of some tumours. *Br J Radiol.* 45: 788-9, 1972.
 206. Russell J, Wheldon T E, Stanton P. A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55: 4915-21, 1995.
 207. Frankel A, Buckman R, Kerbel R S. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 57: 2388-93, 1997.
 208. Rofstad E K, Eide K, Skoyum R, Hystad M E, Lyng H. Apoptosis, energy metabolism, and fraction of radiobiologically hypoxic cells: a study of human melanoma multicellular spheroids. *Int J Radiat Biol.* 70: 241-9, 1996.
 209. Holtfreter J. A study on the mechanics of gastrulation. *J Exp Zool.* 95: 171-212, 1944.
 210. Yuhas J M, Li A P, Martinez A O, Ladman A J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 37: 3639-43, 1977.
 211. Kuwashima Y, Yamada T, Saio M, Takami T. Formation and growth of multicellular spheroids in media containing low concentrations of agarose. *Cancer Letters.* 71: 31-33, 1993.
 212. Carlsson J, Yuhas J M. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95: 1-23, 1984.
 213. Desoize B, Gimonet D, Jardiller J C. Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res.* 18: 4147-58, 1998.
 214. Schwachofer J H. Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research (review). *Anticancer Res.* 10: 963-9, 1990.

215. Sutherland R M, Durand R E. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95: 24-49, 1984.
216. Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland R M. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer.* 56: 325-7, 1987.
217. Wigle J C, Freyer J P, Sutherland R M. Use of a sedimentation column to obtain uniformly sized populations of multicell spheroids. *In Vitro.* 19: 361-6, 1983.
218. Villalobos M, Aranda M, Nunez M I, Becerra D, Olea N, Ruiz de Almodovar M, Pedraza V. Interaction between ionizing radiation, estrogens and antiestrogens in the modification of tumor microenvironment in estrogen dependent multicellular spheroids. *Acta Oncol.* 34: 413-7, 1995.
219. Yuhas J M, Tarleton A E. Dormancy and spontaneous recurrence of human breast cancer in vitro. *Cancer Res.* 38: 3584-9, 1978.
220. Yamazaki M, Tsuchida M, Kobayashi K-y, Takezawa T, Mori Y. A novel method to prepare multicellular spheroids from varied cell types. *Biotechnology and bioengineering.* 48: 17-24, 1995.
221. Durand R E. Contributions of flow cytometry to studies with multicell spheroids. *Methods in cell biology.* 42: 405-422, 1994.
222. Chapman J D, Engelhardt E L, Stobbe C C, Schneider R F, Gerald G E. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiation Oncol.* 46: 229-237, 1998.
223. Evans S M, Jenkins W T, Shapiro M, Koch C J. Evaluation of the concept of "hypoxic fraction" as a descriptor of tumor oxygenation status. *Adv Exp Med Biol.* 411: 215-25, 1997.
224. Lartigau E, Randrianarivelo H, Avril M F, Margulis A, Spatz A, Eschwege F, Guichard M. Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 7: 400-6, 1997.
225. Sutherland R M, Durand R E. Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res Q.* 11: 87-139, 1976.
226. Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, Ponten J, Sundstrom C, Larsson E, Bergh J, Pahlman S, Busch C, Collins V P. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *Int J Cancer.* 31: 523-33, 1983.
227. Slee P H, Willemze R, van Oosterom A T, Lurvink E, van den Berg L. A comparison of two culture techniques: an in vitro & an in vivo tumour colony-forming assay. *Br J Cancer.* 52: 713-7, 1985.
228. Freyer J P, Sutherland R M. Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* 40: 3956-65, 1980.

229. Gronvik C, Capala J, Carlsson J. The non-variation in radiosensitivity of different proliferative states of human glioma cells. *Anticancer Res.* 16: 25-31, 1996.
230. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63, 1983.
231. Griffon G, Merlin J-L, Marchal C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anti-Cancer Drugs.* 6: 115-123, 1995.
232. Durand R E. Multicell spheroids as a model for cell kinetic studies. *Cell Tissue Kinet.* 23: 141-59, 1990.
233. West C M, Moore J V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol.* 55: 425-30, 1992.
234. West C M, Moore J V. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumor cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol.* 50: 665-9, 1989.
235. Djordjevic B, Lange C S, Rotman M Z, Torres C, Zheng Z. Increasing radiosensitivity in the course of fractionated X irradiation: the effect of contact with dead and dying cells. *Radiat Res.* 150: 275-82, 1998.
236. Mueller-Klieser W. Microelectrode measurement of oxygen tension distributions in multicellular spheroids cultured in spinner flasks. *Recent Results Cancer Res.* 95: 134-49, 1984.
237. Mueller-Klieser W F, Sutherland R M. Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 42: 237-42, 1982.
238. Mueller-Klieser W, Freyer J P, Sutherland R M. Evidence for a major role of glucose in controlling development of necrosis in EMT6/Ro multicell tumor spheroids. *Adv Exp Med Biol.* 159: 487-95, 1983.
239. Mueller-Klieser W F, Sutherland R M. Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. *Br J Cancer.* 45: 256-64, 1982.
240. Grossmann U. Profiles of oxygen partial pressure and oxygen consumption inside multicellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95: 150-61, 1984.
241. Grossmann U, Winkler P, Carlsson J, Acker H. Local variations of oxygen consumption within multicellular spheroids calculated from measured PO₂ profiles. *Adv Exp Med Biol.* 169: 719-28, 1984.
242. Sutherland R M, McCredie J A, Inch W R. Multicellular spheroids: a new model target for in vitro studies of immunity to solid tumor allografts. *J Natl CancerInst.* 46: 113-120, 1971.

243. Schwachofer J H, Crooijmans R P, van Gasteren J J, Hoogenhout J, Jerusalem C R, Kal H B, Theeuwes A G. Radiosensitivity of different human tumor cells lines grown as multicellular spheroids determined from growth curves and survival data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17: 1015-20, 1989.
244. Wheldon T E, Livingstone A, Wilson L, O'Donoghue J, Gregor A. The radiosensitivity of human neuroblastoma cells estimated from regrowth curves of multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol.* 58: 661-4, 1985.
245. Evans S M, Labs L M, Yuhus J M. Response of human neuroblastoma and melanoma multicellular tumor spheroids (MTS) to single dose irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 12: 969-73, 1986.
246. Kaaijk P, Troost D, Sminia P, Hulshof M C C M, vanderKracht A H W, Leenstra S, Bosch D A. Hypofractionated radiation induces a decrease in cell proliferation but no histological damage to organotypic multicellular spheroids of human glioblastomas. *Eur J Cancer.* 33: 645-651, 1997.
247. West C M, Sutherland R M. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat Res.* 112: 105-15, 1987.
248. Duchesne G M, Peacock J H. Radiation cell survival and growth delay studies in multicellular spheroids of small-cell lung carcinoma. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 51: 365-75, 1987.
249. Rofstad E K, Wahl A, Brustad T. Radiation response of multicellular spheroids initiated from five human melanoma xenograft lines. Relationship to the radioresponsiveness in vivo. *Br J Radiol.* 59: 1023-9, 1986.
250. Rofstad E K, Sutherland R M. Growth and radiation sensitivity of the MLS human ovarian carcinoma cell line grown as multicellular spheroids and xenografted tumours. *Br J Cancer.* 59: 28-35, 1989.
251. Griffon G, Merlin J L, Parache R M, Martinet N, Marchal S, Nabet F, Wellman M, Barlier C, Marchal C. Sensitivity to taxoid derivatives of a newly established human endometrioid ovarian adenocarcinoma radioresistant cell line. *Anticancer Res.* 16: 177-87, 1996.
252. Webb C D, Latham M D, Lock R B, Sullivan D M. Attenuated topoisomerase II content directly correlates with a low level of drug resistance in a Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res.* 51: 6543-9, 1991.
253. Marchal S, Marchal C, Parache R M, Benjaafar N, Odda M, Leclerc A, Merlin J L, el Gueddarri B, Bey P. Combined flow cytometry and immunohistochemistry analyses for the assessment of nasopharyngeal carcinoma cell kinetics by in vivo bromodeoxyuridine infusion. *Cytometry.* 29: 165-72, 1997.
254. Liebmann J, Cook J A, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell J B. The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel (Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 33: 331-9, 1994.

255. Carmichael J, DeGraff W G, Gazdar A F, Minna J D, Mitchell J B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47: 943-6, 1987.
256. Carmichael J, DeGraff W G, Gazdar A F, Minna J D, Mitchell J B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-42, 1987.
257. Merlin J L, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 28A: 1452-8, 1992.
258. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159, 1987.
259. Aguilar-Santelises M, Rottenberg M E, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer.* 69: 114-119, 1996.
260. Brockmoller J, Kerb R, Drakoulis N, Nitz M, Roots I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.* 53: 1004-1011, 1993.
261. Hjalmarsson K, Marklund S L, Engstrom A, Edlund T. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 6340-4, 1987.
262. Karin M, Richards R I. Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein- II gene and a related processed gene. *Nature.* 299: 797-802, 1982.
263. Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh H L. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol.* 139: 3132-8, 1987.
264. Olivier R. Flow cytometry technique for assessing effects of N-acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes. *Methods Enzymol.* 251: 270-8, 1995.
265. Chapman J D, Anderson P R. Predicting and overcoming the radioresistance of individual tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 44: 477-9, 1999.
266. Chauvel P, Courdi A, Gioanni J, Vallicioni J, Santini J, Demard F. The labelling index: a prognostic factor in head and neck carcinoma. *Radiother Oncol.* 14: 231-7, 1989.
267. Deschavanne P J, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 34: 251-266, 1995.
268. Biade S, Stobbe C C, Chapman J D. The intrinsic radiosensitivity of some human tumor cells throughout their cell cycles. *Radiat Res.* 147: 416-421, 1997.

269. Lee S E, Mitchell R A, Cheng A, Hendrickson E A. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 17: 1425-1433, 1997.
270. Pirolo K F, Hao Z M, Rait A, Jang Y J, Fee W E, Ryan P, Chiang Y W, Chang E H. p53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Oncogene.* 14: 1735-1746, 1997.
271. Chmura S J, Mauceri H J, Advani S, Heimann R, Beckett M A, Nodzenski E, Quintans J, Kufe D W, Weichselbaum R R. Decreasing the apoptotic threshold of tumor cells through protein kinase C inhibition and sphingomyelinase activation increases tumor killing by ionizing radiation. *Cancer Res.* 57: 4340-4347, 1997.
272. Somers K D, Merrick M A, Lopez M E, Incognito L S, Schechter G L, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res.* 52: 5997-6000, 1992.
273. Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris C C, Montesano R. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines : updated compilation and future prospects. *Nucleic Acid Research.* 25: 151-157, 1997.
274. McIlwrath A J, Vasey P A, Ross G M, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res.* 54: 3718-22, 1994.
275. Fan S, el-Deiry W S, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, Fornace A J, Jr., Magrath I, Kohn K W, O'Connor P M. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res.* 54: 5824-30, 1994.
276. Denekamp J. Cell kinetics and radiation biology. *Int J Radiat Biol.* 2: 357-380, 1986.
277. Theron T, Slabbert J, Serafin A, Bohm L. The merits of cell kinetic parameters for the assessment of intrinsic cellular radiosensitivity to photon and high linear energy transfer neutron irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 37: 423-428, 1997.
278. Pekkola-Heino K, Joensuu H, Klemi P, Grenman R. Relation of DNA ploidy and proliferation rate to radiation sensitivity in squamous carcinoma cell lines. *Archives of otolaryngology of head and neck surgery.* 120: 750-754, 1994.
279. Mirjolet J F, Barberi-Heyob M, Merlin J L, Marchal S, Etienne M C, Milano G, Bey P. Thymidylate synthase expression and activity: relation to S-phase parameters and 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer.* 78: 62-8, 1998.
280. Tubiana M. Repopulation in human tumors. A biological background for fractionation in radiotherapy. *Acta Oncol.* 27: 83-8, 1988.
281. Franzen G, Olofsson J, Tytor M, Klintonberg C, Risberg B. Preoperative irradiation in oral cavity carcinoma. A study with special reference to DNA pattern, histological response and prognosis. *Acta Oncol.* 26: 349-55, 1987.

282. Quiet C A, Weichselbaum R R, Gardina D J. Variation in radiation sensitivity during the cell cycle of two human squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 20: 733-8, 1991.
283. Malaise E P, Chavaudra N, Guichard M, Courdi A, Vazquez T. The influence of tumor growth kinetics on the response to radiation therapy and drug therapy in man. *Antibiot Chemother.* 23: 181-90, 1978.
284. Costa A, Salvatori P, Molinari R, Motta R, Cerutti A, Silvestrini R. Cell kinetics to monitor radioresponsivity in human epidermoid carcinoma. *Basic Appl Histochem.* 30: 209-13, 1986.
285. Fowler J F, Lindstrom M J. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 23: 457-67, 1992.
286. Begg A C, Hofland I, Kummermehr J. Tumour cell repopulation during fractionated radiotherapy: correlation between flow cytometric and radiobiological data in three murine tumours. *Eur J Cancer.* 27: 537-43, 1991.
287. Sarkaria J N, Fowler J F, Lindstrom M J, Jordan V C, Mulcahy R T. The decreased influence of overall treatment time on the response of human breast tumor xenografts following prolongation of the potential doubling time (Tpot). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 4: 833-840, 1995.
288. Maciejewski B, Skladowski K, Zajusz A. Radiobiological predictors of tumor and acute normal tissue response in radiotherapy for head and neck cancers. *Neoplasma.* 38: 513-22, 1991.
289. Suit H D, Howes A E, Hunter N. Dependence of response of a C3H mammary carcinoma to fractionated irradiation on fractionation number and intertreatment interval. *Radiat Res.* 72: 440-54, 1977.
290. Overgaard J, Hjelm-Hansen M, Johansen L V, Andersen A P. Comparison of conventional and split-course radiotherapy as primary treatment in carcinoma of the larynx. *Acta Oncol.* 27: 147-52, 1988.
291. Slevin N J, Hendry J H, Roberts S A, Agren-Cronqvist A. The effect of increasing the treatment time beyond three weeks on the control of T2 and T3 laryngeal cancer using radiotherapy [published erratum appears in *Radiother Oncol* 1992 Nov;25(3):227] [see comments]. *Radiother Oncol.* 24: 215-20, 1992.
292. Haustermans K, Fowler J, Geboes K, Christiaens M R, Lerut A, van der Schueren E. Relationship between potential doubling time (Tpot), labeling index and duration of DNA synthesis in 60 esophageal and 35 breast tumors: Is it worthwhile to measure Tpot? *Radiother Oncol.* 46: 157-67, 1998.
293. Barnas C, Martel-Planche G, Furukawa Y, Hollstein M, Montesano R, Hainaut P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. *Int J Cancer.* 71: 79-87, 1997.

294. Takahashi T, Nau M M, Chiba I, Birrer M J, Rosenberg R K, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar A F, Minna J D. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*. 246: 491-4, 1989.
295. Murakami Y, Hayashi K, Sekiya T. Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res*. 51: 3356-61, 1991.
296. Kawasaki T, Tomita Y, Watanabe R, Tanikawa T, Kumanishi T, Sato S. mRNA and protein expression of p53 mutations in human bladder cancer cell lines. *Cancer Lett*. 82: 113-21, 1994.
297. Stuart E T, Haffner R, Oren M, Gruss P. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *Embo J*. 14: 5638-45, 1995.
298. Kastan M B, Zhan Q, el-Deiry W S, Carrier F, Jacks T, Walsh W V, Plunkett B S, Vogelstein B, Fornace A J, Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 71: 587-97, 1992.
299. Komarova E A, Zelnick C R, Chin D, Zeremski M, Gleiberman A S, Bacus S S, Gudkov A V. Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. *Cancer Res*. 57: 5217-20, 1997.
300. Pellegata N S, Antoniono R J, Redpath J L, Stanbridge E J. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 15209-15214, 1996.
301. Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig R W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 51: 6304-11, 1991.
302. Schwartz D, Almog N, Peled A, Goldfinger N, Rotter V. Role of wild type p53 in the G(2) phase: regulation of the gamma-irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene*. 15: 2597-2607, 1997.
303. Whisnant-Hurst N, Leadon S A. TP53 is not required for the constitutive or induced repair of DNA damage produced by ionizing radiation at the G(1)/S-phase border. *Radiation Research*. 151: 263-269, 1999.
304. Servomaa K, Kiuru A, Grenman R, Pekkolaheino K, Pulkkinen J O, Rytomaa T. p53 mutations associated with increased sensitivity to ionizing radiation in human head and neck cancer cell lines. *Cell Proliferation*. 29: 219-230, 1996.
305. Jung M, Notario V, Dritschilo A. Mutations in the p53 gene in radiation-sensitive and -resistant human squamous carcinoma cells. *Cancer Res*. 52: 6390-3, 1992.
306. Murata T, Akagi K, Uda M, Kimura H, Nasu R, Tanaka Y. Cell kinetic changes in cultured tumor cells after treatment with radiation and chemotherapy. *Int J Oncol*. 12: 171-174, 1998.

307. Murata T, Akagi K, Nasu R, Kimura H, Tanaka Y. Analysis of cell kinetics after gamma-ray irradiation using an anti-BrdU monoclonal antibody. *Int J Oncol.* 12: 345-349, 1998.
308. Tsuchida E, Urano M. The effect of UCN-01 (7-hydroxystaurosporine), a potent inhibitor of protein kinase C, on fractionated radiotherapy or daily chemotherapy of a murine fibrosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 39: 1153-1161, 1997.
309. Painter R B. Radioresistant DNA synthesis: an intrinsic feature of ataxia telangiectasia. *Mutat Res.* 84: 183-90, 1981.
310. Larner J M, Lee H, Hamlin J L. Radiation effects on DNA synthesis in a defined chromosomal replicon. *Mol Cell Biol.* 14: 1901-8, 1994.
311. Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little J B. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 66: 373-9, 1994.
312. Bache M, Dunst J, Wurl P, Frode D, Dietzel M, Meye A, Schmidt H, Rath F W, Wohlrab W, Dralle H, Taubert H. Radiation induced G2/M block and apoptosis in two human sarcoma cell lines with different p53 gene status. *Int J Oncol.* 11: 993-997, 1997.
313. Su L N, Little J B. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T- antigen. *Radiat Res.* 133: 73-9, 1993.
314. Weinert T A, Hartwell L H. Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Mol Cell Biol.* 10: 6554-64, 1990.
315. McKenna W G, Iliakis G, Weiss M C, Bernhard E J, Muschel R J. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res.* 125: 283-7, 1991.
316. Soldatenkov V A, Prasad S, Notario V, Dritschilo A. Radiation-induced apoptosis of Ewing's sarcoma cells: DNA fragmentation and proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res.* 55: 4240-2, 1995.
317. Kuerbitz S J, Plunkett B S, Walsh W V, Kastan M B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 7491-5, 1992.
318. Guillouf C, Rosselli F, Krishnaraju K, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann D A. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 10: 2263-70, 1995.
319. Li R Z, Sutphin P D, Schwartz D, Matas D, Almog N, Wolkowicz R, Goldfinger N, Pei H P, Prokocimer M, Rotter V. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene.* 16: 3269-3277, 1998.

320. Zhan Q M, Kontny U, Iglesias M, Alamo I, Yu K, Hollander M C, Woodworth C D, Fornace A J. Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. *Oncogene*. 18: 297-304, 1999.
321. Livingstone L R, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty T D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 70: 923-35, 1992.
322. Olive P L, Durand R E. Apoptosis: An indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol*. 71: 695-707, 1997.
323. Filippovich I V, Sorokina N I, Robillard N, Chatal J F. Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids. *Int J Cancer*. 72: 851-859, 1997.
324. Matthews J B, Harrison A, Palcic B, Skov K. Automated fluorescence microscopic measurement of apoptosis frequency following ionizing radiation exposure in cultured mammalian cells. *Int J Radiat Biol*. 73: 629-639, 1998.
325. Meyn R E, Stephens L C, Hunter N R, Milas L. Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 33: 410-4, 1994.
326. Meyn R E, Stephens L C, Hunter N R, Milas L. Kinetics of cisplatin-induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 60: 725-9, 1995.
327. Mitsuhashi N, Ishikawa H, Saito Y, Takahashi T, Sakurai H, Nozaki M, Akimoto T, Hasegawa M, Maebayashi K, Niibe H. A quantitative study of radiation-induced apoptosis in two rat yolk sac tumour cell lines with different radiosensitivities in vitro. *Anticancer Res*. 17: 3605-3608, 1997.
328. Hendry J H, West C M L. Apoptosis and mitotic cell death: Their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol*. 71: 709-719, 1997.
329. Radford I R, Murphy T K. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Biol*. 65: 229-39, 1994.
330. Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi M J, Nowak N, Zabel B, Adam M, Aguiar M C, Grundy P, Shows T, Pelletier J. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet*. 7: 91-7, 1994.
331. Guillouf C, Rosselli F, Sjin R T T, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann D A. Role of a mutant p53 protein in apoptosis: characterization of a function independent of transcriptional trans-activation. *Int J Oncol*. 13: 107-114, 1998.
332. Haimovitz-Friedman A, Kan C C, Ehleiter D, Persaud R S, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick R N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med*. 180: 525-35, 1994.

333. Hannun Y A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*. 274: 1855-9, 1996.
334. Weichselbaum R R, Dahlberg W, Little J B. Inherently radioresistant cell exist in some human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 4732-4735, 1985.
335. Weichselbaum R R, Dahlberg W, Beckett M, Karrison T, Miller D, Clark J, Erwin T H. Radiation-resistant and repair-proficient human tumor cell may be associated with radiotherapy failure in Head and Neck cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 2684-2688, 1986.
336. Sun J, Chen Y, Li M T, Ge Z L. Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radical Biol Med*. 24: 586-593, 1998.
337. Shimizu T, Iwanaga M, Yasunaga A, Urata Y, Goto S, Shibata S, Kondo T. Protective role of glutathione synthesis on radiation-induced DNA damage in rabbit brain. *Cell Mol Neurobiol*. 18: 299-310, 1998.
338. Yamaoka K, Kojima S, Takahashi M, Nomura T, Iriyama K. Change of glutathione peroxidase synthesis along with that of superoxide dismutase synthesis in mice spleens after low-dose X-ray irradiation. *Biochim Biophys Acta*. 1381: 265-70, 1998.
339. Stammer G, Pommerenke E W, Mattern J, Volm M. Effects of single doses of irradiation on the expression of resistance-related proteins in murine NIH 3T3 and human lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 16: 2051-5, 1995.
340. Jaskula-Sztul R, Reinikainen M, Husgafvel-Pursiainen K, Szmaja Z, Szyfter W, Szyfter K, Hirvonen A. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and susceptibility to smoking related larynx cancer. *Biomarkers*. 3: 149-155, 1998.
341. Miyara H, Hida T, Nishida K, Takahashi T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Morishita M, Takahashi T, Ueda R. Modification of chemo-radiosensitivity of a human lung cancer cell line by introduction of the glutathione S-transferase pi gene. *Jpn J Clin Oncol*. 26: 1-5, 1996.
342. Tanita J, Tsuchida S, Hozawa J, Sato K. Expression of glutathione S-transferase-pi in human squamous cell carcinomas of the pharynx and larynx. Loss after radiation therapy. *Cancer*. 72: 569-76, 1993.
343. Hayes J D, Pulford D J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 30: 445-600, 1995.
344. Sundberg K, Johansson A S, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*. 19: 433-6, 1998.
345. Hida T, Ariyoshi Y, Kuwabara M, Sugiura T, Takahashi T, Takahashi T, Hosoda K, Niitsu Y, Ueda R. Glutathione S-transferase pi levels in a panel of lung cancer cell lines and its relation to chemo-radiosensitivity. *Jpn J Clin Oncol*. 23: 14-9, 1993.

346. Stammer G, Pommerenke E W, Masanek U, Mattern J, Volm M. Messenger RNA expression of resistance factors in human tumor cell lines after single exposure to radiation. *J Exp Ther Oncol. 1*: 39-48, 1996.
347. Oberley T D, Coursin D B, Cihla H P, Oberley L W, El-Sayyad N, Ho Y S. Immunolocalisation of manganese superoxide dismutase in normal and transgenic mice expressing the human enzyme. *Histochem J. 25*: 267-279, 1993.
348. Yanagisawa T, Urade M, Takahashi Y, Yamamoto Y, Furuyama J. Levels of superoxide dismutases, glutathione, and poly(ADP-ribose) polymerase in radioresistant human KB carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res. 88*: 1070-1077, 1997.
349. Scott M D, Meshnick S R, Eaton J W. Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J Biol Chem. 264*: 2498-501, 1989.
350. Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian M G. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology. 132*: 85-98, 1999.
351. Hansen C, Ablett E, Green A, Sturm R A, Dunn I S, Fairlie D P, West M L, Parsons P G. Biphasic response of the metallothionein promoter to ultraviolet radiation in human melanoma cells. *Photochem Photobiol. 65*: 550-5, 1997.
352. Shiraishi N, Yamamoto H, Takeda Y, Kondoh S, Hayashi H, Hashimoto K, Aono K. Increased metallothionein content in rat liver and kidney following X- irradiation. *Toxicol Appl Pharmacol. 85*: 128-34, 1986.
353. Shiraishi N, Hayashi H, Hiraki Y, Aono K, Itano Y, Kosaka F, Noji S, Taniguchi S. Elevation in metallothionein messenger RNA in rat tissues after exposure to X-irradiation. *Toxicol Appl Pharmacol. 98*: 501-6, 1989.
354. Koropatnick J, Leibbrand M, Cherian M G. Organ-specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiat Res. 119*: 356-65, 1989.
355. Fornace A J, Jr., Schalch H, Alamo I, Jr. Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol Cell Biol. 8*: 4716-20, 1988.
356. Matsubara J, Shida T, Ishioka K, Egawa S, Inada T, Machida K. Protective effect of zinc against lethality in irradiated mice. *Environ Res. 41*: 558-67, 1986.
357. Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M. Metallothionein induction as a potent means of radiation protection in mice. *Radiat Res. 111*: 267-75, 1987.
358. Matsubara J, Tajima Y, Karasawa M. Promotion of radioresistance by metallothionein induction prior to irradiation. *Environ Res. 43*: 66-74, 1987.
359. Shiraishi N, Aono K, Utsumi K. Increased metallothionein content in rat liver induced by X irradiation and exposure to high oxygen tension. *Radiat Res. 95*: 298-302, 1983.
360. Sutherland R M, McCredie J A, Inch W R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst. 46*: 113-20, 1971.

Annexes

Liste des figures

- Figure 1 : Risque Relatif de cancer de l'hypopharynx en fonction du niveau d'association alcool-tabagique (d'après Tuyns et al., 1988 (10)). 18
- Figure 2 : Coupe sagittale et localisation anatomique des voies aéro-digestives supérieures. 23
- Figure 3: Courbes de survie cellulaire. Le taux de survie cellulaire est déterminé expérimentalement pour différentes doses, la courbe passant au mieux par ces points est tracée. Le taux de survie S est représenté en échelle logarithmique. (A) : Courbe de survie exponentielle (modèle à "une cible à un coup") réduite à une droite dans la représentation logarithmique. (B) : Courbe de survie sigmoïde (modèle à "n cibles à un coup") qui présente une partie incurvée (épaule) suivie d'une partie exponentielle. La dose létale moyenne (D_0) désigne la dose qui dans la partie exponentielle réduit la fraction de cellules de $1/e$ soit 37%. Le nombre d'extrapolation (n) correspond au nombre de cibles. D_q est la dose "quasi-seuil" et représente la dose "perdue" au début d'une séance d'irradiation. 36
- Figure 4 : Courbe de survie cellulaire correspondant au modèle à deux composantes. Cette courbe sigmoïde présente un épaulement et une partie exponentielle dont la pente est donnée par $(1/D_0 + 1/nD_0)$. Cette courbe diffère essentiellement à l'origine ou dans la région de l'épaulement : alors que la tangente à l'origine est horizontale dans le modèle à "n cibles à un coup", elle présente dans ce modèle à deux composantes une pente définie par $-1/D_0$ qui est d'autant plus marquée que la composante létale d'emblée est plus importante. 38
- Figure 5: (A) : Le modèle linéaire et quadratique. La mort cellulaire peut être produite par deux types d'événements: des lésions directement létales qui conduisent à un taux de survie $e^{-\alpha D}$ (ou $e^{-\alpha D/D_0}$); l'accumulation de lésions sublétales représentée dans l'expression linéaire quadratique par $e^{-\beta D^2}$. (B) : La dose moyenne d'inactivation représentée par l'aire sous la courbe de survie et calculée à partir du modèle LQ. 40
- Figure 6 : Radiolyse de l'eau. D'après Dutreix et al., Biophysique des radiations et imagerie médicale. Masson, 1993. 56
- Figure 7 : Production d'espèces réactives de l'oxygène. 57
- Figure 8: Voies d'élimination de l'ion superoxyde. D'après Oberley et al., 1979 (93). 58
- Figure 9 : Voies de synthèse (- - -) et de sauvetage (—) du glutathion. 59
- Figure 10 : Implications de la GPx et de la GR dans la détoxification des ERO. La GPx permet l'oxydation du glutathion en GSSG et la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, la GR effectue l'opération inverse pour le glutathion mais en présence de NADPH qui est oxydé en $NADP^+$ 62

<i>Figure 11 : Les phases du cycle cellulaire avec les points de contrôle en G₁/S et G₂/M.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 12 : Transition G₁/S normale (en rouge) et arrêt après irradiation (en bleu). La régulation mdm2/p53 est représentée en vert.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 13 : Transition G₂/M normale (en rouge) et arrêt après irradiation (en bleu). D'après Hwang et al., 1998 (112).....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 14 : Système Base Excision Repair. D'après Wallace et al., 1998 (90).</i>	<i>74</i>
<i>Figure 15 : Les différents types de morts cellulaires radio-induites et les voies d'induction. 78</i>	
<i>Figure 16 : Aspects morphologiques de l'apoptose (d'après Kerr et al., 1972 (138))......</i>	<i>80</i>
<i>Figure 17 : Comparaison morphologique de la nécrose et de l'apoptose.</i>	<i>83</i>
<i>Figure 18 : Voies possibles d'induction de l'apoptose radio-induite. Les radiations agissent directement au niveau membranaire et nucléaire ou indirectement par la production d'espèces réactives de l'oxygène.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 19 : Structure et particularités du sphéroïde. Des gradients se mettent en place ce qui provoque l'apparition d'une nécrose centrale.</i>	<i>92</i>
<i>Figure 20 : Cinétique de croissance des sphéroïdes.</i>	<i>99</i>
<i>Figure 21 : Structure chimique du MTT et de son produit de transformation</i>	<i>113</i>
<i>Figure 22 : Exemple de migration d'ARN totaux après extraction et présence des ARNr 18S et 28S.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 23 : Optimisations de la co-amplification du gène de la GST-π et de la β2-microglobuline.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 24 : Schéma de principe du poste de microscopie de fluorescence et d'analyse d'image.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 25 : Courbes de survie de la lignée KB et de la fraction survivante KB^m.....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 26 : Courbes de survie des clones KB^{m2, 5, 13}</i>	<i>134</i>
<i>Figure 27 : Courbes de survie des clones KB^{m1, 8, 12}</i>	<i>135</i>
<i>Figure 28 : Courbe de survie des clones KB^{m3, 6, 7, 9}</i>	<i>136</i>
<i>Figure 29 : Courbes de survie de la lignée FaDu et des fractions survivantes FaDu^{m20, 72} ..</i>	<i>137</i>
<i>Figure 30 : Durée de la phase S des lignées et des clones.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 31 : Labelling Index des lignées et des clones.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 32 : Temps potentiel de doublement.....</i>	<i>141</i>

<i>Figure 33 : Temps de doublement déterminés par test MTT.</i>	<i>142</i>
<i>Figure 34 : Pertes cellulaires pour KB, KB^m et les clones. Elles sont calculées selon la formule : $1-(T_{pot}/T_d)$.....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 35 : Taux d'expression basal de l'ARNm de p53 dans KB et les clones.....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 36 : Exemple de cinétique d'amplification du gène p53 dans le clone KB^{m5} après irradiation à 2 et 4 Gy.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 37 : Cinétique d'expression l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy. Les valeurs sont le ratio d'expression relative (RER) de l'ARNm de p53/ARNm de la b2-microglobuline (T=48 h non représenté).....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 38 : Cinétique du RER normalisé de l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy. Les valeurs sont le ratio d'expression relative (RER) de l'ARNm de p53/ARNm de la β2-microglobuline (T=48 h non représenté).....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 39 : Exemple d'immuno-détection de la protéine p53 après irradiation à 2 et 4 Gy dans KB^{m5}.</i>	<i>159</i>
<i>Figure 40 : Répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire.....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 41 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour FaDu, FaDu^{m20}, FaDu^{m72}, KB et KB^m.</i>	<i>164</i>
<i>Figure 42 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour les clones KB^{m1} à KB^{m6}.</i>	<i>166</i>
<i>Figure 43 : Cinétique d'évolution des phases du cycle cellulaire après irradiation à 2 Gy pour les clones KB^{m7} à KB^{m13}.</i>	<i>168</i>
<i>Figure 44 : Cytogramme schématique lors de la détection des cellules apoptotiques, nécrotiques et viables par marquage Acridine Orange-Bromure d'éthidium..</i>	<i>180</i>
<i>Figure 45 : Cinétique d'apoptose et de nécrose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy (en pourcentages relatifs).</i>	<i>183</i>
<i>Figure 46 : Observation au microscope à fluorescence de l'induction d'apoptose dans le clone KB^{m5} après marquage au Hœchst 33342 (G=100x). A : Exemples de critères morphologiques de l'apoptose utilisés ; B : cellules KB^{m5} témoins à 96 heures de culture ; C : cellules KB^{m5} 96 heures après irradiation à 2 Gy ; D : cellules KB^{m5} 96 heures après irradiation à 2 Gy.</i>	<i>185</i>
<i>Figure 47 : Exemple d'analyse en RT-PCR de l'expression basale de GST-μ (A) et GST-π (B) dans les clones. Première ligne : marqueur de poids moléculaires (MW), seconde et troisième lignes : contrôles négatif (-) et positif (+). Le témoin positif de GST-μ a été préparé à partir de l'ADNc d'un donneur anonyme en bonne</i>	

santé. Le témoin positif de GST- π a été préparé à partir de l'ADNc de la lignée leucémique humaine K562 qui a une forte expression d'ARNm de GST- π . Les PCR semi-quantitative de GST- μ ou GST- π ont été réalisées avec une amplification concomitante du gène de la β 2-microglobuline comme gène de référence. Les produits de RT-PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'amplification du gène de la β 2-microglobuline produit un fragment de 120 bp. Tous les essais ont été réalisés en « triplicate » et répétés au moins trois fois. 194

Figure 48 : Représentation graphique des Ratio d'Expression Relatif de l'ARNm de GST- μ et GST- π sans irradiation. 196

Figure 49 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la GST- π dans le clone KB^{m12} après irradiation à 2 et 4Gy. 198

Figure 50 : Immuno-blots de la GST- π sur KB, KB^{m5} et KB^{m12}. 199

Figure 51 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy. 201

Figure 52 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy. 201

Figure 53 : Immuno-blots de la MnSOD sur KB, KB^{m5} et KB^{m12}. 202

Figure 54 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 Gy. 203

Figure 55 : Cinétique d'expression de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 4 Gy. 204

Figure 56 : Immuno-blots de la MT2A sur KB, KB^{m5} et KB^{m12}. 204

Figure 57 : Organigramme fonctionnel du logiciel d'analyse d'image. 217

Figure 58 : Schéma vue de profil du prototype du compteur de sphéroïde. 220

Figure 59: Schéma vue de profil du prototype du compteur de sphéroïde. 221

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Estimations de la morbidité et de la mortalité par cancers totaux et cancers des VADS sur la population Française en 1995 (d'après Ménégoz et al. (2)).</i>	16
<i>Tableau 2 : Classification TNM des cancers des VADS selon l'AJCC, 1988.</i>	24
<i>Tableau 3 : Equivalence entre stades cliniques et TNM des cancers des VADS.</i>	24
<i>Tableau 4 : Propriétés des différents rayonnements ionisants</i>	34
<i>Tableau 5 : Localisation et fonctions des principaux complexes Cdk-cyclines impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire après irradiation.</i>	66
<i>Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose.</i>	82
<i>Tableau 7 : Caractéristiques des caspases (CARD : Caspase Recruitment Domain, DED : Death Effector Domain). D'après Zhivotovsky et al., 1999 (143).</i>	87
<i>Tableau 8 : Conditions de co-amplification des gènes étudiés. Les colonnes en grisé comportent les paramètres optimisés.</i>	118
<i>Tableau 9 : Composition du tampon RIPA.</i>	120
<i>Tableau 10 : Composition du « PIC » (Protease Inhibitor Cocktail) 500 x.</i>	121
<i>Tableau 11 : Composition des gels de polyacrylamide (2 gels).</i>	122
<i>Tableau 12 : Composition du tampon TGS de migration.</i>	123
<i>Tableau 13 : Composition des tampons de transfert 10x et 1x.</i>	123
<i>Tableau 14 : Composition du tampon TBST.</i>	124
<i>Tableau 15 : Conditions de détection des protéines étudiées.</i>	125
<i>Tableau 16 : Paramètres de radiosensibilités de KB, KB^m et des clones issus de KB^m. Les paramètres α, β, SF₂ et MID sont calculés selon le modèle linéaire et quadratique. Les écarts-type sont notés entre parenthèse.</i>	132
<i>Tableau 17 : Paramètres de radiosensibilités de FaDu, FaDu^{m20} FaDu^{m72}.²</i>	136
<i>Tableau 18 : Paramètres de prolifération cellulaire de KB et des clones. Les valeurs sont les moyennes obtenues à partir d'au moins 4 séries de mesures.</i>	138
<i>Tableau 19 : Paramètres de prolifération cellulaire de FaDu et des fractions survivantes. Les valeurs sont les moyennes obtenues à partir d'au moins 4 séries de mesures.</i>	139

<i>Tableau 20 : Cinétique du Ratio d'Expression Relative (RER) de l'ARNm du gène p53 dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.</i>	<i>156</i>
<i>Tableau 21 : Répartition dans les phases du cycle cellulaire de KB, KB^m et des clones. Les valeurs sont la moyenne et l'écart-type résultants d'au moins 4 séries d'expériences.</i>	<i>160</i>
<i>Tableau 22 : Répartition dans les phases du cycle cellulaire de FaDu, FaDu^{m20} et FaDu^{m72}. Les valeurs sont la moyenne et l'écart-type résultants d'au moins 4 séries d'expériences.</i>	<i>161</i>
<i>Tableau 23 : Pourcentages relatifs d'apoptose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy.</i>	<i>181</i>
<i>Tableau 24 : Pourcentages relatifs de nécrose radio-induite dans la lignée KB et les clones KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation gamma à 2 et 4 Gy.</i>	<i>182</i>
<i>Tableau 25 : Ratio d'expression relative basale de l'ARNm de GST-μ et GST-π dans KB, KB^m et les clones.</i>	<i>195</i>
<i>Tableau 26 : RER normalisés de l'ARNm de la GST-π dans le clone KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.</i>	<i>197</i>
<i>Tableau 27 : RER normalisés de l'ARNm de la MnSOD dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.</i>	<i>200</i>
<i>Tableau 28 : RER normalisés de l'ARNm de la MT2A dans KB, KB^{m5} et KB^{m12} après irradiation à 2 et 4 Gy.</i>	<i>203</i>

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluoro-uracile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-PK (cs)	ADN-protein kinase (catalytic subunit)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AP-1	Activator Protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
API	Application Programming Interface
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribo nucléique
ARNm	ARN messenger
ARNtx	ARN totaux
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia-2
BER	Base excision repair
BrdU	Bromo-désoxy Uridine
BSA	Bovin serum albumin
BSO	Buthionine Sulfoximine
CAK	Cdk-activating kinase
CARD	Caspase recrutement domain
CBF	CCAAT box Binding Factor
Cdc	Cycle dependent cyclin
CDDP	Cis-diaminedichloroplatine (ci-platine)
Cdk	Cyclin dependent kinase
Da	Dalton
DED	Death effector domain
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	désoxyribonucléotide tri phosphate
DO	Densité optique
E2F	Elongation 2 Factor
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
EMSA	Acide éthylméthyle sulfonique
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FADD	Fas-Associated Death Domain

Fas	Apo-1/CD95
FasL	FasLigand
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage inducible
γ-GCS	gamma glutamylcystéine synthétase
γ-GT	gamma glutamyl transférase
GP	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	γ-glutamylcystéine-glycine
GST	Glutathion S-Transférase
Gy	Gray
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Human Papilloma Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Protease
IP	Iodure de propidium
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JNK	c-Jun amino terminal Kinase
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LI	Labelling Index
LQ	Linear-Quadratic
MAPKs	Microtubule-associated protein kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation
Mdm2	Murine double minute 2
MDR	Multidrug resistance
MID	Mean Inactivation Dose
MnSOD	Superoxide dismutase manganèse dépendante
MPF	Maturation Promoting Factor
MT2A	Métallothionéine
MTT	bromure (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NADPH	Nicotinamide-Adénine-dinucléotide-Phosphate-Hydrogène
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NI	Nombre inducteur
O6-MGMT	O6-méthyl guanine méthyl transférase
oligodT	oligodésoxyribonucléotides de thymidine
PARP	Poly-ADP-ribose polymérase
pb	paire de bases

PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymérase Chain Reaction
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKC	Protein Kinase C
PLD	Lésions potentiellement létales
PM	Poids Moléculaire
PMSF	Polyméthylsulfonyle fluoride
PTMG	Preclinical Therapy Model Group
PVDF	Polyvinylidène Fluoride
Rb	Rétinoblastome
RER	Ratio d'Expression Relatif
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV₂	Residual Spheroid Volume at 2 Gy
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SAPKs	Stress-Activated Protein Kinase
SCD₅₀	Spheroid Cure Dose at 50%
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SF₂	Surviving Fraction at 2 Gy
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TBE	Tris-borate-EDTA
TBP	TATA box Binding Protein
TCD₅₀	Tumor Control Dose at 50%
TEL	Transfert d'énergie linéaire
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TGS	Tris Glycine SDS
TK	Thymidine Kinase
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TNM	Tumor Node Metastasis
TPCK	N-Tosyle-L-phénylalanine chlorométhyle
Tpot	Temps potentiel de doublement
TUNEL	TdT mediated digoxigenin-dUTP Nick and End Labelling
U.V.	Ultra-Violet
VADS	Voies aéro-digestives supérieures
WAF-1	Wild type p53-Activated Factor-1
YAG	Yttrium Aluminium Garnet

Liste des publications et communications

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C. *Modifications de l'expression des gènes GST- μ et p53 dans les lignées tumorales humaines O.R.L. après irradiation gamma : induction, études cellulaires et moléculaires.* Journal de Chimie Physique (1998) 95, 718-723.

Dubessy C., Merlin J.-L., Colosetti P., Marchal C. *Clonal heterogeneity of glutathione S-transferase (μ , π) mRNA expression in head and neck tumor cells selected after irradiation.* Soumis à Life Sciences.

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C., F. Guillemin. *Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy.* Soumis à Critical Review in Oncology.

Communications avec publication de résumé

Dubessy C., Griffon-Etienne G., Merlin J.-L., Marchal C. *Intérêt de l'utilisation de sphéroïdes tumoraux multicellulaires pour l'étude de la radiorésistance des tumeurs humaines.* IX^e Colloque International de Pont-A-Mousson, Eurobiologie. 29 Septembre-3 Octobre 1996 ; Pont-à-Mousson, France. Médecine/Sciences (1996) 12, L 167, 83.

C. Dubessy, J-L Merlin, C Marchal. *Variations d'expression de trois gènes dans une lignée cellulaire tumorale ORL après irradiation gamma.* 8^e Congrès National de la Société Française de Radiothérapie Oncologique. 20-21 Novembre 1997 ; Paris. Cancer/Radiothérapie (1997) 1, 5, 505.

C. Marchal, C. Dubessy, G. Dolivet, J.-L. Merlin. *Recherche d'une radiorésistance induite.* 8^e Congrès National de la Société Française de Radiothérapie Oncologique. 20-21 Novembre 1997 ; Paris. Cancer/Radiothérapie (1997) 1, 5, 504.

Dolivet G., Dubessy C., Colosetti P., Bour C., Gramain M.-P., Parache R.M., Depardieu C., Barberi-Heyob M., Behr J.-P., Merlin J.-L. *The interest of polyethylenimine for non viral gene*

transfer in head and neck squamous cell carcinoma. In vivo and ex vivo results. European Journal of Surgical Oncology Vol 24, N° 3 June 1998 p206.

Dubessy C., Merlin J.-L., Bour C., Gramain M.-P., Marchal S., Becuwe P., Dauça M., Marchal C. *Cell cycle arrest, apoptosis induction and superoxide dismutase (MnSOD) mRNA expression in head and neck cancer cell lines selected after exposure to ionizing radiations.* Proceedings of the American Association for Cancer Research. Ninetieth annual meeting. April 10-14, 1999, Philadelphia, PA, USA.

M. Barberi-Heyob, S. Drouard, J.L. Merlin, D. Bagrel, M. Dauça, G. Dolivet, C. Dubessy, L. Geoffrois, C. Vigneron, S. Wagner, M. Wellman, T. Conroy. Molecular Markers for Response Prediction to Anticancer Treatments Group. *Thymidylate synthase and MRP mRNA expression in tumor and healthy tissue as markers for response prediction in head and neck squamous cell carcinoma.* ASCO. 35th Annual Meeting, May 15-18, 1999, Atlanta, GA, USA.

Présentations

Dubessy C., Merlin J.-L., Marchal C. *Modifications de l'expression des gènes GST- μ et p53 dans les lignées tumorales humaines O.R.L. après irradiation gamma : induction, études cellulaires et moléculaires.* Troisième Colloque de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Sophia-Antipolis, 15-20 Juin 1997 ; Nice, France.

C. Dubessy, J.-L. Merlin, C. Marchal. *Glutathione S-Transferase (μ , π) expression in radioresistant head and neck tumor monoclonal cell cultures.* EORTC, Pharmacology and molecular Mechanisms Group, Winter Meeting. January 21-24th 1998 ; Nancy, France.

M. Barberi-Heyob for the Research Group on Molecular Markers for Resistance to Anticancer Treatments. *Expression of resistance genes in tumor and healthy tissues from patients with squamous cell carcinoma of the upper aero-digestive tract.* EORTC, Pharmacology and molecular Mechanisms Group, Winter Meeting. January 21-24th 1998 ; Nancy, France.

Dolivet G., Dubessy C., Colosetti P., Bour C., Gramain M.-P., Parache R.M., Depardieu C., Zanta A., Behr J.-P., Merlin J.-L. *Interest of polyethylenimine (PEI) for non viral gene transfer in head and neck squamous cell carcinoma : preliminary results.* EORTC,

Pharmacology and molecular Mechanisms Group, Winter Meeting. January 21-24th 1998 ; Nancy, France.

Dubessy C., Merlin J.L., Marchal C. *Expression basale des GST- μ et π dans des clones issus d'une lignée cellulaire ORL après irradiation fractionnée.* XVIII^{ème} Forum de Cancérologie. 2-3 Juin 1998 ; Paris, France.

G. Dolivet, C. Dubessy, P. Colosetti. *Intérêt de la polyéthylèneimine (PEI) pour les transferts non viraux de gènes dans des cellules de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Résultats préliminaires.* XVIII^{ème} Forum de Cancérologie. 2-3 Juin 1998 ; Paris, France.

G. Dolivet, C. Dubessy, J.L. Merlin, P. Colosetti, C. Depardieu, A. Zanta, O. Boussif, R.M. Parrache, J.P. Behr. *Local gene therapy in Head and Neck squamous cell carcinomas. Preliminary results of a non viral transfection method using polyethylenimine (PEI).* ESSO'98 – 9th Congress of the European Society of Surgical Oncology. June 3-6, 1998 ; Lausanne, Switzerland.

G. Dolivet, C. Dubessy, P. Colosetti, C. Bour, M. Barberi-Heyob, R.M. Parrache, C. Depardieu, J.P. Behr, J.L. Merlin. *Non viral Polyethylenimine (PEI) mediated gene transfert in Head and Neck squamous cell carcinoma. Interest of a high pressure injection device.* Fifth Research Workshop on the Biology, Prevention and Treatment of Head and Neck Cancer. August 27-30, 1998 ; McLean, Virginia, USA.

G. Dolivet, E. Festor, C. Dubessy, M. Barberi-Heyob, J.L. Merlin. *Transfert de gènes dans les cellules de carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures.* Intérêt de la polyéthylèneimine. Société ORL de l'Est de la France. Mulhouse 10-11 Septembre 1999.

G. Dolivet, E. Festor, C. Dubessy, S. Marchal, C. Ramacci, F. Baylac, C. Depardieu, M. Barberi-Heyob, J.L. Merlin, J.-P. Behr. *Galenic and molecular optimization of gene transfer with polyethylenimine in head and neck squamous cell carcinoma.* Management of Head and Neck Tumors, What are the challenges for the Third Millenium. 3-4 Décembre 1999, Bruxelles.

Modifications de l'expression des gènes GST- μ et p53 dans des lignées tumorales cellulaires humaines O.R.L. après irradiation gamma : induction, études cellulaires et moléculaires

C. Dubessy^{1,*}, J.L. Merlin¹ et C. Marchal²

¹ *Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

² *Service de Radiothérapie, Centre Alexis Vautrin, avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

* *Correspondance et tirés à part.*

RÉSUMÉ

Nous avons isolé des sous-populations de 2 lignées cellulaires humaines (KB et FaDu) de carcinomes des voies aéro-digestives supérieures survivant à de fortes doses d'irradiation. La fraction survivante KB^m a été obtenue après exposition à un agent mutagène et à une irradiation, FaDu^m résulte de l'irradiation progressive de FaDu. Une analyse par RT-PCR semi-quantitative nous a permis de mettre en évidence une surexpression significative des gènes GST- μ et p53 pour les souches KB^m et FaDu^m analysées après 18 mois de culture. Les paramètres, α , β , SF2, MID, déterminés par essais clonogéniques, n'indiquent pas de modification de la radiosensibilité. Les variations d'expression observées ne sont donc pas corrélées à une variation de radiosensibilité. La surexpression des gènes GST- μ et p53 ne semble pas constituer un marqueur de radiosensibilité.

Mots clés : p53, GST- μ , marqueurs de radiosensibilité, lignées cellulaires tumorales O.R.L.

ABSTRACT

Cell sub-populations surviving to high radiation doses were selected. The KB^m survival part was obtained by exposure to a mutagenic agent and irradiation, FaDu^m results of a progressive irradiation of FaDu. A semi-quantitative RT-PCR analysis revealed a significant overexpression of GST- μ and p53 genes for KB^m and FaDu^m cell lines that remained stable for 18 months. The SF2, α , β , and MID parameters, determined by clonogenic assays, show no modifications of radiosensitivity. The

variations of expression observed are not correlated to a radiosensitivity variation. The overexpression of GST- μ and p53 does not seem to be a radiosensitivity marker.

Key words : p53, GST- μ , radiosensitivity markers, Head and Neck tumor cell lines.

INTRODUCTION

Chaque année, 500 000 nouveaux cas de cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) sont décelés dans le monde et entraînent la mort de 27% des patients. Les principaux facteurs de risque sont l'alcool et le tabac ainsi que les aliments fumés et certains virus . Globalement, on observe 15 à 20% de récives tumorales dans les 2 ans qui suivent le traitement, qui reste essentiellement chirurgical ou radio-chirurgical [1]. Après radiothérapie, ces tumeurs peuvent présenter une résistance aux radiations ionisantes ce qui compromet les chances de contrôle tumoral. Cette résistance peut être induite par le traitement mais peut être également due à des cellules tumorales intrinsèquement radiorésistantes non détruites par les radiations ionisantes [2-6]. Parmi les multiples causes de cette résistance, on peut notamment citer l'influence de la déplétion en oxygène intratumoral [7]. Des mutations ou des variations d'expressions de gènes sont également à l'origine d'une variation de la radiorésistance. Ainsi plusieurs auteurs ont rapportés et étudiés le rôle des gènes impliqués dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène et le cycle du glutathion tels que les super oxyde dismutases [8], la glutathion peroxydase [9] et les glutathion-S-transférases [10]. Tew [11] a décrit l'importance de la surexpression de l'isotype μ de la GST dans la radiorésistance. Celle-ci peut également être due à une diminution du taux cellulaire d'apoptose attribuée à des déficiences de la transduction de ce signal [12], à une mutation ou une variation d'expression des quelques gènes, notamment p53 et Bcl-2 [13]. Nous nous proposons donc d'étudier le rôle de l'expression de ces deux gènes, GST- μ et p53, dans la sensibilité aux radiations ionisantes de lignées tumorales des VADS.

MATERIELS ET METHODES

Lignées cellulaires - KB et FaDu sont des lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale et du pharynx qui nous ont été fournies par le Pr. Hanuske (Université de Munich). Les cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) selon les spécifications décrites par Griffon [14].

Traitements - Des cellules KB sont mises en contact 18 h avec de l'acide éthylméthyle sulfonique (EMSA) à 2,4 mM (Sigma, St Quentin Fallavier). Après 10

jours de culture, la fraction survivante est irradiée à 5 fois 2 Gy sur une période de 5 jours à l'aide d'un Théatron 780C ^{60}Co (Theratronics, Ottawa, Canada) à 1,53 Gy/min. La fraction survivante KB^m est maintenue en culture. Des cellules FaDu en phase exponentielle de croissance sont irradiées tous les 10 jours à 4 Gy jusqu'à la dose totale de 20 Gy. La fraction survivante FaDu^m est maintenue en culture.

RT-PCR semi-quantitative des gènes GST- μ et p53 - Les ARNm, extraits selon la méthode de Chomczynski [15] à l'aide de TRIzol (GibcoBRL), sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide de la SuperScript II et d'amorces aléatoires. L'expression des gènes GST- μ et p53 est évaluée par rapport à celle de la β 2-microglobuline. Les conditions de PCR de p53 ont été adaptées à partir de celles décrites par Aguilar-Santelises [16]. Les échantillons sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% et TBE 0,5x (100V, 30 min), colorés au bromure d'éthidium et visualisés en transillumination ultra-violette. La quantification est réalisée à l'aide d'un appareil Gel Doc (Molecular Analyst v1.2, Bio Rad) puis les résultats sont exprimés sous la forme du Rapport d'Expression Relative qui est le rapport de l'intensité de fluorescence des bandes du gène étudié sur celle de la β 2-microglobuline qui est le gène de référence d'expression constante.

Essais clonogéniques - Ils sont réalisés selon la méthode décrite par Griffon *et al.* [17]. Chaque point expérimental résulte du comptage de 3 séries de 3 puits. Le taux de survie est calculé par rapport aux témoins non irradiés, les courbes de survie sont analysées selon le modèle LQ [18].

RESULTATS

Taux d'expression des gènes GST- μ et p53 :

GST- μ - Il apparaît que GST- μ présente un RER de 1,05 par rapport à la β 2-microglobuline pour la fraction survivante KB^m, ce taux se situe à 0,70 pour la lignée mère KB. GST- μ est donc surexprimé 1,5 fois dans la lignée irradiée KB^m. Pour FaDu et FaDu^m, les RER sont respectivement de 0,03 et 0,46, la surexpression est donc de 15 fois dans la lignée FaDu^m.

p53 - Le gène p53 est surexprimé 11 fois dans KB^m par rapport à KB (RER respectifs de 0,02 et 0,23). De la même manière, p53 présente une surexpression d'environ 2 fois dans la fraction irradiée FaDu^m (0,04) par rapport à la lignée mère FaDu (0,07).

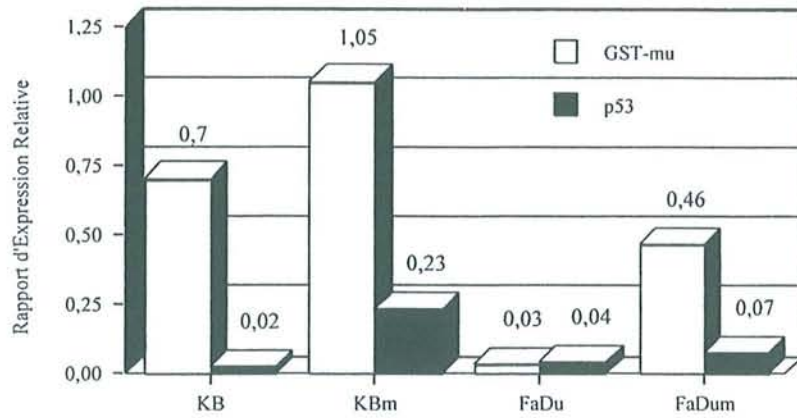


Fig. 1 : Ratio d'Expression Relatifs de GST- μ et p53. Les ARNm extraits des 4 lignées selon la méthode de Chomczynski et Sacchi sont rétro-transcrits en ADNc. Les transcrits des gènes GST- μ et p53 sont amplifiés par PCR avec le gène de la β 2-microglobuline et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en présence de bromure d'éthidium. L'intensité de fluorescence émise par le BET est quantifiée puis le Ratio d'Expression Relatif de chacun des gènes est calculé par rapport à l'expression de la β 2-microglobuline.

Radiosensibilité des lignées KB, KB^m, FaDu et FaDu^m

Les courbes et les paramètres calculés d'après le modèle LQ, nous indiquent que la résistance des deux lignées mères est relativement importante si on la compare aux données de la littérature.

KB et KB^m - Le paramètre α est significativement différent ($p < 0,1$) pour les deux lignées KB et KB^m. Par contre, les paramètres radiobiologiques β , SF2 et MID, ne nous permettent pas de mettre en évidence de différence de radiosensibilité.

FaDu et FaDu^m - Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les paramètres α , β , SF2 et MID des deux lignées.

Tableau I : Paramètres de radiosensibilité. Les courbes de survie sont ajustées selon le modèle Linéaire Quadratique : $S = e^{-\alpha D + \beta D^2}$. Les paramètres α et β sont calculés à partir de ce modèle. La SF2 est la fraction de survie à 2 Gy. La MID est la dose d'inactivation moyenne calculée en intégrant l'aire sous la courbe de survie.

Lignées	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	SF2	MID (Gy)
KB	0,115 ± 0,056	0,020 ± 0,004	0,738 ± 0,076	4,355 ± 0,673
KBm	0,050 ± 0,031	0,029 ± 0,017	0,804 ± 0,021	4,712 ± 0,684
FaDu	0,059 ± 0,000	0,017 ± 0,004	0,836 ± 0,014	5,565 ± 0,545
FaDum	0,082 ± 0,043	0,022 ± 0,005	0,779 ± 0,061	4,574 ± 0,497

DISCUSSION

Les deux types de traitement ont permis d'induire une surexpression des gènes GST- μ et p53. Cette modification est stable dans le temps puisque les analyses ont été réalisées 18 mois après les traitements ce qui indique que les cellules ont acquis une modification d'expression pour des gènes impliqués dans la radiosensibilité. Cette surexpression ne semble toutefois pas corrélée à une induction de radiorésistance. Malgré tout, la résistance initiale de KB et FaDu est trop importante pour être modifiée de manière significative. Ainsi, seul le paramètre α de KB^m (représentant la sensibilité aux faibles doses d'irradiation) est significativement différent de celui de KB ($p < 0,1$). L'induction d'une résistance pourrait certainement être réalisée mais à partir de lignées plus sensibles [19].

Récemment, des auteurs ont montrés l'importance de la transduction du signal dépendante de la protéine kinase C et de la Bruton's tyrosine kinase [20] dans la résistance aux radiations ionisantes. Bien que leurs fonctions ne soient pas parfaitement définies, il apparait que les mutations et les variations d'expression des gènes impliqués dans la réparation des cassures doubles-brin de l'ADN [21], tels que gadd45 [22], PARPP [23] ou DNA-PK [24] jouent un rôle essentiel dans cette résistance. L'étude du profil d'expression de ces gènes ainsi que ceux impliqués dans le détoxification des espèces réactives de l'oxygène (SOD [8], GST [10]) devrait permettre d'identifier des marqueurs de radiorésistance.

Il est nécessaire de confirmer ces modifications d'expression par des northern-blots dont la réalisation est actuellement en cours. De même, l'étude des protéines correspondantes par western-blots, notamment au niveau de la régulation post-traductionnelle ainsi qu'une recherche d'éventuelles mutations par PCR-SSCP, devrait permettre de préciser leur rôle dans la radiosensibilité. La surexpression des gènes GST- μ et p53 ne semble toutefois pas constituer un marqueur de sensibilité aux radiations ionisantes dans ces lignées O.R.L. irradiées.

REMERCIEMENTS

Etude soutenue par les comités départementaux de Meurthe et Moselle et de Haute Marne, la Ligue Nationale Contre Le Cancer, le Pôle Européen de Santé de Nancy.

REFERENCES

- 1 Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993) *N Engl J Med* **3**, 184-94.
- 2 Lambin P, Malaise EP, Joiner MC (1996) *Int J Radiat Biol* **69**, 279-90.
- 3 Joiner MC (1994) *Int J Radiat Biol* **65**, 79-84.
- 4 Weichselbaum RR, Dahlberg W, Beckett M, Karrison T, Miller D, Clark J, Erwin TH (1986) *Proc Natl Assoc Sci USA* **83**, 2684-8.
- 5 Weichselbaum RR, Dahlberg W, Little JB (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4732-5.
- 6 Weichselbaum RR, Beckett MA, Schwartz JL, Dritschilo A (1988) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **15**, 575-9.
- 7 Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J (1996) *Radiother Oncol* **41**, 31-9.
- 8 Oberley LW, Buettner GR (1979) *Cancer Res* **39**, 1141-9.
- 9 Liebmann J, Fisher J, Lipschultz C, Kuno R, Kaufman DC (1995) *Cancer Res* **55**, 4465-70.
- 10 Rushmore TH, Pickett CB (1993) *J Biol Chem* **16**, 11475-8.
- 11 Tew K D (1994) *Cancer Res* **54**, 4313-20.
- 12 Michael J M, Lavin M F, Watters D J (1997) *Cancer Res* **57**, 3600-5.
- 13 Chiarugi V, Ruggiero M (1996) *Tumori* **82**, 3, 205-9.
- 14 Griffon-Etienne G, Merlin J-L, Marchal C (1996) *Anti-Cancer Drugs* **7**, 660-70.
- 15 Chomczynski P, Sacchi N (1987) *Analytic Biochem* **162**, 156-9.
- 16 Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M (1996) *Int J Cancer* **69**, 114-9.
- 17 Griffon G, Merlin J-L, Marchal C (1995) *Anti-Cancer Drugs* **6**, 115-23.
- 18 Thames HD, Hendry JH (1987) *Fraction in radiotherapy*. London
- 19 Russel J, Wheldon TE, Stanton P (1995) *Cancer Res* **55**, 4915-21.
- 20 Uckun FM, Waddick KG, Mahajan S, Jun X, Takata M, Bolen J, Kurosaki T (1996) *Science* **273**, 1096-100.
- 21 Hu Q Y, Hill R P (1996) *Radiat Res* **146**, 6, 636-45.
- 22 Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride O W, Alamo I, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ (1991) *Mol Cell Biol* **2**, 1009-16.
- 23 Alaoui-Jamali M, Mitra S (1996) *Médecine/Sciences* **12**, 766-73.
- 24 Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, Hendrickson EA (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 1425-33.



LIFE SCIENCES

including Pharmacology Letters

Published by Elsevier Science Inc.
655 N. Alvernon Way, Suite 119
Tucson, Arizona 85711
Phone: (520) 321-7778
Fax: (520) 321-7781

July 14, 1999

Dr. Jean-Louis Merlin
Lab. de Recherche en Oncologie
Centre Alexis Vautrin
54511 Vandoeuvre-les-Nancy
France

RE: Manuscript #LS-0234-99

Dear Dr. Merlin,

Thank you for submitting your manuscript:

CLONAL HETEROGENEITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (MU, PI) mRNA
EXPRESSION IN HEAD AND NECK TUMOR CELLS SELECTED AFTER
IRRADIATION

to Life Sciences. Please include a reference to the manuscript number #LS-0234-99 in all communications with the journal offices regarding your paper.

Our recorded date of submission is 07/14/1999. You will be hearing from us as soon as possible with regards to the outcome of the review process.

Sincerely yours,

LIFE SCIENCES

CLONAL HETEROGENEITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (μ , π) mRNA EXPRESSION IN HEAD AND NECK TUMOR CELLS SELECTED AFTER IRRADIATION[†]

Christophe Dubessy*, Jean-Louis Merlin*, Pascal Colosetti*[°], Christian Marchal[†].

*Laboratoire de Recherche en Oncologie, [†]Département de Radiothérapie, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Summary

Impact of clonal heterogeneity on GST- μ / π basal mRNA expression and relationship with radiosensitivity was investigated in 13 cell clones isolated from KB^m polyclonal surviving fraction of KB human head and neck tumor cell line exposed to fractionated irradiation.

No difference in radiosensitivity was detected in KB^m as compared to KB, whereas GST- μ / π mRNA expression were significantly increased. In 12 clones, significant modifications in radiosensitivity were observed with high interindividual variations. GST- μ mRNA was moderately overexpressed (2.7 fold). GST- π mRNA varied from null to 32 fold of KB original value.

No significant correlation was observed between GST- μ / π basal mRNA expression levels and the radiosensitivity. Therefore high clonal heterogeneity make GST- μ / π basal mRNA expression level a bad predictive factor for radiosensitivity in KB model.

radioresistance, semi-quantitative RT-PCR, glutathione S-transferase μ and π , clonal heterogeneity.

Head and Neck cancer radioresistance is multifactorial and can be intrinsic (1) or acquired (2). Radiation resistance can be mediated by detoxification of reactive oxygen species, generated by ionizing radiation (3) and involving enzymes such as superoxide dismutase and glutathione dependent enzymes like glutathione S-transferase or glutathione. Glutathione S-transferases are dimeric phase II enzymes which allow the addition of the reduced thiol of glutathione on an electrophilic compound. In addition to a microsomal form, five cytosolic isotypes (α , μ , π , θ , σ) were identified and have been reported to be involved in oncogenesis and drug or radiation resistance (4). GST- α isotype, was reported to be related to resistance to nitrogen mustard (4). GST- μ and θ are known to be polymorphic in humans. Both polymorphisms are due to gene deletions, which are responsible for the existence of null genotypes. GST- μ null phenotype, present in 40 to 50% of the population, has been associated with tobacco smoke-induced head and neck cancer. GST- θ null phenotype has been reported as an increased risk factor for head and neck cancer (5). GST- π isotype has been associated to resistance to ionizing radiation and alkylating drugs (4). Mulder et al. (6) have reported the GST- π contribution to the inherent anti-cancer drug resistance in larynx and pharynx malignancies. Little is known about σ isotype which was reported to be implicated in chemicals detoxification (7). Generally, increase in GST expression has been reported to be linked to increased resistance to drug and ionizing radiation (8).

Corresponding Author : Dr. J.-L. Merlin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy, France. E-mail : jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

[°]Present address : INSERM U-442, Université Paris-Sud, 91405, Orsay, France.

The aim of this study was to investigate the GST- μ and π isotype implication in sensitivity to ionizing radiation based on clonal heterogeneity analysis of basal GST mRNA μ and π expression in clones with a large range of radiosensitivity derived from KB head and neck carcinoma cell exposed to ionizing radiation at therapeutic doses.

Materials and methods

Cell Culture. KB head and neck carcinoma cell line derived from an oral cavity cancer, was provided by Pr. A Hanauske (München, Germany) within the framework of EORTC Preclinical Therapy Model Group. The cells were maintained as monolayer culture at 37°C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) with 10% Foetal Calf Serum (Dutsher, Brumath, France), 100 UI penicillin/streptomycin and 200 mmol/l glutamin (all components were provided by Gibco, Cergy Pontoise, France).

Cell treatments, KB Clones. KB cells were irradiated 2 Gy/day for five consecutive days using a Theratron 780 ⁶⁰Co apparatus (Theratronics, Ottawa, Canada) at a dose rate of 2.0 Gy/min. The KB^m surviving fraction was maintained in culture. The cloning of KB^m by limited dilution produced 13 clones (KB^{m1} to KB^{m13}) maintained in culture until stabilized before being analysed (Sigma, S^t Quentin Fallavier).

Radiosensitivity. The radiosensitivity of each cell line was determined using clonogenic assays in agar (Bacto Agar, Difco, Detroit, MI), the cells were seeded in soft agar (0.3%) at 800-2500 cells/wells depending on the plating efficiency. Twenty four hours later the cells were irradiated (2-10 Gy) then incubated for 2 weeks at 37°C, 5% CO₂. The colonies were semi-automatically counted using image analysis (Inspector, Matrox, Canada). Only colonies with a mean diameter above 50 μ m were counted. Every experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. The results were normalized to non-irradiated controls. The experimental dose-response curves were fitted using the Linear-Quadratic model (a). The radiobiological parameters α , β , SF₂ (Surviving Fraction at 2 Gy) and MID (Mean Inactivation Dose) (b) were calculated according to Fertil *et al.* (9).

$$(a) \quad S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \qquad (b) \quad MID = \int_0^{\infty} S dD$$

Semi-quantitative RT-PCR analysis of GST- μ and GST- π mRNA expression. Total RNA was extracted from cell cultures (1-5.10⁶ cells) using TRIzol® (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed with 1 μ g total RNA in a reaction volume of 20 μ l containing 500 ng of random primers (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 0.5 mmol/l deoxynucleotide triphosphate (Pharmacia Biotech, Orsay, France), 10 mmol/l dithiothreitol (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) and 200 units Superscript II® reverse transcriptase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). The mixture was incubated for 10 minutes at room temperature, 50 min at 42°C, followed by 15 min at 70°C. RNase H (2.5 units) (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), was added into each sample, incubated for 20 min at 37°C and then stored at -20°C.

The GST- π PCR reactions were performed with 1 μ l of the cDNA reaction mixture in a volume of 20 μ l containing 2 μ l PCR buffer 10x, 2 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l dNTP (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 0.5 mmol/l of 5'- and 3'- primers, and finally 1 unit of Taq polymerase (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). GST- π primer set used was 3'- CCC TTT ATC TGG TGC CAC AT -5' and 5'- CTG TTT CCC GTT GCC ATT GAT -3'. β 2-microglobulin was used as control gene. The primer set used was 3'- AGT AGA AAA AGT CAC CCC CA -5' and 5'- ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG -3' (10). The amplification program consisted in 1 cycle of 3 minutes at 94°C, 1 minute at 56°C, 1 minute at 72°C ; 29 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 56°C and 30 seconds at 72°C ; then one ending cycle of 7 minutes at 72°C.

The GST- μ PCR conditions were adapted from Bröckmüller *et al.* (11). The GST- μ PCR mixture was the same except for MgCl₂, 1.5 mmol/l. The GST- μ primer set used was 3'- GGG TAG TTA GTT CAT CCC GTC -5' and 5'- CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC -3'. The amplification program consisted in 1 cycle of 5 minutes at 94°C, 1 minute at 60°C, 1 minute at 72°C ; 25 cycles of

60 seconds at 94°C, 60 seconds at 60°C and 60 seconds at 72°C ; then one ending cycle of 7 minutes at 72°C.

PCR products were analysed using 1% (GST- π) or 2% (GST- μ) agarose gel electrophoresis (100 V, 30 min) in TBE 0.5X (Life Technologie, Cergy-Pontoise, France) buffer stained with ethidium bromide (1 mg/ml). Quantification was performed by UV transillumination (Gel Doc 1000 system, Bio Rad, Ivry-sur Seine, France). For each cDNA sample, a relative expression ratio (RER) was calculated in triplicate as fluorescence intensity of the GST- π or GST- μ band on fluorescence of the β 2-microglobulin band.

Statistical analysis. Data obtained from GST- μ and GST- π expression level and radiosensitivity parameters were analysed using non-parametric Mann-Whitney's U-test. Regression analysis between GST- μ and GST- π RER and radiosensitivity parameters were performed with ANOVA test. A significance threshold at $P < 0.05$ was used throughout.

Results

Basal Expression Levels of GST- μ and GST- π mRNA. GST- μ and GST- π mRNA expression were detected in all clones (Fig. 1). In all cell lines, the co-amplification of GST- μ or GST- π gene did not alter the stability of the β 2-microglobulin gene amplification. GST- μ 178 bp band intensity appeared to be relatively constant from one clone to another (Fig. 1A). The GST- π amplification pattern was found to vary from one cell line to another (Fig. 1B). GST mRNA expression were found to be stable for 18 months in the clones (data not shown) without necessity of re-irradiation, indicating that mRNA variations were not transiently expressed.

Fig. 1

RT-PCR analysis of GST- μ (A) and GST- π (B) basal expression in clones. First lane : DNA size marker (MW), second and the third lanes : negative (-) and positive (+) controls. GST- μ positive control was prepared from cDNA from healthy anonymous donor. GST- π positive control was prepared from cDNA from K562 human leukaemia cell line exhibiting high expression level of GST- π mRNA. Semi-quantitative GST- μ or GST- π PCR were performed with concomitant amplification of β 2-microglobulin gene as control. RT-PCR products were separated by agarose gel electrophoresis. Amplification of β 2-microglobulin gene produced a 120 bp fragment. All assays were performed in triplicate and repeated at least 3 times.

The 621 bp GST- π band showed great amplification variations. For example, with a constant level of β 2-microglobulin, GST- π mRNA varied from high expression in clone 2, to absence of expression in clone 3. In all GST- μ or GST- π amplification experiments, intra experimental variations in Relative Expression Ratio (RER) never exceed 10% (data not shown). The RER is the ratio calculated in triplicate of fluorescence intensity of the GST- μ or GST- π bands on fluorescence of the β 2-microglobulin bands.

As shown in Table I, basal expression level of GST- μ mRNA RER varied from 0.62 (KB^{m13}) to 1.84 (KB^{m3}). In KB parental cell line, RER value was 0.69, being one of the lowest. KB^m and the

other clones showed significant ($P < 0.05$) overexpression of GST- μ mRNA as compared to KB except for KB^{m10} and KB^{m13}. In KB^m cell line, GST- μ RER (1.06) was found to be 1.7-fold overexpressed as compared to KB. This value appeared close to the mean RER value (1.2) determined in the clones. A significant variation in GST- μ mRNA RER was observed ranging from 0.62 (KB^{m13}) to 1.84 (KB^{m3}) representing about 1 to 2.7-fold overexpression compared to KB. GST- μ RER values were all found to be significantly different ($P < 0.05$) among each others except for KB^{m10} and KB^{m13}.

TABLE I
Basal GST- μ and GST- π mRNA Relative Expression Ratio in KB, KB^m and Clones.

^a RER were calculated in triplicate as the ratio of fluorescence intensity of the GST- μ or GST- π bands on fluorescence of the β 2-microglobulin bands. Results are mean value (\pm SEM) of at least three independent experiments. The data were not determined for clone 8.

^b Non parametric Mann Whitney's U test comparing KB^m or clones with KB, ns = non significant.

In a general manner, moderate or no GST- μ overexpression was observed in the clones as compared to KB parental cell line.

At the opposite, GST- π RER presented a large range of variation from 0.01 (KB^{m11}) to 1.60 (KB^{m2}). With 0.05, KB value was one of the lowest. Compared to KB parental cell line, KB^m (0.30) presented significant ($P = 0.0039$) 6.6-fold GST- π higher expression level. Indeed, only KB^{m5} (0.03) and KB^{m9} (0.02) showed no statistical difference with KB value. The highest overexpression (32-fold) was observed in KB^{m2} (1.60). Clones KB^{m4}, KB^{m10} and KB^{m12} have also a high GST- π RER value, respectively 1.20, 0.90 and 1.13 corresponding to a 24-fold, 18-fold and 23-fold overexpression compared to KB. Three other clones, KB^{m1} (0.36), KB^{m6} (0.2) and KB^{m13} (0.49), have a moderate overexpression ranging from 4-fold (KB^{m6}) to 10-fold (KB^{m13}). KB^m showed no statistical difference within this 3 clones.

So, the moderate (KB^{m1}, KB^{m6} and KB^{m13}) or high (KB^{m2}, KB^{m4}, KB^{m10} and KB^{m12}) modifications of expression level in the 7 clones can be attributed to the irradiation treatment.

Radiosensitivity. Radiobiological parameters were calculated using the Linear-Quadratic model from clonogenic assays survival curves (Fig. 2). The Table II shows the radiosensitivity parameters of the cell lines. The radiosensitivity of KB^{m4}, KB^{m10} and KB^{m11} were not determined because of their incapacity to form colonies. As mRNA levels, radiosensitivity parameters were found to be stable among 18 months of culture. The first observation is that KB parental cell line was relatively radioresistant ($\alpha = 0.114$; $\beta = 0.020$; $SF_2 = 0.739$; $MID = 4.306$). KB^m radiosensitivity parameters

($\alpha = 0.049$; $\beta = 0.030$; $SF_2 = 0.805$; $MID = 4.663$) showed that this surviving fraction was more resistant to ionizing radiation than the parental cell line. But none of these parameters was significantly different ($P > 0.05$).

TABLE II
Radiosensitivity parameters of KB, KB^m and clones.

^a The parameters α , β , SF_2 , MID were calculated according to the Linear-Quadratic model : $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$. α parameter is the initial slope of the curve, β parameter is the distal slope of the curve, SF_2 is the survival fraction at 2 Gy, MID is the Mean Inactivation Dose (area under the dose-response fitted curve).

Conversely, we observed a general but not uniform decrease in the radiosensitivity in the cellular clones.

Three clones (KB^{m2}, KB^{m5}, KB^{m13}) exhibited higher sensitivity to ionizing radiation than KB ($P < 0.05$). Within these three clones, no significant difference was found among all radiobiological parameters ($P > 0.05$). The SF_2 values varied from 0.406 for KB^{m5} to 0.423 for KB^{m2}. As compared to KB, these 3 clones exhibited a 1.8-fold decreased in SF_2 value and 2-fold in MID value. The mean α value was about 3.6-fold higher than in KB parental cell line.

At the opposite, KB^{m1}, KB^{m8} and KB^{m12} have a weak sensitivity to ionizing radiation and could be considered as the more radioresistant of the clones. No significant difference was found for α , SF_2 and MID with the parental cell line ($P > 0.05$). Despite of radioresistant parameters, KB^{m12} exhibited low radioresistance in the high radiation doses (>4 Gy) with an unexpected β value of 0.703 which was significantly different ($P > 0.05$) from KB β value (0.020).

The other clones, KB^{m3}, KB^{m6}, KB^{m7} and KB^{m9}, exhibited intermediate sensitivity. KB^{m3} and KB^{m6} were the most sensitive to ionizing radiation and their parameters were statistically different as compared to KB ($P < 0.05$). The 2 other clones (KB^{m7} and KB^{m9}) were found to be more resistant than KB.

Figure 2 shows KB, KB^m and representative sample clones fitted survival curves. This illustrated the wide range of radiosensitivity found in the clones derived cell lines and the high radioresistance of the parental cell lines.

Regression analysis. The regression analysis performed with ANOVA test between basal GST- μ or GST- π Relative Expression Ratio and radiosensitivity parameters (α , β , SF_2 and MID) revealed that alterations of basal GSTs mRNA expression were not linked to observed radiation sensitivity modifications. For example, the KB^{m1} radiosensitivity ($\alpha = 0.155$; $SF_2 = 0.650$; $MID = 3.343$) were close to KB but GST- μ RER was significantly different (1.62 Vs 0.69). On the same way,

KB^{m5}, KB^{m13} were sensitive to ionizing radiation but RER value were different (1.53 Vs 0.62). The comparison of GST- π RER values between radioresistant (KB, KB^{m1}, KB^{m12}) or radiosensitive (KB^{m2}, KB^{m5}) cell lines led to the same conclusion.

Fig. 2

Survival curves of KB parental cell line, KB^m surviving fraction after 5x2 Gy irradiation and 3 representative cell clones (KB^{m5}, KB^{m9} and KB^{m12} exhibiting respectively the highest, intermediate and the lowest radiosensitivity). Each point is the mean value of at least 3 independent clonogenic assays performed in triplicate. Standard error never exceed 20%. The experimental curves were fitted using the linear-quadratic model : $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$.

Discussion

Reactive oxygen species (ROS), as superoxide ion or hydroxyl radical, arise from a lot of drugs and ionizing radiation action on water. ROS, inducing lipids peroxidation and DNA alteration, are especially detoxified by glutathione S-transferase isoenzymes family. Glutathione and glutathione related enzymes such as gammaglutamylcysteine synthase, glutathione peroxydase/reductase or glutathione S-transferase were described to be implicated in sensitivity modulation toward genotoxics such as drugs and ionizing radiation (4,12,13). Enhanced detoxification due to GST/GSH system overexpression in tumors, has been reported to play a role in chemoresistance (4). GSTs is a 5 isoenzyme family with dedicated functions. Variation in GSTs expression can modified ROS detoxification leading to sensitivity modulation. If GST- μ null phenotype especially implicated in carcinogenesis has been discovered (8), such gene defect was never reported for π isotype. Despite a lot of studies concerning drugs detoxification and resistance, GSTs implication in radiation resistance has been less studied, especially at mRNA level. Nevertheless, the effects of ionizing radiation was generally described as an inducing effect on GST cellular level (14) leading to ROS detoxification.

Global radiosensitivity of a cell line is due to combination of individual cell clone intrinsic radiosensitivity and the aim of this work was to analyse the implication of GST- μ and π isotypes in radiosensitivity of cell clones selected after irradiation.

To our knowledge, if GST- μ null phenotype have been largely studied in head and neck cancer (15) and reported to be implicated in carcinogenesis and in tumour chemosensitivity (8), no data was reported concerning GST- μ mRNA expression and radiosensitivity. In the present study, induction of GST- μ mRNA expression was observed in KB^m with a RER value (1.06) close to mean RER value (1.2) determined in the clones. However, in any radiation selected cell clones, GST- μ mRNA RER values were not found to be related to radiosensitivity.

The wide range of GST- π mRNA expression has certainly an influence on the clones radiosensitivity, but no correlation was found between the basal expression level of GST- π mRNA and the radiobiological parameters calculated from the linear-quadratic model. It has been shown that cellular GST- π level can act as a radiosensitivity modulator in sub lethal damage but its action seems not to be determinant in potentially lethal damage determining the radiosensitivity (16). In KB model, GST- π mRNA seems to be more affected by irradiation than μ isotype. These observations are in agreement with previous data showing GST- π mRNA induction in cancer cell lines analysed after irradiation (14). Nevertheless, other studies (17) reported controversial results that could be explained by the difference in end-point (activity or protein and not mRNA analysis).

From the present study, KB can be considered as relatively radioresistant ($SF_2=0.74 \text{ Gy} \pm 0.08$) when compared to the mean SF_2 ($0.49 \text{ Gy} \pm 0.12$) of other head and neck squamous cell carcinoma as established previously (18). This intrinsic relative radioresistance of KB cell line certainly limited the increase in radioresistance in KB^m subline. The initial $5 \times 2 \text{ Gy}$ irradiation was certainly not sufficient to significantly affect radiobiological parameters. Therefore, the unexpected radiosensitization observed in the clones could be due to inactivation or expression modulation of genes induced by initial irradiation.

Different hypotheses were proposed to explain radiosensitivity variation among which some further concerned GSTs (gene mutation, mRNA stabilisation or protein expression), or implied alternative mechanisms. GST- μ and π transcriptional regulation (like mRNA stabilisation) has been described as a potential resistance factor (7). GST genes mutations and their consequent modifications of activity were investigated and reported to modulate carcinogenesis induction (19) but failed to be related to sensitivity. Controversial results were obtained concerning validity of GST proteins expression, especially π isotype, as chemo/radiosensitivity markers (20). Few data are available in head and neck model but GST- π protein expression to have low prognostic value (17).

Detoxification pathways are not restricted to GST isoenzymes. Numerous studies have shown that modulation of superoxide dismutase expression level, mediating the conversion of reactive oxygen species (superoxide radical) to H_2O_2 and O_2 , can alter the radiosensitivity (3). The glutathione system including GSH level has also been described as potential marker of resistance (8). In laryngeal tumours, increased GSH levels has been reported to confer additional resistance to radiation therapy (6).

Additionally to detoxification pathways, radioresistance could be mediated by alternative mechanisms that could be envisaged in further studies in head and neck cancer cell model including cell cycle checkpoints delays after irradiation (21), inactivation of DNA-dependent protein kinase (22) and apoptosis induction through several pathways such as p53 (23) and protein kinase C activation (24).

Acknowledgements

We thank Dr. M. Barberi-Heyob for advices in statistical analysis. Supported by the French Ligue Contre Le Cancer, the Alexis Vautrin Cancer Center Research Fund, Pôle Européen de Santé, Région Lorraine and Communauté Urbaine du Grand Nancy. C. D. is a grant recipient of the French Ligue Contre Le Cancer.

References

1.R.R. Weichselbaum, W. Dahlberg and J.B. Little, Proc Natl Acad Sci USA **82** 4732-4735 (1985).

- 2.R.R. Weichselbaum, W. Dahlberg, M. Beckett, T. Karrison, D. Miller, J. Clark and T.H. Erwin, *Proc Natl Acad Sci USA* 83 2684-2688 (1986).
- 3.J. Sun, Y. Chen, M.T. Li and Z.L. Ge, *Free Radical Biol Med* 24 586-593 (1998).
- 4.K.D. Tew, *Cancer Res* 54 4313-4320 (1994).
- 5.Z. Trizna, G.L. Clayman, M.R. Spitz, K.L. Briggs and H. Goepfert, *Am J Surg* 170 499-501 (1995).
- 6.T.P. Mulder, J.J. Manni, H.M. Roelofs, W.H. Peters and A. Wiersma, *Carcinogenesis* 16 619-24 (1995).
- 7.J.D. Hayes and D.J. Pulford, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30 445-600 (1995).
- 8.A. Lafuente, M. Maristany, C. Arias, A. Cuchi, M.J. Lafuente, R. Molina, A. Ballesta and J. Trasserra, *Anticancer Res* 18 107-111 (1998).
- 9.B. Fertil and E.P. Malaise, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 1699-707 (1985).
- 10.D. Gussow, R. Rein, I. Ginjaar, F. Hochstenbach, G. Seemann, A. Kottman and H.L. Ploegh, *J Immunol* 139 3132-8 (1987).
- 11.J. Brockmoller, R. Kerb, N. Drakoulis, M. Nitz and I. Roots, *Cancer Res* 53 1004-1011 (1993).
- 12.T. Shimizu, M. Iwanaga, A. Yasunaga, Y. Urata, S. Goto, S. Shibata and T. Kondo, *Cell Mol Neurobiol* 18 299-310 (1998).
- 13.K. Yamaoka, S. Kojima, M. Takahashi, T. Nomura and K. Iriyama, *Biochim Biophys Acta* 1381 265-70 (1998).
- 14.G. Stammer, E.W. Pommerenke, J. Mattern and M. Volm, *Carcinogenesis* 16 2051-5 (1995).
- 15.R. JaskulaSztul, M. Reinikainen, K. HusgafvelPursiainen, Z. Szmaja, W. Szyfter, K. Szyfter and A. Hirvonen, *Biomarkers* 3 149-155 (1998).
- 16.H. Miyara, T. Hida, K. Nishida, T. Takahashi, T. Sugiura, Y. Ariyoshi, M. Morishita, T. Takahashi and R. Ueda, *Jpn J Clin Oncol* 26 1-5 (1996).
- 17.J. Tanita, S. Tsuchida, J. Hozawa and K. Sato, *Cancer* 72 569-76 (1993).
- 18.P.J. Deschavanne and B. Fertil, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34 251-266 (1995).
- 19.K. Sundberg, A.S. Johansson, G. Stenberg, M. Widersten, A. Seidel, B. Mannervik and B. Jernstrom, *Carcinogenesis* 19 433-6 (1998).
- 20.T. Hida, Y. Ariyoshi, M. Kuwabara, T. Sugiura, T. Takahashi, T. Takahashi, K. Hosoda, Y. Niitsu and R. Ueda, *Jpn J Clin Oncol* 23 14-9 (1993).
- 21.S. Biade, C.C. Stobbe and J.D. Chapman, *Radiat Res* 147 416-421 (1997).
- 22.S.E. Lee, R.A. Mitchell, A. Cheng and E.A. Hendrickson, *Mol Cell Biol* 17 1425-1433 (1997).
- 23.K.F. Pirolo, Z.M. Hao, A. Rait, Y.J. Jang, W.E. Fee, P. Ryan, Y.W. Chiang and E.H. Chang, *Oncogene* 14 1735-1746 (1997).
- 24.S.J. Chmura, H.J. Mauceri, S. Advani, R. Heimann, M.A. Beckett, E. Nodzenski, J. Quintans, D.W. Kufe and R.R. Weichselbaum, *Cancer Res* 57 4340-4347 (1997).

Running title

GST expression in cells after irradiation.

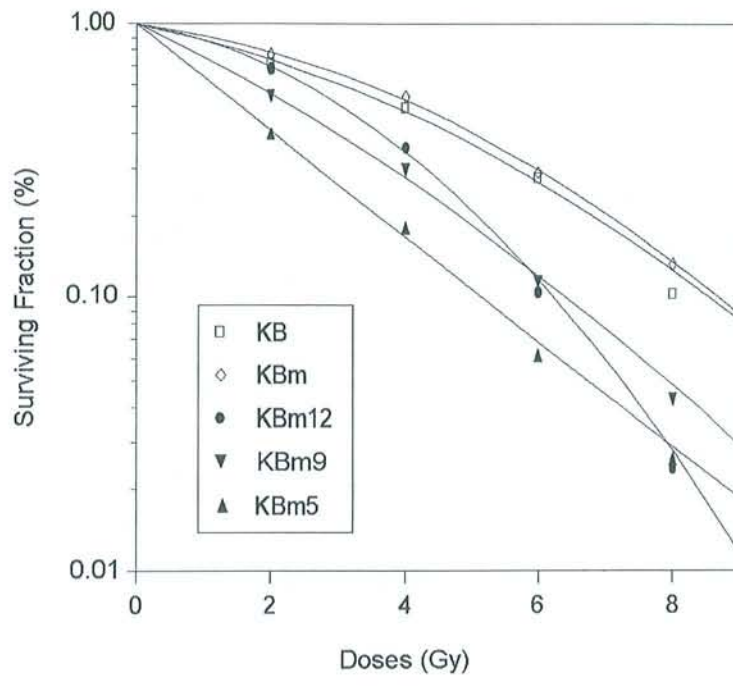
Keywords

radioresistance, partially due to GSTs expression

semi-quantitative RT-PCR, mRNA expression of GSTs

glutathione S-transferase μ and π , influence on radiosensitivity

clonal heterogeneity, influence on radiosensitivity



Cell Lines	GST- μ	<i>P</i> value ^b	GST- π	<i>P</i> value*
KB	0.69 (0.17) ^a	-	0.04 (0.02)	-
KB ^m	1.06 (0.31)	0.0469	0.30 (0.12)	0.0039
KB ^{m1}	1.62 (0.44)	0.0005	0.36 (0.11)	0.0039
KB ^{m2}	1.27 (0.26)	0.0003	1.60 (0.21)	0.0039
KB ^{m3}	1.84 (0.75)	0.0003	0.01 (0.01)	0.0099
KB ^{m4}	1.02 (0.22)	0.0023	1.20 (0.26)	0.0062
KB ^{m5}	1.53 (0.42)	0.0003	0.03 (0.01)	ns
KB ^{m6}	1.53 (0.45)	0.0003	0.20 (0.09)	0.0039
KB ^{m7}	0.94 (0.07)	0.0032	0.01 (0.01)	0.0065
KB ^{m9}	1.19 (0.06)	0.0015	0.02 (0.02)	ns
KB ^{m10}	0.69 (0.07)	ns	0.90 (0.16)	0.0039
KB ^{m11}	0.99 (0.02)	0.0015	0.01 (0.00)	0.0039
KB ^{m12}	1.12 (0.02)	0.0014	1.13 (0.30)	0.0062
KB ^{m13}	0.62 (0.23)	ns	0.49 (0.26)	0.0039

Cell Lines	α (Gy ⁻¹) ^a	β (Gy ⁻²)	SF ₂	MID (Gy)
KB	0.114(0.053)	0.020(0.005)	0.739(0.075)	4.306(0.677)
KB ^m	0.049(0.032)	0.030(0.018)	0.805(0.020)	4.663(0.684)
KB ^{m1}	0.155(0.077)	0.033(0.014)	0.650(0.100)	3.343(0.648)
KB ^{m2}	0.397(0.200)	0.035(0.027)	0.423(0.167)	2.130(0.658)
KB ^{m3}	0.301(0.139)	0.034(0.021)	0.490(0.103)	2.395(0.413)
KB ^{m5}	0.421(0.192)	0.025(0.042)	0.406(0.109)	2.133(0.531)
KB ^{m6}	0.346(0.112)	0.023(0.025)	0.465(0.082)	2.444(0.473)
KB ^{m7}	0.208(0.145)	0.035(0.020)	0.586(0.119)	2.836(0.419)
KB ^{m8}	0.156(0.152)	0.037(0.026)	0.645(0.123)	3.155(0.360)
KB ^{m9}	0.260(0.164)	0.023(0.014)	0.563(0.146)	2.878(0.716)
KB ^{m12}	0.077(0.089)	0.055(0.007)	0.703(0.133)	3.339(0.712)
KB ^{m13}	0.431(0.080)	0.007(0.009)	0.417(0.073)	2.269(0.427)

SPHEROIDS IN RADIOBIOLOGY AND PHOTODYNAMIC THERAPY

Christophe Dubessy ¹, Jean-Louis Merlin ^{1,3+}, Christian Marchal ², François Guillemin ³

¹ Laboratoire de Recherche en Oncologie

² Département de Radiothérapie

³ Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique

UPRES A CNRS 7039

Centre Alexis Vautrin

54511 Vandoeuvre-Nancy, France.

+ corresponding author :

Jean-Louis Merlin

Laboratoire de Recherche en Oncologie

Centre Alexis Vautrin

F 54511 Vandoeuvre-Nancy, cedex, France.

Tel : +33 383 59 83 07

Fax : +33 383 44 78 51

e-mail : jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Additional key words

oxygen, cell contact, apoptosis, damage repair

1. Introduction

Multicellular tumor spheroids are tumor cells aggregates grown from one or several cell clones. This *in vitro* model has a three dimensional structure that mimics micro-tumor or metastasis and some of their properties. Multicellular tumor spheroids present, in their center, a necrotic area. The size of necrosis varies according to the spheroid diameter and the cellular type, and due to oxygen gradient, pH, and nutrients.

These characteristics make the spheroids a powerful model particularly adapted to the ionizing radiation studies notably in the tumor response to radiotherapy.

Tumor sensitivity to ionizing radiations is controlled by several parameters among which intercellular contact and communication [1], oxygen [2], damage repair [3] and apoptosis induction [2] are known to be of major interest. Being relevant for *in vivo* tumor sensitivity, some of these parameters cannot be easily and properly studied in monolayer cell culture because of the lack of tridimensional structural organization. The interest of spheroids in the field of radiobiology has been demonstrated in the work of Sutherland et al through the observed similarity of the survival curves obtained after irradiation from *in vivo* growing tumors and spheroids [4, 5].

Photodynamic therapy (PDT) is based upon the ability of photosensitizing drugs to be retained in tumor tissue at higher level than in normal tissue [6]. Exposing the sensitized tissue to light of appropriate wavelength, i.e. absorbed by the photosensitizing agent, will photochemically activate the sensitizer and generate cytotoxicity.

Cytotoxicity is reported to be induced both by the generation of singlet oxygen-mediated reaction [7], mainly causing damage to plasma membrane, cytoplasmic or nuclear organelles and enzymes [8]. *In vivo*, additional damage was reported to endothelial cells of the tumor neovasculature [9]. The main determinant for PDT-antitumoral activity are therefore photosensitizing drug concentration, light dose and oxygen concentration [10]. Necrosis and apoptosis have been reported to occur to different extend according to the model used [11, 12]. Using spheroids in such context appears particularly interesting since the tri-dimensional organization will help to better understand the multiple mechanisms of action underlying PDT-generated cytotoxicity and multiple applications have been reported.

2. Parameters affecting the sensitivity of spheroids to ionizing radiation

2.1. Intercellular contact and communication

Spheroids stable tridimensional organization is made possible by intercellular membrane contact such as microprojections, extracellular matrix production and intercellular communication such as desmosomes and gap junctions. The multicellular organization encountered in spheroids has been positively correlated to resistance to radiation [13]. This was evidenced for radiation [1] and confirmed for hyperthermia [14], photodynamic therapy [15] and topoisomerase II inhibitor based-chemotherapy [16]. In spheroids from neuroblastoma and head and neck carcinoma [17, 18], increase in cell survival was observed as compared to monolayer cell culture. This effect was proposed to reflect an enhanced cellular ability to repair sublethal damage [19] rather than inactivation of the radiation cytotoxicity. In melanoma cell lines, sublethal damage repair after radiation was found to differ from that of the same cell line cultured as monolayer and to be directly influenced by the growth rate of spheroids [20, 21].

Multicellular contact and communication taking place in spheroids is multifactorial. Intercellular junctions generated by modifications of the cell shape and gap junctional reciprocity were proposed to enhance transduction mechanisms at the membrane level (membrane to cytoskeleton transduction) as well as at the nuclear level (nuclear matrix to chromatin transduction).

Consequently, DNA packaging could be affected [15] and influence DNA repair mechanisms. Specific hypothesis of DNA loop sizes has been proposed to explain decreased DNA damage in irradiated spheroids [22]. Recently [23], extensive gap junctional communication was found not to be an absolute requirement for increased radiation resistance in spheroids.

2.2. Oxygen

Hypoxic cells in human tumors have been demonstrated to be resistant to radiation [2]. As mentioned above, spheroid growth is associated with the development of a central hypoxic region [24] with decreased PO₂ [25]. Central hypoxia in spheroid was found to be unrelated to the thickness of the rim of viable cells [26]. The presence of quiescent cells with decreased mitochondrial activity and the long period required for these cells to re-enter the cell cycle was found to be implicated in the regulation of oxygenation of spheroids [27].

As encountered *in vivo*, hypoxic fraction of spheroids was found to be radiation-resistant [28-30]. When subjected to fractionated-irradiation, simulating radiotherapy, reoxygenation was observed in spheroids [31] as observed using *in vivo* models. However, re-oxygenation was a highly variable parameter and therefore does not seem to be the main determinant of tumor sensitivity to fractionated irradiation [32, 33].

Enhancement of radiation sensitivity through increase in oxygenation of tumor has been experimentally demonstrated [34] using tetrachlorodecaoxide in spheroids. Recently, radiosensitization was evidenced using paclitaxel-mediated increase in PO₂ in tumor xenografts [35]. This finding could explain that even in the absence of modifications of paclitaxel-induced

cell cycle arrest, radiosensitization was observed in spheroid from ovarian [36] and head and neck tumor cells [37]. Thus, spheroid model proved to be useful to consider only the influence of P02 without taking into account the antiangiogenic effect of paclitaxel that was reported to occur in vivo [35]. Data achieved from spheroid models could therefore further explain the clinical high response rate observed in non small cell lung carcinoma patients treated by paclitaxel-radiotherapy association [38].

Spheroids bearing hypoxic central region proved to be useful as drug screening preclinical model and were recently used to evaluate the in vitro potential activity of hypoxia-selective cytotoxic drugs derived from tirapazamine [39].

Another way of modulation cellular oxygenation could be envisaged through the cellular thiol content. Radiosensitization of spheroids using chemical agents targetted at the cellular thiol content was demonstrated [40]. No clinical application of this latter concept was reported.

2.3. Damage repair

The existence of nonproliferating or quiescent cells in spheroids has been established [41]. In spheroids [42, 43], quiescent cells were demonstrated to be more radioresistant than proliferating cells because of their ability to initiate repair of potentially lethal damage (PLD) before entering into cycle. Repair of PLD in quiescent cell populations has been proposed to be implicated in spheroid radioresistance in rat glioblastoma [44] and human melanoma and breast models [45].

Additionally to PLD, the cellular radiosensitivity is mediated by the cell ability to recover from sublethal damage (SLD) after irradiation. The higher repair capacity in normal tissues constituted the original concept for fractionated clinical radiotherapy.

Repair of SLD has been shown to be larger in spheroids than in monolayer cultures [3].

Recovery after split-dose irradiation was demonstrated in murine and human brain tumor spheroids [46, 18, 47], in melanoma, head and neck squamous cell carcinoma and lung carcinoma [18] and probably resulted from repair processes as well as redistribution in the cell cycle phases and repopulation [48].

2.4. Apoptosis induction

Apoptosis induction is implicated in radiation-induced cell death. Defect in apoptosis induction is known to cause resistance to antitumor drugs and ionizing radiations. Numerous papers reported that intercellular contact [49], and extracellular matrix communication [50] causes inhibition of apoptosis and consequently resistance to anticancer treatment. Even before the concept of apoptosis was established [51, 52], cell contact was already described as a possible cause of radiation resistance [53]. Recently, implication of defective apoptosis induction in radioresistance was demonstrated in a radioresistant variant of neuroblastoma cell line selected after fractionated irradiation [54]. As mentioned above, cell contact and intercellular communication is constitutively developed in spheroids, therefore, it should account for

resistance to apoptosis induction. This was largely demonstrated in spheroids submitted to anticancer drugs such as paclitaxel [55]. The relationship between resistance to apoptosis induction and radiation resistance in spheroids appears to be even more complex since hypoxia was demonstrated to have also an important influence on the magnitude of the fraction of radiobiologically hypoxic cells [56].

3. Parameters affecting the sensitivity of spheroids to photodynamic therapy

3.1. Photosensitizer concentration

Early study reported the influence of spheroid size on hematoporphyrin PDT-sensitivity in human colon carcinoma spheroid model [57]. Spheroids were found to be less sensitive to PDT than monolayers and as the spheroid size increased, the sensitivity to PDT decreased. It was demonstrated that intracellular drug uptake within the spheroid was related to PDT-sensitivity [58]. In addition, difference in growth rate was observed within the cell layers composing the spheroids. Cells being engaged in G1 phase of the cell cycle, having a smaller median volume were found to be more resistant to PDT in relation with a smaller intracellular concentration of hematoporphyrin derivative [59].

In addition, spheroids grown from colorectal human carcinoma cell lines expressing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance phenotype were reported to express resistance to hematoporphyrin derivative [60]. Resistance to PDT was found to be related to spheroid size and hematoporphyrin derivative concentration. The implication of P-glycoprotein was strongly suggested since the resistance to PDT could be overcome by addition of verapamil as P-glycoprotein blocker. Additional cytotoxicity measured as spheroid growth retardation could be gained in this model when verapamil-modulated hematoporphyrin-PDT was associated with doxorubicin chemotherapy [61].

3.2. Oxygen

Oxygen is known to be one of the major determinant of tumor sensitivity to photodynamic therapy. Consequently, the hypoxic cells in solid tumors are likely to be resistant to PDT. Photodynamic treatment itself may induce tissue hypoxia as a result of molecular oxygen consumption in the PDT-mediated formation and consumption of singlet oxygen (1O_2). The concept of photochemical oxygen consumption during PDT was developed in a model of multicell tumor spheroids [62] [63] [64]. As measured both by microelectrodes and modelled mathematically [65], a strong relationship was revealed between the fluence rate of incident irradiation, oxygen consumption and the fraction of PDT surviving cells. Decrease in surviving fractions of PDT-treated spheroids correlated with the decrease in incident fluence rate. The concept of photochemical oxygen consumption initially developed in spheroids was confirmed later in a preclinical tumor system [66].

3.3. Light

Light dose is the parameter that triggers the photochemical reaction leading to PDT cytotoxicity. Together with the photosensitizer availability and oxygen concentration, light fluence is a constitutive component of a "total photodynamic dose". The understanding of the complex interplay between all these parameters would help in monitoring of dosimetry during PDT, thus contributing to an effective therapeutic outcome. However, it is extremely difficult to monitor all these dynamic parameters in a clinical context. Therefore, alternative attempts are investigated for to facilitate this problem [67]. One of the most studied approach is the measurement of sensitizer photobleaching which reflects the photosensitizer quantity influenced by the all above listed factors, including light dose. Multicellular tumor spheroids served as an excellent system for the detailed study on sensitizer photobleaching during PDT and allowed to develop singlet oxygen-*versus* nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry [62] [63].

4. Experimental conditions used for spheroid assays in radiobiology and photodynamic therapy studies

The formation of spheroids is based upon a unique principle : to allow cell aggregation and to avoid their adhesiveness to culture support. The techniques used are based on the observations of Holtfreter who in 1944 studied cell morphology of amphibian embryos with cell aggregates growing on agar layer [68].

4.1. Culture Techniques

Several techniques are commonly employed, but two prevailed by their simplicity. Historically, the first reported technique is the spinner flask or "dynamic" culture which was developed by Sutherland and his collaborators in the 70's [5]. A spinner flask is seeded with cells that remain in suspension in the culture medium thanks to a rotating movement. Cells adhere to each other and form micro-spheroids. The rotating movement allows to avoid the aggregation of spheroids as well as their adhesion to the flask walls. This technique requires siliconated spinner flasks to avoid the problems of adhesion and cell proliferation on the flask walls, and allows long term culture of a large quantity of spheroids relatively spherical and homogenous in size. These aspects are important for radio/chemo sensitivity or cytotoxicity studies that require large quantities of spheroids in order to ensure experimental representativity and reduce experimental variations. The use of spinner flasks allows also a follow-up and an accurate control of physico-chemical parameters such as pH, nutrients concentration, glucose, oxygenation.

Conversely to the spinner flask culture, the liquid overlay culture described by Yuhas in 1977 is a static method [69] with spheroids laying on a non-adhesive surface. It consists in pouring a

thin layer of agar or agarose at the bottom of culture plates in order to prevent the adhesion of cells to the culture surface. The cells adhere then together and form spheroids. Medium with low concentration of agarose can be used to prevent aggregation of spheroids with each other [70]. The main advantage of this low cost technique is to offer a rapid and easy screening of the capacity to form spheroids of cells grown from biopsies and cell lines [71].

The two methods described previously are often combined [72-74]. The initiation is performed in liquid overlay culture which makes the aggregation of cells easier, then spheroids are transferred into a spinner flask in order to perform a mass culture without aggregates. The spheroids grown according to these two complementary techniques do not have the same growth and oxygenation properties, therefore their response to treatments may vary [75]. It is therefore necessary to define precisely the type of study envisaged and to be aware of the limits of the model.

The selection of a population of spheroids of homogenous size can be performed directly using a Pasteur pipette under the control of an inverted microscope. Sutherland et al proposed the use of sedimentation column in order to isolate large spheroids populations grown from cultures in spinner flasks [76]. As a matter of fact, many studies are based on the effects of oxygen during the response to anticancer treatments, for which, the volume of spheroids is a determining parameter.

Cells do not systematically form spheroids and no relation could be evidenced with their histological origin. Moreover, culture media seem to have an influence since, in order to form spheroids, some cellular types require an hormonal supply [77, 78] interleukin 2 or insuline [78].

Simultaneously, other methods of culture have been developed. It is indeed possible to use rocker or roller bottles, but these methods are rarely employed since their use is more delicate than that of spinner flasks. An original method employed by Desoize et al consists in seeding cells in a 96-well plate and then to apply an orbital agitation which force cells to aggregate. The good reproducibility of the method allows to obtain spheroids with a known number of cells [72].

Another method allows to control the size of spheroids. It is based on the use of poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm), a thermo-sensitive polymere that allow the adhesion and the proliferation of cells in monolayer [79]. A change in temperature modifies the polymer and removes the monolayer that folds on itself to form a spheroid [79]. The main interest of this technique lies in the fact that it allows the formation of spheroids by a large number of cell lines usually unable to form spheroids (like fibroblasts, mesengial, smooth muscle or osteoblastic cells). In order to allow the formation of spheroids by a larger number of cellular types, they can be included directly in agar gel and methylcellulose [80], forming then spheroids. But the difficulties of manipulation make their use delicate and are therefore seldom used. In order to mimic as closely as possible the growth pattern of tumors, cocultures combining two or several types of cells have been developed. Desoize et al. [72] use sensitive and resistant MCF-7 cells

that simulate the tumoral heterogeneity in response to anticancer treatments inducing a multidrug resistant phenotype. Other co-cultures including fibroblasts have been used to approach the tumoral structure in vivo. Experiments were reported using photodynamic therapy in glioma-normal brain cells spheroids [81] using the hematoporphyrin derivative Photosan-3® and bladder tumor cells-normal fibroblast spheroids [82] using 5-aminolevulinic acid.

4.2. Growth conditions

It is well known that response to ionising radiations depends largely on the state of cells oxygenation. It has been suggested that the cells in total hypoxia are three fold more radioresistant than the same cells grown in normal conditions [83-85]. In tumors, the same effect was evidenced. This aspect can be simulated with a tridimensional culture model. As a matter of fact, spheroids imitate the histological structure and the differentiation of tumoral nodes located near vascularized areas [71] which is of high interest in radiobiology.

The histological structure of spheroids presents three cell layers that are progressively formed: the external layer that proliferate rapidly, the internal quiescent layer and a necrotic central zone that appears as the spheroid size increases.

There are three main phases in the development of spheroids [86, 74]. The first one shows an exponential proliferation of the volume of spheroids. It is formed from the aggregation of several clonogenic cells (able to proliferate). The links that bind these cells are weak and the micro-spheroids are therefore fragile. In the following hours, the augmentation of the number of cells reinforce the general structure. Intercellular links such as desmosomes or gap junctions appear and make the structure of spheroid more compact. During this phase, two cell layers progressively appear. The external layer is proliferative since it is in contact with the nutritive medium. The internal layer is essentially non proliferative. This is due to the presence of oxic and nutritive gradients. Indeed, the further the cells are located from the surface, the less oxygen and medium nutriments are available. Simultaneously, pH, osmolarity as well as production of catabolites follow an evolution similar to that of tumors. These deficits induce a central necrosis that occurs when the diameter reaches 200 to 500 micrometers and varies according to cell type, culture conditions (agitated or static) and nutriments concentration [87]. The third phase is characterised by a progressive decrease in growth rate of spheroids until it reaches a plateau. The maximal diameter of spheroids is about 2 to 4 mm, and can vary considerably according to cell lines and culture conditions.

It has been shown that the doubling time of spheroids reflects the growth rate of tumors they are grown from. Moreover this doubling time is longer than that of monolayer cultures [69].

4.3. Spheroids assays

Spheroids represents a powerful culture model for radiobiology studies from which it is possible to analyse radiation response of spheroid populations, individual responses of spheroids as well as the response of different cell populations composing each spheroid. As a

matter of fact, the analysis of spheroids sensitivity to ionizing radiations is based on techniques elaborated from two different strategies : using entire or dissociated spheroids. All these data allow to improve the understanding of the mechanisms involved in response to irradiation and photodynamic therapy.

4.3.1. Methods based upon dissociation of the spheroids

Dissociation is performed with trypsin or an enzymatic cocktail made of collagenase, DNase, pronase. Usually, the enzymatic action is coupled to a mechanical action of agitation or pipetage. The dissociation rate varies according to the cellular type. Using the trypsin dissociation, all Colo26 mouse colon carcinoma spheroids are disaggregated (Coutier et al, personal communication) while, using enzymatic cocktail only 80% of V79 lung fibroblast spheroids [88] and 20% of EMT6 mouse mammary carcinoma spheroids are dissociated [89]. Residual aggregates can be eliminated by filtration and sedimentation. Techniques of dissociation are also used to isolate sequentially cellular populations located at different depth within the spheroids [90]. Using dissociated spheroids, radiosensitivity parameters can be calculated after fitting experimental dose-response curves according to the linear and quadratic model. The parameters a and b represent the respective slopes of the proximal and distal parts of the curves. Once adjusted, it is possible to calculate the parameters SF_2 and MID which represent the survival fraction at 2 Gy and the mean inactivation dose (area under the curve). Most PDT experiments are based upon the analysis of dissociated spheroids.

Besides enzymatic and mechanical restraints, spheroid dissociation can induce artefacts since environmental conditions of tumoral cells change dramatically. For example, dissociating spheroids can be associated with cell re-oxygenation and induce re-entry of quiescent cells (Phase G_0) into the cell cycle. Their repair capacity as well as their radiosensitivity can therefore vary.

4.3.1.1. Clonogenic assays

Clonogenic assays are the reference test to determine the response to ionizing radiations and photodynamic therapy. It is based on the capacity of tumoral cells to proliferate after treatment. A 5-14 days culture delay is necessary for colonies to appear.

4.3.1.2. Colorimetric assays

Colorimetric assays are an alternative to clonogenic assays. They present several advantages such as to allow semi-automated testing of numerous experimental parameters. MTT test developed by Mossman [91] is based on the ability of mitochondrial enzymes to reduce tetrazolium salt (MTT) into purple formazan crystals. The intensity of optical density allows therefore to determine the cell viability. Sulforhodamine B test, based on the proteins content representative of the cell proliferation, is more precise and more reproducible than the MTT test since it does not depend on metabolism. It has been shown that radiosensitivity parameters

determined with colorimetric assays are correlated with those determined by clonogenic assays, especially for low doses of irradiation [92]. MTT assay was reported to be reliable for evaluation of PDT-induced cytotoxicity [93].

4.3.1.3. Flow cytometry

During the last few years, the use of flow cytometry coupled with cell sorter has improved the analysis of cells grown from spheroids. For this purpose, it is necessary to label cells with non toxic fluorochromes such as Hoechst 33342 or Orange acridine which penetrate slowly spheroids and remain localized in cells after dissociation [80]. Cell populations are then separated according to the intensity of the representative labelling on their precise position in the spheroid. Numerous parameters can be evaluated simultaneously. They concern the analysis of cell cycle, pH, calcium flow, apoptosis or also the presence of proteins implied in the resistance phenomena by immunochemical labelling. The cell populations sorted can be put again into culture in order to perform clonogenic or colorimetric assays and to determine the sensitivity to anticancer treatments. Therefore, the influence of the oxygen gradient on the radiosensitivity of cells grown from spheroids has been studied [80]. Likewise, it is known that cells in S-phase are radioresistant, and cells in cycle are numerous at the periphery of spheroids ; their influence on global radiosensitivity of spheroids can therefore be precised. Durand et al [94, 40] have indeed shown that the deeper the cell population is located, the more resistant it is after irradiation. Moreover, the survival fraction of these cells follows a sigmoid curve, which evidences that there is a transition phase between oxygenation and hypoxia. In the same way, these sigmoid curves are shifted when the oxygenation of the culture medium increases. Flow cytometry is generally used to follow the penetration and the accumulation of fluorescent anticancer drugs or photodynamic therapy agents [58, 59]. It has been shown that radiosensitizers such as buthionine sulfoximine or radioprotectors such as amifostine (WR2721) act by modifying the oxygenation state of subpopulations close to hypoxia [80]. Flow cytometry was also used [80] to show that the spheroid model imitates the cell repopulation of tumors, especially during fractionated irradiation.

4.3.2. Methods based upon entire spheroids analysis

4.3.2.1. Spheroid numeration and size determination

Entire spheroids are used to simulate the tumoral response more precisely. These techniques require a follow-up, over several weeks, of the total number of spheroids and of the mean volume of each of them. When expressed according to radiation dose or time, it is possible to determine several parameters that characterize the response of spheroids to ionizing radiations. Figure 1 sums up the different parameters that can be estimated from experiments performed with entire spheroids. The follow-up of volume over time allows to evaluate the growth delay.

When high ionizing radiation doses are applied, it is necessary to wait long enough to estimate the GD (usually between 5 and 10 fold the initial volume). The parameters ID_{50} and RSV_2 are determined during the volume evaluation according to radiation dose. ID_{50} (50% growth inhibiting dose), represents the radiation dose necessary to reduce the spheroid volume by 50% at a given time after irradiation. RSV_2 , introduced by Griffon et al [95], is the residual volume after 2 Gy irradiation, a dose commonly administered in radiotherapy. RSV_2 gives information comparable to that deduced from SF_2 in monolayer cell cultures

The estimation of the number of spheroids controlled at a given time (several weeks) according to the dose allow to obtain survival curves similar to those obtained with monolayer cells. The linear-quadratic model allows therefore to adjust them and to calculate the same parameters, but specific of spheroids. Several authors have shown the validity and the interest of these parameters in the estimation of the response to radiations ($SF_{2\text{ sph}}$) [96]. This type of representation allows to calculate SCD_{50} (50% Spheroid Control Dose) which is equivalent to TCD_{50} in animals. It represents the dose necessary to control 50% of spheroids.

Whereas the interest of spheroids is commonly known, this in vitro model is seldom used as development tools in preclinical oncology. Their use in non-dissociated forms gives information close to clinical reality, but remains fastidious. This is mainly due to two main drawbacks : the culture is less easy in three-dimensions than in monolayer and the analysis requires experimental skillfulness. Each experimental point results from the follow-up of several spheroids. An automatic counter of spheroids designed according the automatisisation principles of multiwell plate readers is now being developed in our laboratory (patent pending). The frequent follow-up as well as the precise and rapid analysis of spheroids allow to reduce experimental variations. Moreover, the process does not require any human intervention. The use of this counter, combined with an optimization of the culture processes should allow the development of the use of spheroids in preclinical oncology.

4.3.2.2. Oxygen measurement

As described before, oxygen status is a parameter of great importance in response to ionizing radiation and PDT. Oxygen tension measurement in spheroid can be achieved by polarographic methods with the use of O_2 -sensitive microelectrodes [33]. The active measuring element is made of platinum or gold wire (0.1-0.5 μm diameter) covered with glass. The final electrode diameter is about 2-4 μm allowing easy penetration into the spheroid. The determination of oxygen tension is performed in a measuring chamber allowing circulation of gas and pre-warmed medium. A spheroid is placed at the bottom of the chamber and maintained by a holding micropipette inserted vertically. The electrode, placed on a micromanipulator, is manoeuvred in position with the aid of two orthogonal microscopes [97]. Oxygen tension profile of the spheroid was determined from values and position of the microelectrode.

This method is used by several authors to investigate the influence of the culture method [98] and nutrient supply on the growth of spheroids [99]. It has been shown that observed oxygen

tension may varied considerably between cell lines [100]. So, oxygen tension and consumption measurements led to a better understanding of spheroids response to radiation [101].

It is also possible to assess oxygen supply by theoretical diffusion calculations [101, 102]. Foster et al. have used a mathematical model of photochemical oxygen consumption to show the influence of fluence rate on spheroids exposed to photofrin-based PDT [65].

5. Spheroids as in vitro model for in vivo tumor radiosensitivity

Using spheroids as in vitro model, numerous studies were performed to investigate the ability of this model to predict in vivo tumor radiosensitivity. To our knowledge, this approach was never envisaged for photodynamic therapy.

In radiobiology, the first results, from Sutherland and Durand groups [103, 86, 4, 104], revealed that cells derived from human tumors express different level of response to radiation and opened new investigation fields assuming that in *in vitro* radiosensitivity might be used for radiation response prediction. This concept originally evaluated in human tumor xenografts, was further developed in some studies in which the radiosensitivity of spheroids obtained from tumor cells derived from human tumor clinical specimens put into culture was compared with clinical response to radiation [105, 106]. However, only sparse data are available because of the lack of prospective clinical studies.

Different tumor types have been studied including brain, colon, head and neck, lung, melanoma, ovarian tumors. As observed in human tumor xenograft models, tumor-type dependent differences in the radiosensitivity of human tumor cells grown as spheroids was found.

5.1. Brain tumors

Human neuroblastoma cells grown as spheroids are highly sensitive to irradiation [107], thus confirming the results achieved in *in vitro* in monolayer cell cultures [108]. Spheroids originating from neuroblastoma tumors were reported to grow faster and to be more sensitive to radiation than melanoma spheroids [109]. When growth delay was considered as end-point, the radiosensitivity of neuroblastoma cells grown as spheroids was reported to be consistent with that of the same cell line xenografted into nude mice and reflected the clinical behavior of this tumor type [110]. More recently, the relatively low radiosensitivity of spheroids from glioblastoma was reported to reflect the modest effect of radiotherapy in glioblastoma bearing patients as opposed to the relatively high radiosensitivity of glioblastoma cell lines grown in vitro [111]. No prospective study based on radiosensitivity determination in brain tumor clinical specimens was reported.

5.2. Colon carcinoma

Evaluation of radiosensitivity of human colon carcinoma cell line in monolayer, spheroid cell culture or xenografted into nude mice, was performed by West and Sutherland [112]. Different patterns of radiosensitivity were observed with monolayer cell cultures being higher than spheroids or xenografts. Spheroids or xenografts were found to be unresponsive to radiation. These results led to the conclusion that spheroids radiation sensitivity was consistent with in vivo radiosensitivity of human colon carcinoma as opposed to monolayer cell cultures. No prospective study based on radiosensitivity determination in colon carcinoma clinical specimen was reported.

5.3. Head and neck squamous cell carcinoma

The radiosensitivity of spheroids from tongue squamous cell carcinoma cells was investigated and compared with that of the same cell line xenografted into nude mice. When growth delay was considered as end-point, the radiosensitivity of neuroblastoma cells grown as spheroids was reported to be consistent with that of the same cell line xenografted into nude mice and reflect the clinical behavior of this tumor type [110]. More recently [36, 37] the response to radiations of four head and neck carcinoma cell lines was characterized and investigated when associated to chemotherapy using taxane derivatives (paclitaxel, docetaxel). No prospective study based on radiosensitivity determination in head and neck tumor clinical specimens was reported.

5.4. Lung carcinoma

The radiosensitivity of two human small cell lung cancer cell lines grown as spheroids was reported [113]. In both lines, two end-points were considered, growth delay and clonogenic cell survival. No correlation was found between both parameters and clonogenic survival was proposed as the most relevant parameters since it appeared to be closer to the radiation response pattern of human small cell lung cancer. When growth delay was considered as end-point, the radiosensitivity of lung adenocarcinoma cells grown as spheroids reflected of the same cell line xenografted into nude mice and paralleled the clinical behavior of this tumor type [110]. No prospective study based on radiosensitivity determination in lung carcinoma clinical specimen was reported.

5.5. Melanoma

Based on experimental work in cell lines [114], Rofstad et al. investigated the radiosensitivity of spheroids initiated directly from patient tumor specimens [115] and reported that the radiation sensitivity of the spheroids was similar to that of xenografts and patient tumor clinical response. Comparing the radiosensitivity of spheroids established from melanoma and neuroblastoma human tumors, Evans et al [109] reported that melanoma was more radioresistant than neuroblastoma, probably in relation with their respective growth rate which was slower in melanoma. Again, when growth delay was considered as end-point, the radiosensitivity of

melanoma cells grown as spheroids was consistent with that of xenografts and the clinical behavior of this tumor type [110].

5.6. Ovarian carcinoma

A good correlation was reported in human ovarian carcinoma cell line between the radiosensitivity of spheroids and xenografts [115]. Therefore spheroid model was proposed to be particularly interesting to study the impact of partial hypoxia onto therapeutic outcome. Recently, the radiosensitivity of multicellular tumor spheroids obtained from human ovarian tumor biopsies was analyzed [95]. New parameters were proposed as markers for radiosensitivity, the residual / initial volume after 2-Gy irradiation (RSV_2) and the radiation dose inducing a decrease by 50% of the initial individual spheroid volume (ID50). No prospective clinical study was reported. More recently [116] the response to irradiation of two ovarian carcinoma cell lines was characterized and investigated when associated to chemotherapy using taxane derivatives (paclitaxel, docetaxel).

6. Conclusion

The multicellular tumor spheroid is an original and powerful model in radiotherapy and photodynamic therapy studies. The main interest of this model is the structural similarity with tumor which implies the presence of gradients (such as oxygen, nutrients or pH) and intercellular communication. In addition cellular heterogeneity of solid tumors can be reproduced by co-culturing tumor and non tumor cells within the same spheroids and allow to study the interactions between several different cell lines existing in tumors.

In radiobiology, the similarity of radiation response between spheroids and tumor xenografts bearing mice makes the spheroids to be a good alternative model to *in vivo* irradiation studies. In PDT, spheroids led to a better understanding of the own tumor response without interactions with vascular system. In such a way, the impact of vasculature in the overall PDT-induced antitumor activity can be evaluated.

Finally, despite of the quality of spheroid model, only the use of new technology for analysis of spheroid populations will help to increase their experimental use, particularly in preclinical oncology.

7. Acknowledgements

We thank Pr. Lina Bezdetnaya and Stéphanie Coutier for helpful comments in photodynamic therapy. The authors are grateful to the Alexis Vautrin Cancer Center Research Fund, the French "Ligue Contre Le Cancer", the "Pôle Européen de Santé: Région Lorraine, Communauté Urbaine du Grand Nancy" and "Agence Nationale de Valorisation de la Recherche" for supporting their research work.

References

- (1) Durand RE, Sutherland RM. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res* 71: 75-80, 1972.
- (2) Overgaard J, Hansen HS, Jorgensen K, Hjelm Hansen M. Primary radiotherapy of larynx and pharynx carcinoma--an analysis of some factors influencing local control and survival. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12: 515-21, 1986.
- (3) Durand RE. Repair during multifraction exposures: spheroids versus monolayers. *Br J Cancer Suppl* 6: 203-6, 1984.
- (4) Sutherland RM, Durand RE, Jones WBG. Modification by triacetoneamine-N-oxyl (TAN) of the radiation response of chinese hamster cells grown as a tumor model. *Radiat. Res.* 47: 342, 1971.
- (5) Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 18: 491-5, 1970.
- (6) Gomer CJ, Dougherty TJ. Determination of [3H]- and [14C]hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.* 39: 146-51, 1979.
- (7) Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 36: 2326-9, 1976.
- (8) Kessel D. Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol* 44: 489-93, 1986.
- (9) Star WM, Marijnissen HP, van den Berg-Blok AE, et al. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 46: 2532-40, 1986.
- (10) Guillemain F, A'Amar O, Rezzoug H, et al. Optical instrumentation suitable for real-time dosimetry during photodynamic therapy in optical biopsies. In: *Proc SPIE* 1995, 92-99.
- (11) Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 42: 89-95, 1998.
- (12) Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 65: 422-6, 1997.
- (13) Dertinger H, Hulser D. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat Environ Biophys* 19: 101-7, 1981.
- (14) ter Haar GT, Walling J, Loverock P, Townsend S. The effect of combined heat and ultrasound on multicellular tumour spheroids. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53: 813-27, 1988.
- (15) Olive PL, Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev* 13: 121-38, 1994.
- (16) Durand RE. Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in multicell spheroids in vitro. *Cancer Res.* 41: 3495-8, 1981.

- (17) Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout H, et al. Differences in repair of radiation induced damage in two human tumor cell lines as measured by cell survival and alkaline DNA unwinding. *Strahlenther Onkol* 167: 35-40, 1991.
- (18) Schwachofer JH, Crooijmans RP, van Gasteren JJ, et al. Repair of sublethal damage in two human tumor cell lines grown as multicellular spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 17: 591-5, 1989.
- (19) Elkind M, Sutton H. X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nat.* 184: 1293-1295, 1959.
- (20) Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, et al. Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19: 1191-7, 1990.
- (21) Schwachofer JH, Hoogenhout J, Kal HB, Koedam J, van Wezel HP. Radiosensitivity of different human tumor lines grown as xenografts determined from growth delay and survival data. *In Vivo* 4: 253-7, 1990.
- (22) Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat. Res.* 117: 79-92, 1989.
- (23) Luo C, MacPhail SH, Dougherty GJ, Naus CC, Olive PL. Radiation response of connexin43-transfected cells in relation to the "contact effect". *Exp Cell Res* 234: 225-32, 1997.
- (24) Sutherland RM, Durand RE. Hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 23: 235-46, 1973.
- (25) Gorlach A, Acker H. pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1227: 105-12, 1994.
- (26) Franko AJ, Parliament MB, Allalunis-Turner MJ, Wolokoff BG. Variable presence of hypoxia in M006 human glioma spheroids and in spheroids and xenografts of clonally derived sublines. *Br. J. Cancer* 78: 1261-8, 1998.
- (27) Freyer JP. Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J Cell Physiol* 176: 138-149, 1998.
- (28) Acker H. Microenvironmental conditions in multicellular spheroids grown under liquid-overlay tissue culture conditions. *Recent Results Cancer Res* 95: 116-33, 1984.
- (29) Franko AJ, Koch CJ. The radiation response of hypoxic cells in EMT6 spheroids in suspension culture does model data from EMT6 tumors. *Radiat. Res.* 96: 497-504, 1983.
- (30) Luk CK, Sutherland RM. Nutrient modification of proliferation and radiation response in EMT6/Ro spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13: 885-95, 1987.
- (31) Durand RE, Biaglow JE. Radiosensitization of hypoxic cells of an in vitro tumor model by respiratory inhibitors. *Radiat. Res.* 69: 359-66, 1977.
- (32) Nysten T, Acker H, Bolling B, Holterman G, Carlsson J. Influence of ionizing radiation on oxygen profiles in different types of multicellular spheroids. *Radiat. Res.* 120: 213-26, 1989.

- (33) Schwachofer JH, Acker H, Crooijmans RP, et al. Oxygen tensions in two human tumor cell lines grown and irradiated as multicellular spheroids. *Anticancer Res* 11: 273-9, 1991.
- (34) Mueller-Klieser W, Vaupel P. Improvement of tumor spheroid oxygenation by tetrachlorodecaoxide. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13: 49-54, 1987.
- (35) Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res.* 59: 3776-82, 1999.
- (36) Griffon-Etienne G, Merlin J-L, Marchal C. Association of docetaxel/paclitaxel with irradiation in ovarian carcinoma cell lines in bidimensional (sulforhodamine B assay) and tridimensional (spheroids) cultures. *Anti-Cancer Drugs* 7: 660-670, 1996.
- (37) Griffon-Etienne G, Merlin JL, Marchal C. In vitro evaluation of Taxol(R) combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett* 109: 23-32, 1996.
- (38) Frasci G, Comella P, Scoppa G, et al. Weekly paclitaxel and cisplatin with concurrent radiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer: a phase I study. *J. Clin. Oncol.* 15: 1409-17, 1997.
- (39) Hicks KO, Fleming Y, Siim BG, Koch CJ, Wilson WR. Extravascular diffusion of tirapazamine: effect of metabolic consumption assessed using the multicellular layer model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 42: 641-9, 1998.
- (40) Durand RE, Olive PL. Radiosensitisation and radioprotection by BSO and WR-2721: the role of oxygenation. *Br. J. Cancer* 60: 517-22, 1989.
- (41) Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Sci.* 240: 177-84, 1988.
- (42) Luk CK, Keng PC, Sutherland RM. Radiation response of proliferating and quiescent subpopulations isolated from multicellular spheroids. *Br. J. Cancer* 54: 25-32, 1986.
- (43) Ng CE, Keng PC, Sutherland RM. Characterization of radiation sensitivity of human squamous carcinoma A431 cells. *Br. J. Cancer* 56: 301-7, 1987.
- (44) Rodriguez A, Alpen EL, Mendonca M, DeGuzman RJ. Recovery from potentially lethal damage and recruitment time of noncycling clonogenic cells in 9L confluent monolayers and spheroids. *Radiat. Res.* 114: 515-27, 1988.
- (45) Weichselbaum RR, Little JB, Tomkinson K, Evans S, Yuhas J. Repair of fractionated radiation in plateau phase cultures of human tumor cells and human multicellular tumor spheroids. *Radiother. Oncol.* 2: 41-7, 1984.
- (46) Jostes RF, Williams ME, Barcellos-Hoff MH, Hoshino T, Deen DF. Growth delay in 9L rat brain tumor spheroids after irradiation with single and split doses of X rays. *Radiat. Res.* 102: 182-9, 1985.
- (47) Wheldon TE, Wilson L, Livingstone A, et al. Radiation studies on multicellular tumour spheroids derived from human neuroblastoma: absence of sparing effect of dose fractionation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 563-6, 1986.

- (48) Durand RE. Repair and proliferation: major determinants of the multifraction radiation response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 15: 1147-52, 1988.
- (49) Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 125: 403-15, 1994.
- (50) Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4: 953-61, 1993.
- (51) Cole L, Ellis M. Radiation-induced changes in nucleic acids: Release of soluble deoxypolynucleotides in the speel. *Radiat Res*: 508-517, 1957.
- (52) Schreck R. Cinemicrophotographic observations and theoretical considerations on reactions of lymphocytes to X-rays. *Radiology* 65: 912-919, 1955.
- (53) Sutherland RM, Durand RE. Cell contact as a possible contribution to radiation resistance of some tumours. *Br J Radiol* 45: 788-9, 1972.
- (54) Russell J, Wheldon TE, Stanton P. A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55: 4915-21, 1995.
- (55) Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 57: 2388-93, 1997.
- (56) Rofstad EK, Eide K, Skoyum R, Hystad ME, Lyng H. Apoptosis, energy metabolism, and fraction of radiobiologically hypoxic cells: a study of human melanoma multicellular spheroids. *Int J Radiat Biol* 70: 241-9, 1996.
- (57) West CM. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *Br. J. Cancer* 59: 510-4, 1989.
- (58) West CM, Moore JV. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumor cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol* 50: 665-9, 1989.
- (59) West CM, Moore JV. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochem Photobiol* 55: 425-30, 1992.
- (60) Purkiss SF, Grahn MF, Turkish M, Macey MG, Williams NS. In vitro modulation of haematoporphyrin derivative photodynamic therapy on colorectal carcinoma multicellular spheroids by verapamil. *Br J Surg* 79: 120-5, 1992.
- (61) Purkiss SF, Grahn MF, Williams NS. Haematoporphyrin derivative--photodynamic therapy of colorectal carcinoma, sensitized using verapamil and adriamycin. *Surg Oncol* 5: 169-75, 1996.
- (62) Georgakoudi I, Nichols MG, Foster TH. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 65: 135-44, 1997.
- (63) Georgakoudi I, Foster TH. Singlet oxygen- versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 67: 612-25, 1998.

- (64) Georgakoudi I, Foster TH. Effects of the subcellular redistribution of two Nile blue derivatives on photodynamic oxygen consumption. *Photochem Photobiol* 68: 115-22, 1998.
- (65) Foster TH, Hartley DF, Nichols MG, Hilf R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* 53: 1249-54, 1993.
- (66) Sitnik TM, Hampton JA, Henderson BW. Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br. J. Cancer* 77: 1386-94, 1998.
- (67) Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. *Lasers Med. Sci.* : 182-199, 1997.
- (68) Holtfreter J. A study on the mechanics of gastrulation. *J Exp Zool* 95: 171-212, 1944.
- (69) Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 37: 3639-43, 1977.
- (70) Kuwashima Y, Yamada T, Saio M, Takami T. Formation and growth of multicellular spheroids in media containing low concentrations of agarose. *Cancer Letters* 71: 31-33, 1993.
- (71) Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95: 1-23, 1984.
- (72) Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res* 18: 4147-58, 1998.
- (73) Schwachofer JH. Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research (review). *Anticancer Res* 10: 963-9, 1990.
- (74) Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95: 24-49, 1984.
- (75) Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br. J. Cancer* 56: 325-7, 1987.
- (76) Wigle JC, Freyer JP, Sutherland RM. Use of a sedimentation column to obtain uniformly sized populations of multicell spheroids. *In Vitro* 19: 361-6, 1983.
- (77) Villalobos M, Aranda M, Nunez MI, et al. Interaction between ionizing radiation, estrogens and antiestrogens in the modification of tumor microenvironment in estrogen dependent multicellular spheroids. *Acta Oncol.* 34: 413-7, 1995.
- (78) Yuhas JM, Tarleton AE. Dormancy and spontaneous recurrence of human breast cancer in vitro. *Cancer Res.* 38: 3584-9, 1978.
- (79) Yamazaki M, Tsuchida M, Kobayashi K-y, Takezawa T, Mori Y. A novel method to prepare multicellular spheroids from varied cell types. *Biotechnology and bioengineering* 48: 17-24, 1995.
- (80) Durand RE. Contributions of flow cytometry to studies with multicell spheroids. *Methods in cell biology* 42: 405-422, 1994.
- (81) Terzis AJ, Dietze A, Bjerkvig R, Arnold H. Effects of photodynamic therapy on glioma spheroids. *Br J Neurosurg* 11: 196-205, 1997.

- (82) Steinbach P, Kriegmair M, Baumgartner R, Hofstadter F, Knuchel R. Intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: the fluorescent metabolite is limited to urothelial cells. *Urology* 44: 676-81, 1994.
- (83) Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, Gerald GE. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiother. Oncol.* 46: 229-237, 1998.
- (84) Evans SM, Jenkins WT, Shapiro M, Koch CJ. Evaluation of the concept of "hypoxic fraction" as a descriptor of tumor oxygenation status. *Adv Exp Med Biol* 411: 215-25, 1997.
- (85) Lartigau E, Randrianarivelo H, Avril MF, et al. Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 7: 400-6, 1997.
- (86) Sutherland RM, Durand RE. Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res Q* 11: 87-139, 1976.
- (87) Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, et al. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *Int. J. Cancer* 31: 523-33, 1983.
- (88) Slee PH, Willemze R, van Oosterom AT, Lurvink E, van den Berg L. A comparison of two culture techniques: an in vitro & an in vivo tumour colony-forming assay. *Br. J. Cancer* 52: 713-7, 1985.
- (89) Freyer JP, Sutherland RM. Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* 40: 3956-65, 1980.
- (90) Gronvik C, Capala J, Carlsson J. The non-variation in radiosensitivity of different proliferative states of human glioma cells. *Anticancer Res* 16: 25-31, 1996.
- (91) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
- (92) Griffon G, Merlin J-L, Marchal C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 6: 115-123, 1995.
- (93) Merlin JL, Azzi S, Lignon D, et al. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur. J. cancer* 28A: 1452-8, 1992.
- (94) Durand RE. Multicell spheroids as a model for cell kinetic studies. *Cell Tissue Kinet* 23: 141-59, 1990.
- (95) Griffon G, Marchal C, Merlin JL, Parache RM, Bey P. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. *Eur J Cancer* 31A 1: 85-91, 1995.
- (96) Djordjevic B, Lange CS, Rotman MZ, Torres C, Zheng Z. Increasing radiosensitivity in the course of fractionated X irradiation: the effect of contact with dead and dying cells. *Radiat. Res.* 150: 275-82, 1998.
- (97) Mueller-Klieser W. Microelectrode measurement of oxygen tension distributions in multicellular spheroids cultured in spinner flasks. *Recent Results Cancer Res* 95: 134-49, 1984.

- (98) Mueller-Klieser WF, Sutherland RM. Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 42: 237-42, 1982.
- (99) Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM. Evidence for a major role of glucose in controlling development of necrosis in EMT6/Ro multicell tumor spheroids. *Adv Exp Med Biol* 159: 487-95, 1983.
- (100) Mueller-Klieser WF, Sutherland RM. Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. *Br. J. Cancer* 45: 256-64, 1982.
- (101) Grossmann U. Profiles of oxygen partial pressure and oxygen consumption inside multicellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95: 150-61, 1984.
- (102) Grossmann U, Winkler P, Carlsson J, Acker H. Local variations of oxygen consumption within multicellular spheroids calculated from measured PO₂ profiles. *Adv Exp Med Biol* 169: 719-28, 1984.
- (103) Moscona A. Rotation-mediated histogenic aggregatoin of dissociated cells. *Exp Cell Res* 22: 455-475, 1961.
- (104) Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Multicellular spheroids: a new model target for in vitro studies of immunity to solid tumor allografts. *J Natl CancerInst* 46: 113-120, 1971.
- (105) Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.* 2: 317-23, 1984.
- (106) Fertil B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11: 1699-707, 1985.
- (107) Wheldon TE, Livingstone A, Wilson L, O'Donoghue J, Gregor A. The radiosensitivity of human neuroblastoma cells estimated from regrowth curves of multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 58: 661-4, 1985.
- (108) Deacon JM, Wilson PA, Peckham MJ. The radiobiology of human neuroblastoma. *Radiother. Oncol.* 3: 201-9, 1985.
- (109) Evans SM, Labs LM, Yuhas JM. Response of human neuroblastoma and melanoma multicellular tumor spheroids (MTS) to single dose irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12: 969-73, 1986.
- (110) Schwachofer JH, Crooijmans RP, van Gasteren JJ, et al. Radiosensitivity of different human tumor cells lines grown as multicellular spheroids determined from growth curves and survival data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 17: 1015-20, 1989.
- (111) Kaaijk P, Troost D, Sminia P, et al. Hypofractionated radiation induces a decrease in cell proliferation but no histological damage to organotypic multicellular spheroids of human glioblastomas. *Eur. J. cancer* 33: 645-651, 1997.
- (112) West CM, Sutherland RM. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.* 112: 105-15, 1987.

- (113) Duchesne GM, Peacock JH. Radiation cell survival and growth delay studies in multicellular spheroids of small-cell lung carcinoma. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51: 365-75, 1987.
- (114) Rofstad EK, Wahl A, Brustad T. Radiation response of multicellular spheroids initiated from five human melanoma xenograft lines. Relationship to the radioresponsiveness in vivo. *Br J Radiol* 59: 1023-9, 1986.
- (115) Rofstad EK, Sutherland RM. Growth and radiation sensitivity of the MLS human ovarian carcinoma cell line grown as multicellular spheroids and xenografted tumours. *Br. J. Cancer* 59: 28-35, 1989.
- (116) Griffon G, Merlin JL, Parache RM, et al. Sensitivity to taxoid derivatives of a newly established human endometrioid ovarian adenocarcinoma radioresistant cell line. *Anticancer Res* 16: 177-87, 1996.

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION EN FRANCE

Référence *VAU 1 FR*

TITULAIRE *UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1*

TITRE *Dispositif d'analyse et de comptage automatique d'objets et procédé de traitement des données*

DATE DE DÉPÔT *28 juin 1999*

NUMÉRO D'ENREGISTREMENT NATIONAL *99-02349*

INVENTEUR(S)
*DUBESSY Christophe
MERLIN Jean-Louis
LAIDELLI Emmanuel*

*Les annuités sont dues à la date anniversaire du dépôt.
Les extensions à l'étranger peuvent être effectuées sous priorité du présent dépôt jusqu'au*

28 JUIN 2000

NOTIFICATION DU NUMÉRO D'ENREGISTREMENT NATIONAL

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

À envoyer par l'INPI au demandeur ou au mandataire

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 28 JUIN 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9908349 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT NA	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet Michel POUPON 3 rue Ferdinand Brunot 88028 EPINAL CEDEX n° du pouvoir permanent références du correspondant VAU 1 PR téléphone
--	---

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire

certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale
 brevet d'invention certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)
Dispositif d'analyse et de comptage automatique d'objets et procédé de traitement des données

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN **1.9.5.4.1.5.0.7.0** code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination
UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)
**24, rue Lionnois
 54000 NANCY**

Forme juridique
Etablissement public à caractère scientifique, culturel et professionnel

Pays
FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Michel POUPON, mandataire Conseil en Propriété Industrielle (B.M.) N° d'ordre : 92-1205	SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION  ACHARD Sonia	SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI 
--	---	---

a loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

RÉCÉPISSÉ DE DÉPÔT

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie

À remettre au demandeur ou au mandataire

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **28 JUN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT
DATE DE DÉPÔT

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**
Cabinet Michel POUPON
rue Ferdinand Brunot
55020 EPINAL CEDEX
n° du pouvoir permanent références du correspondant VAO 1 FR téléphone

2 **DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**
 brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen
demande initiale
 brevet d'invention certificat d'utilité n°
date
Établissement du rapport de recherche différé immédiat
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)
Appareil de mesure et de comptage automatique d'objets et procédé de traitement des données

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN 1 9 5 4 1 5 0 7 1 1 code APE-NAF
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination
MICHEL POUPON
Nationalité (s) FRANÇAISE
Adresse (s) complète (s)
26 bis rue de Saint Pétersbourg
55020 EPINAL CEDEX
Pays FRANCE

Forme juridique
Établissement public à caractère scientifique, culturel et professionnel

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES** requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**
pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 **DIVISIONS** antérieures à la présente demande n° date n° date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
Michel Poupon, mandataire
Conseil en Propriété Industrielle (B.M.)
N° d'ordre : 92-1205

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION
Arnaud Sama

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

oi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Il garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Nom : **Monsieur DUBESSY**
Prénom : **Christophe**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE ET SANTÉ**

Spécialité : **GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 6 décembre 1999 n° 284

Le Président de l'Université



RAPPORT DE SOUTENANCE

Concernant la thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1,
en BIOLOGIE ET SANTÉ - Spécialité : Génie Biologique et Médical

Présentée par : Monsieur Christophe DUBESSY
Date de la soutenance : LUNDI 8 NOVEMBRE 1999

Sur le sujet suivant : "HÉTÉROGÉNÉITÉ CLONALE DE LIGNÉES CELLULAIRES DE CARCINOMES
ÉPIDERMOÏDES DES VOIES AÉRO-DIGESTIVES SUPÉRIEURES APRÈS EXPOSITION AUX
RADIATIONS IONISANTES".

Les membres du jury ont apprécié l'exposé oral des travaux effectués par Monsieur christophe Dubessy et l'utilisation de supports de présentation clairs et synthétiques. L'exposé oral a été d'une grande clarté révélant les capacités pédagogiques de l'étudiant. Son travail est basé sur l'analyse de lignées cellulaires sélectionnées par une irradiation fractionnée et les caractéristiques des clones supposés radiorésistants sont étudiés minutieusement avec des techniques variées et complémentaires. L'importance du travail fourni et le nombre de techniques maîtrisées par l'étudiant démontrent de grandes qualités personnelles. La maîtrise des techniques de clonage cellulaire, d'analyse par les modèles radiobiologiques, d'analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose radio-induite, ainsi que des techniques de biologie moléculaire pour l'étude de l'expression des gènes de détoxification, lui ont permis d'acquérir une grande autonomie. De plus, il a su collaborer avec d'autres laboratoires et ses recherches font partie d'un projet régional partiellement financé par du Pôle Européen de Santé et par le Ligue Nationale de lutte contre le Cancer. Il a su défendre son point de vu au cours des remarques qui lui ont été faites par les différents membres du Jury. Les réponses précises qui ont été données aux nombreuses questions posées nous ont paru pertinentes et scientifiquement fondées. La qualité du travail présenté ainsi que la notion d'une publication écrite et de 2 soumises pour publication où l'étudiant est en premier auteur, associées à 6 communications avec résumés publiés et 10 autres communications sans résumé, confirme le haut niveau des recherches effectuées. Son travail scientifique l'a conduit à déposer un brevet et le jury a apprécié non seulement le coté fondamental du travail mais aussi les applications potentielles futures. Sur cet ensemble d'arguments favorables que le jury, à l'unanimité, a accepté de lui décerner son titre de docteur de l'université Henri Poincaré avec la mention très honorable et les félicitations du jury.

Mention accordée { honorable
 très honorable
 très honorable avec félicitations

Signatures :

Président du Jury : Nom et signature

Membres du Jury :

Pr P. SCALLIET

Pr J.C. JARDILLIER

Dr C. ETIENNE-GRIFFON

Dr J.L. MERLIN

Dr M. DAUCA

Dr C. MARCHAL

À retourner au Service des Spécialités de la Faculté de Médecine dans les meilleurs délais.



Hétérogénéité clonale de lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures après exposition aux radiations ionisantes.

Prolifération cellulaire, mort cellulaire radio-induite et voies de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

RESUME

Le traitement des cancers des voies aéro-digestives supérieures, principalement basé sur la radiothérapie, présente un taux de récurrences généralement radio-résistantes de 15-20 %.

L'étude de la réponse à l'irradiation a été abordée par l'intermédiaire d'un modèle cellulaire, KB, dont l'irradiation fractionnée (5x2 Gy) a permis d'obtenir une fraction survivante KB^m et d'isoler 13 clones. Ceux-ci montrent une radiosensibilisation variable, reflétant l'hétérogénéité cellulaire, qui n'est pas liée à leur prolifération (T_s , T_{pot} , LI et T_d).

Les clones montrent un arrêt radio-induit du cycle cellulaire en phase G2/M mais pas à la transition G1/S confirmant le rôle déterminant de la protéine p53 dans cet arrêt. En effet, aucune accumulation de p53 n'est observée après irradiation malgré le caractère sauvage du gène suggérant la présence d'une répression post-transcriptionnelle ou traductionnelle inhabituelle. Le suivi à long terme de la mort cellulaire radio-induite indique l'absence de nécrose aux faibles doses utilisées mais la présence d'une apoptose tardive et modérée ce qui suppose une activation p53-indépendante de la voie des céramides en réponse à l'augmentation du nombre de lésions de l'ADN non réparées. Les taux d'apoptose observés ne permettent toutefois pas d'établir de lien avec la radiosensibilité.

L'expression de gènes de détoxification, (GST π/μ , MnSOD, MT2A) a été suivie. Bien que d'importantes différences d'expression aient été observées avant et après irradiation, ces processus ne semblent pas être le facteur déterminant des variations de radiosensibilité des clones.

Le modèle sphéroïde, dont les caractéristiques sont proches de celles des tumeurs, est un modèle de choix en radiothérapie. La conception et le développement d'un procédé d'analyse automatique des sphéroïdes, basé sur un automate passeur d'échantillons couplé à un logiciel d'analyse d'image, devrait permettre l'essor de l'utilisation des sphéroïdes notamment en recherche oncologique préclinique.

G.F.D. : Génie Biologique

Mots-Clés

Cancers des VADS, radiations ionisantes, résistance, hétérogénéité clonale, prolifération cellulaire, cycle cellulaire, apoptose, détoxification, sphéroïde.

Laboratoire de Recherche en Oncologie. Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy.