



**Travail de Fin d'Études**  
Catégorie **Paramédicale**

**L'expression de gènes comme  
biomarqueur des effets des radiations  
dans les cellules immunitaires humaines**



STUDIECENTRUM VOOR KERNENERGIE  
CENTRE D'ETUDE DE L'ENERGIE NUCLEAIRE

Sous la direction de

MACAEVA ELLINA

MICHAUX ARLETTE

Présenté par

**BROOS JULIE**

En vue de l'obtention du grade de  
Bachelier – Technologue de  
laboratoire médical

**Section Biologie Médicale**

Année académique 2014 – 2015

Site de Fleurus



**Travail de Fin d'Études**  
Catégorie **Paramédicale**

**L'expression de gènes comme  
biomarqueur des effets des radiations  
dans les cellules immunitaires humaines**



STUDIECENTRUM VOOR KERNENERGIE  
CENTRE D'ETUDE DE L'ENERGIE NUCLEAIRE

Sous la direction de

MACAEVA ELLINA

MICHAUX ARLETTE

Présenté par

**BROOS JULIE**

En vue de l'obtention du grade de  
Bachelier – Technologue de  
laboratoire médical

**Section Biologie Médicale**

Année académique 2014 – 2015

Site de Fleurus

Je voudrais remercier toutes les personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame Baatout, Docteur en Sciences au centre d'étude de l'énergie nucléaire de Mol et responsable de l'unité de radiobiologie, pour son accueil au sein de son service.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Ellina Macaeva, ma maître de stage, Doctorante en Sciences au centre d'étude de l'énergie nucléaire de Mol, pour le temps qu'elle m'a consacré et son aide précieuse.

Je remercie également Madame Arlette Michaux, technologue de laboratoire au centre d'étude de l'énergie nucléaire de Mol, pour son suivi au quotidien et pour ses nombreux conseils.

Je tiens également à remercier Monsieur Erik Toussaint, mon promoteur, pour sa relecture minutieuse et sa disponibilité.

Je souhaite adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire de radiobiologie, pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Pour terminer, je remercie toute ma famille et tout particulièrement Yvonne et tati Danielle pour leur relecture ainsi que mon papa et Diego pour l'aide et le soutien au quotidien.

# Tables des Matières

<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Partie théorique</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Présentation du SCK•CEN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 Les rayonnements ionisants</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Introduction .....	8
1.2.2 Différentes notions .....	11
<b>1.3 Les effets biologiques des rayonnements ionisants: les dommages de l'ADN</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Les réponses cellulaires aux rayons ionisants: la voie de la protéine p53</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 La protéine p53 : " gardien du génome cellulaire" .....	14
1.4.2 Les différentes étapes dans la réparation des cassures double brins .....	15
<b>1.5 La dosimétrie biologique</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Les changements dans l'expression génique comme biomarqueur de l'exposition</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7 Objectif du travail</b> .....	<b>19</b>
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Les modèles biologiques</b> .....	<b>20</b>
2.1.1 Le sang total et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs).....	20
2.1.2 Les cultures cellulaires .....	20
<b>2.2 Irradiation <i>in vitro</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Extraction de l'ARN au départ de sang total humain</b> .....	<b>23</b>
2.3.1 Extraction de l'ARN à partir du kit « PAXgene Blood RNA System » .....	23
2.3.2 Extraction d'ARN à partir du kit Qiagen « QIAamp® RNA Blood kit».....	25
<b>2.4 Quantification de l'ARN</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 Principe et appareillage .....	26
2.4.2 Protocole.....	26
<b>2.5 Analyse qualitative de l'ARN</b> .....	<b>27</b>
2.5.1 Principe et appareillage .....	27
2.5.2 Analyse des résultats .....	27
<b>2.6 La PCR quantitative en temps réel</b> .....	<b>28</b>
2.6.1 La transcription inverse .....	28
2.6.2 La PCR quantitative en temps réel .....	29
2.6.3 Essai d'un nouveau couple d'amorces .....	31
2.6.4 Quantification relative .....	33
2.6.5 Utilisation de Housekeeping gene (gène de référence) .....	34
2.6.6 Analyse qPCR de gènes radio-induits .....	34
<b>2.7 Extraction protéique</b> .....	<b>35</b>
<b>2.8 Coloration par immunofluorescence</b> .....	<b>35</b>
<b>2.9 Western blot</b> .....	<b>36</b>
2.9.1 Principe et appareillage .....	36
2.9.2 Réactifs .....	38
2.9.3 Protocole.....	39
<b>3. Résultats et discussion</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Coloration des <math>\gamma</math>H2AX</b> .....	<b>42</b>

3.2	Comparaison de deux kits d'extraction de l'ARN .....	43
3.3	Effets de la température de conservation des tubes sanguins dans l'expression des gènes .....	49
3.4	Corrélation entre l'expression des gènes et l'exposition aux rayons X.....	51
3.5	Radiosensibilité individuelle .....	56
3.6	Western blot de la protéine p53 .....	57
3.7	Western blot de la p53 phosphorylée .....	60
3.8	Western blot de la protéine VWCE.....	64
3.9	L'expression des gènes <i>VWCE</i> et <i>NDUFAF6</i> dans les cellules TK6 et NH32.....	67
4.	Conclusion générale et perspectives.....	71
4.1	Conclusion générale .....	71
4.2	Perspectives .....	71
5.	Abréviation.....	72
6.	Lexique .....	72
7.	Bibliographie.....	73
8.	Annexes.....	79

## Introduction

Les rayonnements ionisants à fortes doses sont connus pour leurs effets cancérigènes sur l'être vivant. Cependant, les effets des expositions à faible dose ou faible débit de dose restent controversés dû au manque de preuves directes sur l'être humain. L'Homme étant quotidiennement confronté à des rayonnements, soit d'origines naturelles (par le radon, les rayonnements cosmiques, le sol, l'eau,...), soit artificielles (par la radiothérapie, le diagnostic médical, les industries nucléaires,...), il est dès lors important de pouvoir identifier leurs effets sur l'organisme ainsi que sur l'environnement. De nombreuses études épidémiologiques réalisées chez les personnes ayant été exposées aux rayonnements suite aux différents accidents nucléaires ont pu révéler une augmentation du taux de cancers.

La branche de la biologie étudiant les effets biologiques des rayonnements, notamment des rayonnements ionisants est la radiobiologie. Il s'agit également de l'étude des moyens de s'en préserver, des traitements à suivre en cas d'irradiation ou de contamination. La radiobiologie vise à mieux comprendre l'interaction de l'irradiation avec la matière vivante et les conséquences biologiques à court et à long terme (léthalité, altérations génétiques, effets cancérigènes et non cancérigènes,...). Une meilleure connaissance dans ce domaine permet une définition de la radiosensibilité des cellules normales et tumorales, des tissus et des individus, une radioprotection plus efficace ainsi qu'une meilleure adaptation des doses de radiodiagnostic et de radiothérapie.

L'un des domaines importants de la radiobiologie est la recherche de biomarqueurs des rayonnements. Un biomarqueur étant défini comme toute mesure reflétant une interaction entre un système biologique et un agent de l'environnement, il peut être chimique, physique ou biologique (WHO, 1993). En cas d'accident nucléaire, la plupart des individus ne possèdent pas de dosimètre physique, il n'est dès lors pas possible de connaître la dose à laquelle les personnes ont été irradiées. L'identification de biomarqueurs a été réalisée dans le but de pouvoir déterminer la dose reçue par ces personnes irradiées, de pouvoir déterminer les mécanismes de leurs activations ainsi que de déterminer les effets de ces rayonnements ionisants. Les biomarqueurs peuvent être utilisés dans de multiples applications dans l'investigation épidémiologique incluant l'estimation ou la validation de dose reçue

améliorant ainsi la validité de la corrélation entre l'exposition et les réponses biologiques, l'investigation dans la sensibilité individuelle ainsi que la détection précoce des effets sur la santé induit par la radiation (Pernot et al. 2012).

Un des facteurs important dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants est la protéine p53. Le biomarqueur choisi pour cette étude est l'expression de gènes cibles de cette protéine. La réalisation de PCR quantitative en temps réel a permis la quantification des gènes d'intérêts grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Différents Western blot ont également été réalisés dans le but de mettre en évidence la présence de certaines protéines clés dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants.



# 1. Partie théorique

## 1.1 Présentation du SCK•CEN

Le SCK•CEN (Studiecentrum voor Kernenergie • Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire) fondé en 1952 est l'un des plus grands centres de recherche de Belgique. L'implantation du site se situe à Mol, en province d'Anvers. Constitué de 700 collaborateurs, le SCK•CEN se consacre quotidiennement aux développements d'applications pacifistes de la radioactivité. Ces applications sont principalement destinées au monde médical, industriel et à celui de l'énergie. Les principaux thèmes de recherche au sein du SCK•CEN sont la sûreté des installations nucléaires, la gestion durable des déchets radioactifs, ainsi que la protection de la population et de l'environnement contre les rayonnements ionisants. Néanmoins sa mission en tant que Fondation d'Utilité Publique est d'ouvrir de nouvelles perspectives à l'énergie nucléaire et aux rayonnements ionisants. Le centre regroupe de nombreuses infrastructures dont plusieurs réacteurs qui permettent l'étude approfondie de l'énergie nucléaire et des radiations, ainsi que la production d'isotopes radioactifs à usage médical. Mon stage s'est effectué au sein du bâtiment GKD, dans l'unité de radiobiologie en recherche fondamentale. Les principaux objectifs au sein de cette unité de recherche fondamentale sont l'étude des risques des faibles doses de rayonnements ionisantes, l'optimisation des doses médicales de ces rayonnements ainsi que les mesures et les analyses radiologiques. Il y a également l'unité de radioprotection qui vise à étudier les impacts des rayonnements ionisants sur l'homme et l'environnement. En plus d'être un laboratoire de recherche performant, le SCK•CEN dispense régulièrement des cours et propose des formations aux académiciens et travailleurs du monde nucléaire.

## 1.2 Les rayonnements ionisants

### 1.2.1 Introduction

Comme le montre la figure 1, nous sommes quotidiennement entourés par de nombreux types de rayonnement.

Certains de ces **rayonnements** sont dits **ionisants**, car ils sont capables d'ioniser la matière

c'est à dire qu'ils émettent des rayons d'énergie suffisants pour transformer les atomes qu'ils traversent en ions. Il existe différents types de radiations ionisantes (IRSN, 2012);

- **Les rayonnements directement ionisants** constitués de particules chargées, de protons, d'électrons ou de particules  $\alpha$ , qui ionisent directement la matière.
- **Les rayonnements indirectement ionisants** émettent des éléments non chargés; neutrons, rayon  $\gamma$  et X, qui par leur passage au travers de la matière vont mettre en mouvement des particules directement ionisantes.

Alors que d'autres types de **rayonnement** sont dits **non-ionisants** car ils ne possèdent pas l'énergie suffisante pour modifier l'atome qu'ils rencontrent. C'est le cas des micro-ondes, des ondes radio, des infrarouges,...

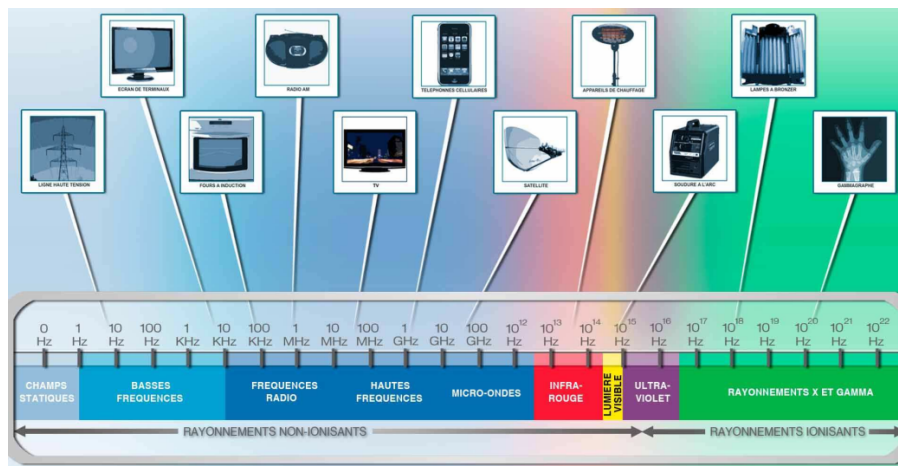


Figure 1: Illustration des différents rayonnements dans notre quotidien (IRSN, 2012)

Depuis la création de la Terre, il y a environ cinq milliards d'années, la matière était constituée d'éléments radioactifs et d'éléments stables. La radioactivité n'est donc pas une invention de l'homme mais bien un élément naturel présent sur Terre. Au fil du temps, cette radioactivité naturelle n'a cessé de décroître puisque de nombreux atomes radioactifs se sont transformés essentiellement en éléments stables. De nos jours, les principaux radionucléides naturels sont le potassium 40, l'uranium 238, l'uranium 235 et le thorium 232. Ces éléments radioactifs se retrouvent dans l'eau, l'air, le sol ainsi que dans les êtres vivants tels que l'Homme.

Sur Terre, nous sommes donc exposés à des faibles doses de rayonnements et c'est à travers l'évolution que nous nous sommes adaptés pour nous protéger de ces expositions à faibles doses. La majorité de l'exposition humaine aux rayonnements ionisants provient de contact avec des sources naturelles de radiation telles que le rayonnement cosmique, le rayonnement solaire, les radio éléments se trouvant à l'intérieur du corps humain ou encore principalement par l'émanation du gaz radon.

Suite aux progrès technologiques tant dans le domaine médical que dans le domaine de la production énergétique, l'Homme, en plus d'être exposé chaque jour à des rayonnements ionisants naturels, est soumis à une exposition supplémentaire aux radiations ionisantes. Par exemple, l'utilisation des rayons X s'est révélé être un outil indispensable dans le diagnostic et la thérapeutique contre le cancer.

Ainsi chaque année, la population est soumise à une exposition moyenne aux rayonnements de 4,65mSv par habitant par an (figure 2).

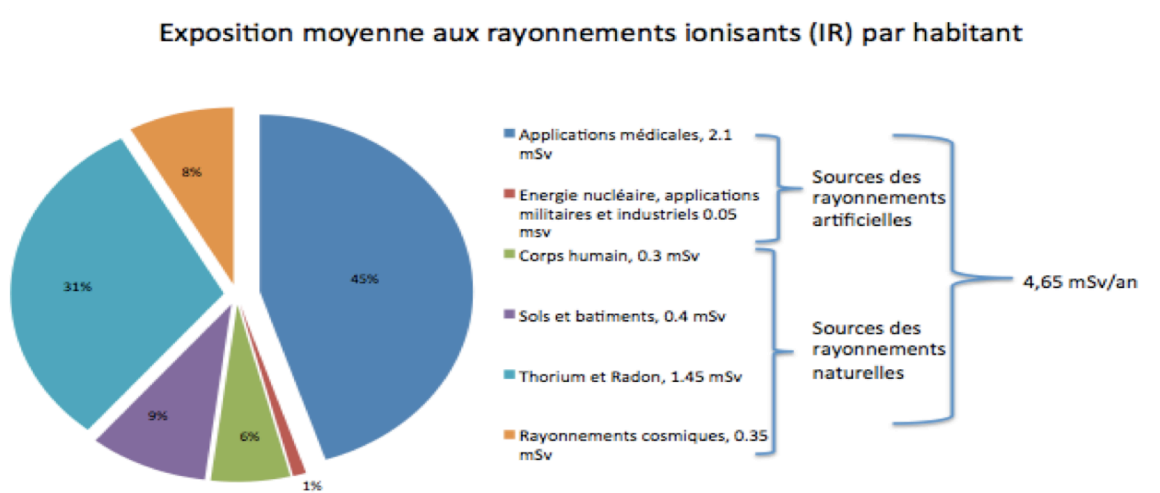


Figure 2: Exposition moyenne aux rayonnements ionisants par habitant (UNSCEAR 2008)

Au vue des connaissances actuelles, il est primordial de veiller à la sécurité des êtres humains contre les effets nocifs des rayonnements ionisants. Une attention particulière sera apportée aux individus sains qui par leur fonction professionnelle pourraient être exposés à des niveaux plus élevés de rayonnements ionisants tels que le personnel médical, les travailleurs de centrale nucléaire ainsi que les astronautes.

### 1.2.2 Différentes notions

Le becquerel (Bq) est l'unité qui mesure l'activité d'une quantité de nucléide radioactif. Il correspond à la désintégration d'un atome par seconde.

La notion de dose absorbée (Da) correspond à la quantité d'énergie absorbée par un kg de matériau ou de tissu. Elle s'exprime en Gray (Gy) et 1 Gy équivaut à 1 Joule/kilogramme.

La dose équivalente (H) permet la mesure de l'impact des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques. Elle tient compte de la nature du rayonnement et de leurs différents effets sur les tissus vivants. La dose équivalente s'obtiendra en multipliant la dose absorbée par un facteur de pondération dépendant de la nature des rayonnements. Cette dose équivalente s'exprime en Sievert (Sv).  $H = W_r \times Da$ . Les rayons X,  $\gamma$  et  $\beta$  étant similaires dans leurs effets, leur facteur de pondération est égal à 1. Dans le cas d'irradiation par rayons X, la dose équivalente correspondra dès lors à la dose absorbée.

La dose efficace (E) permet de prendre en compte le type de tissu traversé. Elle s'exprime également en Sievert. La dose efficace correspond à la dose équivalente multipliée par le facteur de pondération tissulaire ( $W_t$ ). Ce facteur est propre à chaque organe suivant sa radiosensibilité.

Le débit de dose (dD) permet la mesure de la dose absorbée par unité de temps. Cette grandeur prend en compte la durée de l'irradiation, et s'exprime en Gy/s (Toussaint, 2014).

### 1.3 Les effets biologiques des rayonnements ionisants: les dommages de l'ADN

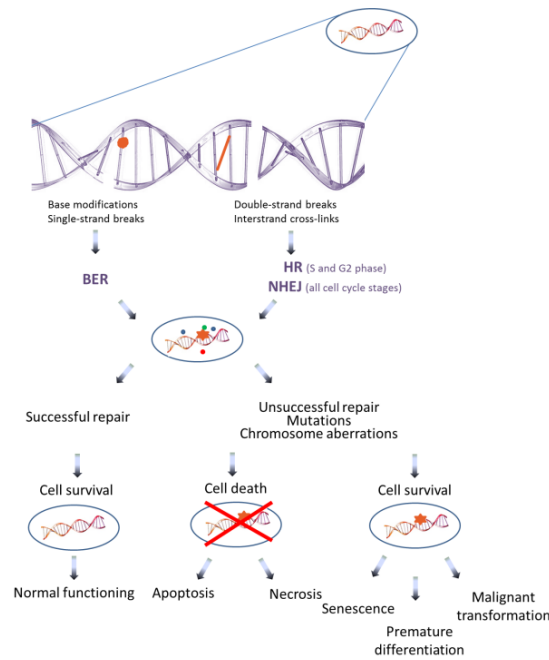
Les rayons ionisants peuvent pénétrer les organismes vivants et causer divers dégâts au niveau cellulaire. Deux mécanismes existent par lesquels les rayonnements ionisants affectent les cellules;

- soit par ionisation **directe** d'une molécule cible,
- soit **indirectement** par la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) tels que les radicaux libres, les ions ainsi que les peroxydes qui, après une série de réactions, peuvent finalement affecter la molécule cible.

En cas de dommages trop importants ou de défauts des mécanismes de réparation à ces dommages, deux effets biologiques peuvent être observés:

- **Effets déterministes** ou immédiats correspondant à la mort cellulaire. Après une forte irradiation par des rayonnements ionisants, on observe des effets immédiats sur les organismes vivants, comme par exemple, des brûlures de l'épiderme plus ou moins importantes.
- **Effets stochastiques** ou aléatoires correspondant à la production de cellules modifiées, cancéreuses. Suite à une exposition plus ou moins élevée à des rayonnements ionisants, on peut observer des effets à long terme sous forme de cancers.

La molécule biologique la plus sensible à ces rayonnements ionisants est l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) ((Munro et al 1970). Par ces deux mécanismes directs et indirects, les rayonnements ionisants peuvent causer des dommages à l'ADN en induisant des modifications chimiques. Lors de l'exposition cellulaire à un rayonnement, un grand nombre de lésions sont induites dans l'ADN (Figure 3). Il s'agit notamment des cassures simple brin (CSB), de lésions de base, de dommages au niveau des sucres, au niveau des sites apuriques/apyrimidiniques (sites AP), pontages intra et interbrins, pontages ADN protéines et des cassures double brin (CDB) (Steel, 1996).



*Figure 3: Dommages de l'ADN induits par les rayonnements, mécanismes de réparation et possibles conséquences dans les cellules de mammifères (Arena et al., 2014).*

Parmi ces lésions, la plus critique est la cassure double brin puisqu'il s'agit de la forme la plus nuisible des dommages à l'ADN en raison du fait qu'il n'y a pas de brin complémentaire pouvant agir comme matrice pour la réparation de la molécule (Wyman and Kannar, 2006). Si une cassure double brin n'est pas réparée, elle peut finalement évoluer pour former des cassures chromosomiques et des translocations qui sont associées à de nombreux problèmes durant le développement embryonnaire, à la neurodégénérescence, ainsi qu'à une prédisposition à l'apparition de cancers (Ghardi et al., 2012). Il a été démontré que le nombre de cassures doubles brins est induit linéairement par la dose de rayonnement (Rothkamm and Lobrich, 2003) (Figure 4).

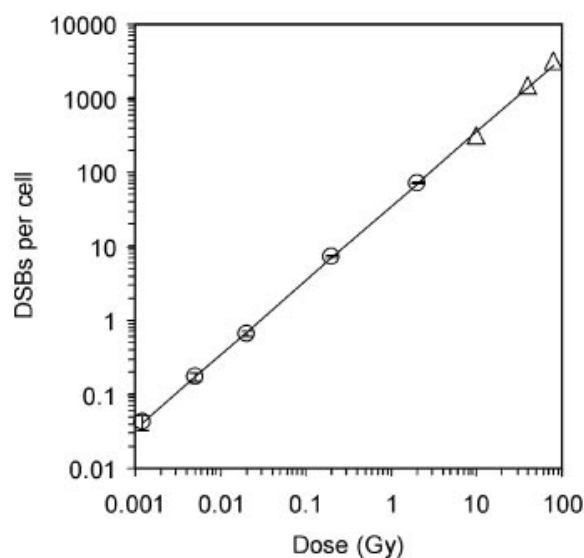


Figure 4: Nombre de cassures double brin par cellules en fonction de la dose (Gy) d'irradiation. Les cercles représentent les valeurs moyennes des foyers de  $\gamma$ H2AX par cellule (MRC-5) comptées 3 min après irradiation. Les triangles représentent les données d'induction des CDB obtenues à partir de l'analyse d'une électrophorèse en champ pulsé. La droite est un ajustement linéaire des données avec une pente de 35 CDB par cellule par Gy. (Rothkamm K. & Löbrich M., 2003)

## 1.4 Les réponses cellulaires aux rayons ionisants: la voie de la protéine p53

### 1.4.1 La protéine p53 : " gardien du génome cellulaire"

Les dommages causés à l'ADN tels que les cassures doubles brins provoqués par les rayonnements ionisants constituent une menace majeure pour l'intégrité du génome cellulaire. Les défauts de réparations de ces lésions peuvent entraver les processus de réplication et de transcription, ou entraîner des mutations et ainsi provoquer un dysfonctionnement cellulaire, la mort cellulaire ou le cancer (Jackson and Bartek, 2009). La cellule a donc élaboré un système de défense en réponse aux dommages de l'ADN, constitué d'un réseau complexe de signalisation. Ce vaste réseau de signalisation fonctionne rapidement et vigoureusement pour coordonner simultanément un grand nombre de systèmes cellulaires dans un processus hiérarchique exécuté à travers une série d'étapes très contrôlées (Ciccia and Elledge, 2010).

La réponse aux CDB comporte des modifications au niveau du transcriptome cellulaire. L'un des principaux facteurs de transcription (FT) qui mobilise cette réponse est la protéine p53 suppresseur de tumeur (Riley et al, 2008). Le rôle global de la p53 est de maintenir l'intégrité génomique de la cellule.

En l'absence de stress génotoxique, la p53 est maintenue à des niveaux de concentration faible pour limiter son impact sur la cellule. L'exposition aux rayonnements ionisants provoque des modifications post-transcriptionnelles de la p53 à des sites multiples qui contribuent à sa stabilisation ainsi qu'à l'activation de ses fonctions biologiques (Giaccia and Kastan, 1998).

La p53 joue un rôle important dans le sort de la cellule ;

- Soit la p53 va induire l'arrêt du cycle cellulaire de manière temporaire et induire la réparation de l'ADN.
- Soit la p53 va induire l'arrêt irréversible du cycle cellulaire et l'apoptose de la cellule. Ce mécanisme permet d'éviter les anomalies de l'ADN et ainsi empêcher la formation de cancer ou de tumeur (Riley et al, 2008).

Pour ce faire, elle va exercer son activité régulatrice de transcription par liaison directe à des séquences régulatrices de ses gènes cibles. Ces gènes étant impliqués dans une variété de voies, y compris dans la réparation de l'ADN (par ex., MSH2, MLH1, **PCNA**, XPC, **DDB2** et RAD51), la progression du cycle cellulaire (par ex., CDKN1A, GADD45A, BTG2, CCNG1 et 14-3-3 $\sigma$ ), l'apoptose (par ex., AX, BCLL, FAS/APO ainsi que les récepteurs de mort (**TNFRSF10B** et TNFRS6)) et autres (Helton and Chen, 2007).

#### **1.4.2 Les différentes étapes dans la réparation des cassures double brins**

La réponse cellulaire aux CDB est développée à travers une série d'étapes, impliquant capteurs (senseurs), transducteurs et protéines effectrices (effecteurs) (Figure 5). Les CDB sont d'abord détectés par des capteurs qui vont se lier à celles-ci. Ensuite, les transducteurs sont recrutés sur le site de dommages et servent à assembler le complexe de réparation des CDB sur le site de dommages et/ou d'activer la signalisation en aval, ce qui permet de



transmettre le signal des CDB aux effecteurs. Le transducteur initial et principal est l'ataxie télangiectasie mutée (ATM), appartenant à la famille des protéines kinases. L'ATM transmet le message par l'intermédiaire de divers moyens, y compris la phosphorylation des protéines telles que la protéine p53, l'histone H2AX ainsi que le point de contrôle kinase 2 (CHK2).

En l'absence de stress génotoxique, la protéine Mdm2 permet de maintenir la p53 sous sa forme inactive en se liant à celle-ci. La p53 ne pouvant donc plus se fixer à l'ADN et jouer son rôle de facteur de transcription. Une fois la p53 phosphorylée, elle perd son affinité avec la Mdm2 et se retrouve sous sa forme active. La p53 va donc jouer son rôle de facteur de transcription et va induire l'expression de certains gènes intervenant dans la réparation des dommages de l'ADN. Ce mécanisme aboutissant soit à la mort soit à la survie cellulaire (Mirzayans et al., 2013).

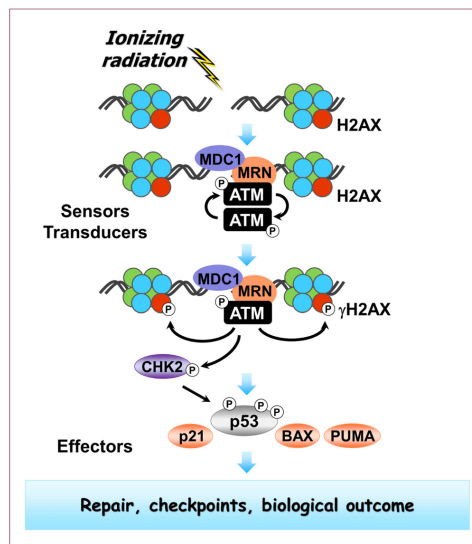


Figure 5: Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN causés par l'irradiation (Mirzayans, R., et al. 2013)

## 1.5 La dosimétrie biologique

Les êtres humains peuvent être exposés aux rayonnements provenant d'un certain nombre de sources où la connaissance de la dose d'exposition est essentielle pour déterminer le traitement approprié. Les installations des centrales nucléaires représentent un risque potentiel pour les accidents qui peuvent être causés par des phénomènes naturels comme les tremblements de terre ou par une erreur humaine. De même, une attaque terroriste sous la forme d'un dispositif nucléaire improvisé ou d'un radio-isotope dans un centre-ville, où des milliers de personnes peuvent être touchées, nécessiterait une évaluation rapide et précise du degré d'exposition qu'a subi chaque individu. D'autres expositions accidentelles peuvent se produire dans les domaines du travail où des radio-isotopes ou d'autres sources de rayonnement sont utilisés, mais ceux-ci n'impliquent généralement pas un grand nombre de personnes. En cas d'exposition massive d'une population aux rayonnements ionisants, il ne serait pas pratique de traiter de nombreuses personnes potentiellement exposées en raison des limites des ressources de traitement. Par conséquent, un plan de triage est nécessaire pour identifier les individus exposés à des doses de rayonnement supérieures à 1 Gy représentant les meilleurs candidats pour recevoir un traitement précoce bénéfique. Les personnes ayant été exposées à des doses plus faibles ( $<2$  Gy), ne courent pas de risque sur le court terme et ne nécessitent dès lors pas de traitement immédiat. Cependant, l'exposition à une très haute dose ( $>6$  Gy) provoquant une mort inévitable de la cellule, les individus ayant été exposés à de telles doses, ne peuvent malheureusement pas bénéficier de traitements curatifs.

Un certain nombre de réponses moléculaires et cellulaires à l'exposition aux rayonnements ont été identifiées et appliquées à la biodosimétrie. L'analyse des chromosomes dicentriques a été un test standard utilisé car il fournit une relativement bonne corrélation entre l'exposition et la dose (Romm et al., 2013). D'autres biomarqueurs ont été utilisés en biodosimétrie comprenant la phosphorylation de l'histone  $\gamma$ H2AX (Redon et al 2009), la résonance paramagnétique électronique (Swartz et al., 2007), l'expression des protéines (Ivey et al., 2009), les métabolites (Coy et al., 2011) et les niveaux d'expression génique (Kabacik et al., 2011).

## **1.6 Les changements dans l'expression génique comme biomarqueur de l'exposition**

Plusieurs exemples de biomarqueurs potentiels de l'expression génique aux RI peuvent être trouvés parmi les transcrits induits dans la voie de la p53. Un grand nombre des réponses transcriptionnelles aux RI sont dépendantes de la p53 et celle-ci est connue pour être un gène clé dans la sensibilité de la tumeur. L'une des premières études utilisant des microarrays portant sur l'effet des faibles doses à doses modérées de rayons gamma (0,2 à 2 Gy) a montrée une induction dépendante de la dose d'un certain nombre de gènes dans les cellules mononucléaires isolées à partir du sang humain périphérique (PBMC) jusqu'à trois jours après l'irradiation (Amundson et al., 2000). La plupart de ces gènes sont impliqués dans les voies de régulation de la p53 tels que la réparation des dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cependant, l'effet des rayonnements est beaucoup moins prononcé à des temps ultérieurs, ce qui indique une dégradation du signal des dommages de l'ADN. Plusieurs autres études ont confirmées ces résultats en utilisant souvent des méthodes différentes (différentes plates-formes de microarrays, des doses différentes, modification de la qualité du rayonnement, ou des types cellulaires) et bien que ces études aient souvent trouvées différents gènes étant exprimés différemment après l'irradiation, chacune d'elles ont trouvées une réponse régulée par la p53 s'atténuant avec le temps (Kang et al 2003, Mori et al 2004, Paul and Amundson., 2008). Cela indiquant que, dans les moments précoces (<24h), la réponse régulée par la p53 est un élément essentiel dans la détermination de plusieurs biomarqueurs possibles (par exemple CDKN1A, DDB2, CCNG1, PCNA, TNFRSF10B, GADD45A,...) pour l'exposition précoce à une grande gamme de doses de rayonnement. Au cours des dernières années, les profils d'expression génique, obtenus en utilisant la technologie des microarrays, ont également été utilisés à des fins de biodosimétrie. La plupart de ces études ont utilisé des cellules sanguines (PBMC, du sang complet, ou des lymphocytes en culture) pour les doses de rayonnement entre 0,5 et 10 Gy, sur une période de temps entre 4 et 24 h. Encore une fois, à partir de ces études, il a été démontré que les gènes impliqués dans les voies régulées par la p53 sont les facteurs prédictifs les plus adaptés de l'exposition aux radiations. Cela pourrait également être le cas pour d'autres types cellulaires ou des tissus, ceux-ci restent à être investigués.

Ainsi, il semble que les changements dans l'expression de certains gènes sont très bien adaptés pour estimer l'exposition de rayonnement, fournissant potentiellement plusieurs avantages par rapport aux essais cytogénétiques plus classiques qui demandent plus de temps

et de main-d'œuvre. Tout d'abord, l'analyse de l'expression d'un nombre limité de gènes est facile à réaliser, rapide et peu cher. En second lieu, ces essais n'ont besoin que d'une quantité limitée de matériau (sang, ARN), comme illustré par une étude récente dans laquelle un dispositif de biodosimétrie a été utilisé pour analyser l'expression des gènes à partir de petits volumes de sang (30  $\mu$ l) (Bregues et al., 2010). Cependant, dans le contexte d'une étude épidémiologique, un inconvénient important est le fait que les effets sur l'expression génique semblent être de courte durée. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir les recherches des gènes pour lesquels, son changement d'expression permettrait l'estimation des doses après plusieurs années après exposition. Notons cependant que les échantillons stockés de manière appropriée peu après l'exposition permettent déjà leur étude à des moments ultérieurs.

## **1.7 Objectif du travail**

Dans la première partie, nous étudierons les divers aspects pratiques de l'utilisation des biomarqueurs de l'expression des gènes en dosimétrie biologique. Nous réaliserons la comparaison de deux différents kits d'extraction de l'ARN afin de déterminer lequel est le plus approprié dans les différentes conditions. Nous tenterons également de déterminer l'importance de la conservation des échantillons sanguins en soumettant les différents kits à diverses modifications expérimentales. Après avoir déterminé les conditions expérimentales les plus appropriées, nous réaliserons l'étude de l'expression des gènes en réponse à des rayonnements ionisants par la technique de PCR quantitative.

Dans la seconde partie, ce travail se consacrera à l'étude de deux lignées cellulaires ; TK6 et NH32 n'ayant pas subi d'irradiation. Nous tenterons de confirmer la présence de cette protéine p53 dans les cellules TK6 ainsi que son absence dans les cellules NH32 par la technique Western blot. Une fois confirmation de la présence/absence de cette protéine dans nos deux lignées cellulaires, l'étude de l'expression de gènes en réponse aux radiations ionisantes sera réalisée par PCR quantitative. Les résultats permettant de faire le lien entre la surexpression de certains gènes en réponse aux radiations et la présence de cette protéine.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 Les modèles biologiques**

#### **2.1.1 Le sang total et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs)**

Dans la première partie de ce stage, le modèle d'étude choisi était le sang total, car il offre l'avantage d'être plus représentatif de l'organisme comparativement aux cultures de lignées cellulaires. De plus, le sang entier constitue un tissu facilement prélevable.

Pour ces expériences, le sang total a été prélevé à partir de donneurs sains, soit collecté dans des tubes EDTA (anticoagulant), soit dans des tubes spécifiques PAXgene, conçus pour optimiser la préservation de l'ARN et l'extraction à partir de sang total. Des échantillons de sang ont été utilisés pour la comparaison de deux kits d'extraction d'ARN, ainsi que pour l'étude de l'expression de gènes en réponse à une irradiation.

Dans certains cas, les expériences ont été réalisées au départ de PBMCs, isolées à partir de sang total traité à l'EDTA. Ces cellules mononucléaires provenant du sang périphérique (PBMCs ou peripheral blood mononuclear cells) comprennent principalement les lymphocytes, les monocytes et les macrophages. L'isolation de ces PBMCs a été réalisée par la méthode Histopaque (Annexe 1).

Les PBMCs ont été utilisées pour la coloration par immunofluorescence des histones  $\gamma$ H2AX. Ces cellules ont également été utilisées comme échantillons de référence pour vérifier la contamination par l'ARNm de la globine dans les échantillons d'ARN extraits à partir de sang total.

#### **2.1.2 Les cultures cellulaires**

##### **2.1.2.1 Les cellules TK6 et NH32**

Dans la deuxième partie de ce stage, deux lignées cellulaires dérivant du même progéniteur (WIL-2) ont été étudiées. Les cellules TK6 et NH32 ont été sélectionnées sur base de leur statut p53. La lignée lymphoblastoïde humaine TK6 exprime la protéine p53 sauvage (p53+/+), contrairement à une de ces variantes; la NH32 dont le gène p53 a été totalement inactivé par double recombinaison homologue (p53-/-).

Cette lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (WIL-2) provient de lymphocytes B prélevés à partir d'une rate. Ces lignées cellulaires dérivées (TK6 et NH32) sont des cellules dites "immortelles". Ces cellules proliférant à l'infini, permettent donc de disposer de quantité très importante de matériel cellulaire.

Cependant, elles présentent le désavantage de ne pas être représentatives de l'organisme étant donné qu'il s'agit de "cellules immortalisées". L'étude en parallèle des ces lignées cellulaires avec les échantillons sanguins permettra de vérifier que l'expression de certains gènes est bien semblable entre ces deux matériels biologiques.

#### 2.1.2.2 Conditions d'incubation

Ces cellules proliférant en suspension, sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™ additionné de 10 % de FBS (sérum fœtal bovin) préalablement inactivé pendant une heure à 56°C. Les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous atmosphère saturée en humidité et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

Ce milieu RPMI contient du glutathion ainsi que des agents réducteurs et une forte concentration en vitamines. Le supplément GlutaMAX™ minimise l'accumulation d'ammoniaque et améliore ainsi la croissance et la viabilité cellulaire. La présence d'un système tampon composé de bicarbonate de sodium et de 5% en CO<sub>2</sub> assure un pH physiologique aux cellules. Cependant, ce milieu ne contenant ni protéines, ni lipides, ni facteurs de croissance, il est nécessaire d'ajouter 10% du sérum fœtal bovin.

## 2.2 Irradiation *in vitro*

Dans le cadre de l'étude de l'expression de gènes en réponse à une irradiation, le sang de cinq donneurs sang a été prélevé dans des tubes contenant un anticoagulant, l'EDTA. Pour chacun des donneurs, trois échantillons de sang ont été irradiés par des rayons X (250 kV – 12 mA, 3.8 mm Al + 1.4 mm Cu filtration) à différentes doses; 0, 0,1 et 1 Gy à un débit de dose de 0,14 Gy/min. L'extraction de l'ARN s'est réalisée après 8 et 24 heures suivant l'irradiation, à l'aide du kit Qiagen « QIAamp® RNA Blood kit » (Tableau 1).

Pour la conservation des échantillons, trois des tubes sanguins (donneurs 1, 2 et 3) ont été placés à l'étuve à 37°C sous agitation alors que d'autres échantillons (donneurs 4 et 5) ont été conservés sous agitation mais à température ambiante.

	Extraction après 8 heures	Extraction après 24 heures
<b>Pour chacun des 5 donneurs</b>	0 Gy	0 Gy
	0,1 Gy	0,1 Gy
	1 Gy	1 Gy

Tableau 1: Conditions expérimentales des doses d'irradiation et des temps d'extractions après irradiation

Des tubes de sang ont également été prélevés à partir de deux autres donneurs et conservés sous agitation à 37°C. Ces échantillons ont été soumis à une plus large gamme de doses d'irradiations allant de 0 à 4 Gy (Tableau 2). L'extraction de l'ARN a été réalisée après un temps de 24 heures après irradiation à l'aide du kit Qiagen « QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood kit ».

	Extraction après 24 heures						
<b>Donneur n°1</b>	0,00 Gy	0,25 Gy	0,50 Gy	1,00 Gy	2,00 Gy	3,00 Gy	4,00 Gy
<b>Donneur n°2</b>	0,00 Gy	0,25 Gy	0,50 Gy	1,00 Gy	2,00 Gy	3,00 Gy	4,00 Gy

Tableau 2: Conditions expérimentales d'une large gamme de dose d'irradiation

Les cultures cellulaires des lignées TK6 et NH32 ont quant à elles été exposées à des doses d'irradiation de 1 et 3 Gy. L'extraction de l'ARN s'est également effectuée à différents moments après l'irradiation permettant ainsi d'observer la réponse cellulaire sur différents laps de temps. Chaque échantillon étant réalisé en 3 exemplaires. Des cellules soumises aux mêmes conditions mais n'ayant pas subi d'irradiation ont servi de référence (Tableau 3).

	Extraction après 12 heures	Extraction après 24 heures
<b>TK6</b>	0 Gy	0 Gy
	1 Gy	1 Gy
	3 Gy	3 Gy
<b>NH32</b>	0 Gy	0 Gy
	1 Gy	1 Gy
	3 Gy	3 Gy

Tableau 3: Conditions expérimentales des doses d'irradiation soumises aux lignées cellulaires

## **2.3 Extraction de l'ARN au départ de sang total humain**

L'extraction de l'ARN peut se réaliser à l'aide de différents kits. Les deux kits utilisés étaient le kit « PAXgene Blood RNA system »<sup>1</sup> ainsi que le kit « QIAamp® RNA Blood kit »<sup>1</sup> fournis par la firme Qiagen. Avant la réalisation de l'extraction de l'ARN à partir du sang total il est également possible d'isoler les PBMCs avant extraction. Cette étape permettant d'éviter les contaminations par l'ARNm de la globine.

Les différents kits expliqués ci-dessous reposent tous deux sur le même principe. A l'aide de membranes contenues dans des colonnes, les différents constituants seront soit retenus soit éliminés afin de permettre leur séparation. Une colonne spécialement conçue pour retenir l'ARN sur sa membrane est utilisée dans les deux différents kits. Cette membrane de silice possède des propriétés de liaisons sélectives avec l'ARN. Ces kits usent également de la technologie de microcentrifugation afin d'augmenter la vitesse de séparation des différents constituants.

Ces kits permettent de remplacer les méthodes fastidieuses et chronophages telles que les méthodes par précipitation à l'alcool, et les méthodes de centrifugation en gradient de densité ou encore de remplacer les méthodes demandant l'usage de substances toxiques telles que le phénol et le chloroforme.

### **2.3.1 Extraction de l'ARN à partir du kit « PAXgene Blood RNA System »**

#### **2.3.1.1 Principe et appareillage**

Le premier kit utilisé afin de réaliser l'extraction de l'ARN est le kit "PAXgene Blood RNA system"(Figure 6). Ce kit est constitué de tubes de prélèvements sanguins (« PAXgene Blood

---

<sup>1</sup> Dans la suite de ce travail le kit « PAXgeen Blood RNA system » sera denommé par « PAXgene » et le kit « QIAamp RNA blood Mini kit » par « Qiagen ».



RNA Tube ») ainsi que d'un kit de purification des acides nucléiques (« PAXgene Blood RNA kit »).

Ces tubes pouvant recevoir 2.5 ml de sang ont été conçus pour collecter mais également conserver et transporter les échantillons sanguins. Ils contiennent un stabilisateur du matériel génétique protégeant les molécules d'ARN de la dégradation causées par les RNases. La congélation des tubes de sang avant extraction de l'ARN est dès lors possible grâce à la présence de ce stabilisateur. Ce réactif permettant également de minimiser l'induction de l'expression génique dû au prélèvement sanguin. Le kit va permettre une isolation ainsi qu'une purification de l'ARN intracellulaire à partir du sang total en vue de la réalisation de tests moléculaires telle que la PCR quantitative. La méthode de purification de l'ARN sera réalisée de manière manuelle mais cette méthode est également automatisable.

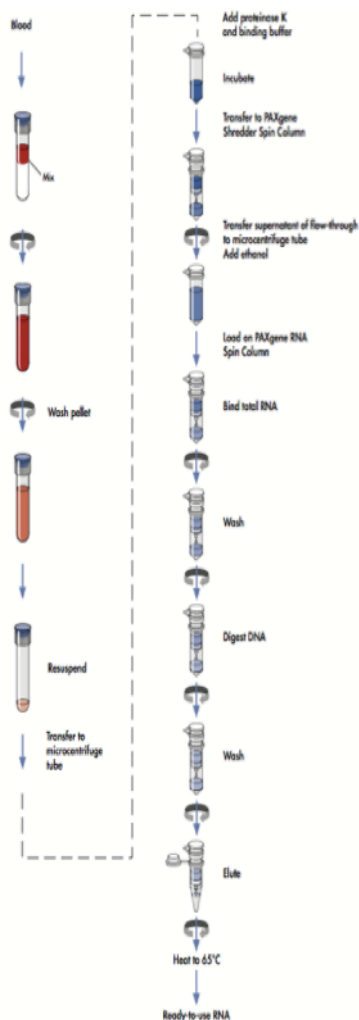


Figure 6: Procédure d'extraction d'ARN (Qiagen, 2009)

La purification de l'ARN débute par une étape de centrifugation du tube PAXgene afin d'obtenir un culot d'acides nucléiques. Le culot sera ensuite lavé et remis en suspension dans un tampon contenant une enzyme, la protéinase K, provoquant la digestion des protéines. Une étape de centrifugation à travers la colonne « PAXgene Shredder » va permettre l'homogénéisation du lysat ainsi que l'élimination des débris cellulaires résiduels. L'éluât, contenant l'ARN, sera récupéré et mélangé à de l'éthanol 70% afin d'améliorer les conditions de liaison entre l'ARN et la membrane de la colonne « PAXgene RNA column ». Le mélange sera ensuite déposé dans cette colonne, qui après une brève centrifugation permettra l'élimination des contaminants tout en conservant l'ARN lié à la membrane de silice. Afin de s'assurer de l'élimination des contaminants, deux étapes de lavages de la membrane vont être effectuées. La membrane sera également traitée à l'aide de DNase I afin d'éliminer les traces d'ADN lié à la membrane. L'ARN est dès à présent prêt à être élué dans 40 µl d'un tampon spécifique.

### 2.3.1.2 Protocole

Le mode opératoire se trouve en annexe 3.

## 2.3.2 Extraction d'ARN à partir du kit Qiagen « QIAamp® RNA Blood kit»

### 2.3.2.1 Principe et appareillage

Le deuxième kit utilisé est le “QIAamp RNA Blood Mini Kit” (Figure 7). Cette méthode permet l'extraction de l'ARN cellulaire à partir de 1,5 ml de sang total humain. Ce kit permet l'élimination complète des contaminants et des enzymes inhibitrices telles que l'hémoglobine et l'héparine, permettant ainsi une purification optimale de l'ARN.

De plus, ce kit permet la purification de l'ARN à partir de tissus et de cultures cellulaires. Il permet également la séparation de l'ARN des protéines, de sel ou d'autres composants de réaction après réactions enzymatique.

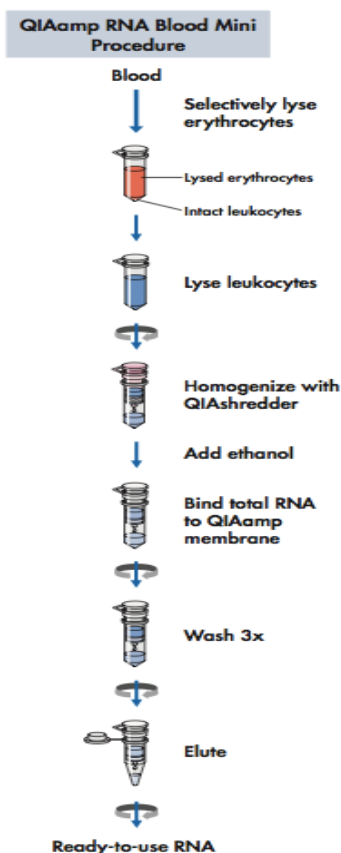


Figure 7: Procédure d'extraction de l'ARN QIAamp RNA Blood Mini

Au cours de la purification de l'ARN à partir du sang total, les érythrocytes vont être lysés et les leucocytes vont quant à eux être récupérés par centrifugation. Les leucocytes vont ensuite être lysés en utilisant une solution inactivant immédiatement les Rnases, conservant ainsi l'ARN intact.

Une brève centrifugation au travers d'une colonne QIAshredder est réalisé afin d'homogénéisation du lysat. Une solution d'éthanol 70% est ajoutée au lysat permettant d'améliorer les conditions de liaison sélective entre l'ARN et la membrane. La solution sera ensuite déposée sur la colonne QIAamp. Après une brève étape de centrifugation, l'ARN est dès lors retenu sur la membrane de silice. Les contaminants sont quant à eux éliminés. L'ARN sera ensuite élué dans 30 µl d'eau exempt de RNases.

Cependant, cette méthode possède un inconvénient. Cette méthode nécessitant des leucocytes intacts, le sang utilisé ne pourra avoir été congelé au préalable. En effet, la congélation des prélèvements sanguins entraîne la lyse d'un grand nombre de cellules, libérant des endonucléases responsables de la destruction du matériel génétique. L'ARN se trouve dès lors difficilement isolable puisqu'il est emprisonné dans les débris cellulaires.

#### 2.3.2.2 Protocole

Le mode opératoire se trouve en annexe 4.

## 2.4 Quantification de l'ARN

### 2.4.1 Principe et appareillage

Après extraction de l'ARN, il est possible de quantifier celui-ci à l'aide de l'automate « Trinean Xpose<sup>®</sup> ». Cet automate permet de déterminer la concentration en ADN, ARN et en protéines contenue dans l'échantillon. Son principe repose sur la spectrophotométrie UV/V dont la gamme de lecture est comprise entre 230 et 750 nm. Les acides nucléiques absorbant à une longueur d'onde de 260 nm et les protéines à une longueur d'onde de 280 nm. L'automate calculera dès lors le ratio  $A_{260}/A_{280}$ , permettant de juger de la contamination de l'ARN par les protéines. Il permet également la mesure d'un second ratio :  $A_{260}/A_{230}$  qui renseigne sur la présence éventuels d'autres contaminants tels que le phénol, les composés aromatiques, etc....

Les mesures s'effectuant à l'aide de « Slide 200 » possédant une gamme d'absorbance comprise entre 0,03 et 200 DO (densité optique). Une unité de DO correspondant à 40 mg/ml d'ARN.

### 2.4.2 Protocole

La mesure de l'ARN s'est réalisée d'après le protocole se trouvant en annexe 5.

## 2.5 Analyse qualitative de l'ARN

### 2.5.1 Principe et appareillage

Avant l'utilisation de l'ARN préalablement extrait, il est nécessaire de contrôler la qualité de celui-ci. L'intégrité de l'ARN va être vérifiée à l'aide du kit « RNA 6000 Nano Assay » ainsi qu'à l'aide de l'automate « Agilent 2100 Bioanalyseur ». Le kit contient des puces et des réactifs spécifiquement conçus pour l'analyse de l'ARN total.

L'analyse de l'intégrité se base sur le principe de micro-électrophorèse. Une faible quantité d'ARN est déposée dans chaque puits en présence d'un marqueur fluorescent permettant la visualisation de l'ARN. L'utilisation d'un « ladder » ou marqueur de poids moléculaire va quant à lui servir d'étalon pour l'analyse qualitative et quantitative.

Les résultats peuvent être visualisés sous formes de gels mais également sous forme d'électrophorégrammes et le logiciel évalue l'intégrité de chaque échantillon d'ARN en lui attribuant un indice de qualité, le RIN à chaque échantillon.

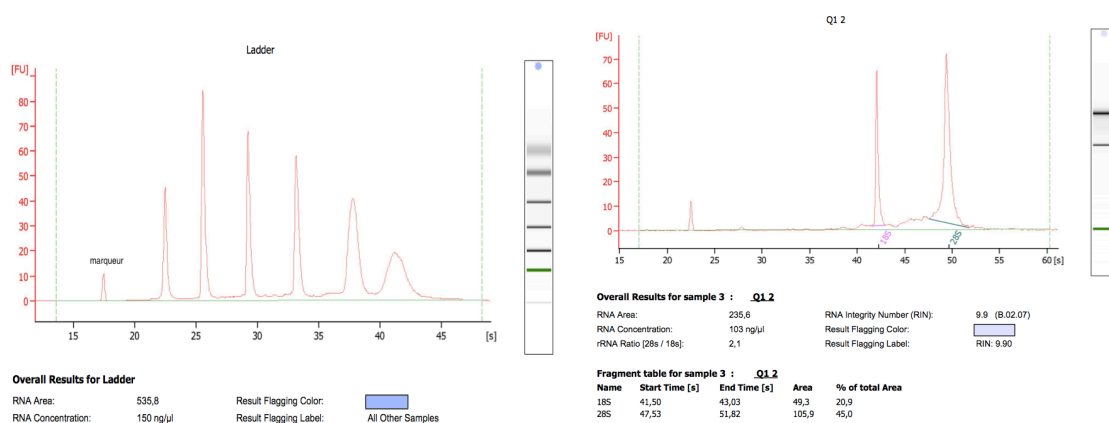


Figure 8: Résultats obtenus à partir du ladder (à gauche) et à partir d'un échantillon (à droite)

### 2.5.2 Analyse des résultats

Durant l'analyse des résultats, il faudra être particulièrement attentif à 3 choses;

- La première étape consiste à valider le « ladder » ou marqueur de poids moléculaire. La qualité de séparation du ladder va déterminer la qualité générale de la puce. Il va mettre en évidence son bon fonctionnement de migration (Figure 8).

- L'observation de la position du pic du marqueur fluorescent (qui a été préalablement ajouté au gel) va également être un point important. Ce pic présent dans l'ensemble des échantillons et sortant en premier (entre 20 à 25 sec), va permettre d'aligner les profils entre eux.
- Après vérification des deux points précédent, l'observation des échantillons peut être effectuée. Afin de juger de la qualité de l'ARN, on veillera à contrôler:
  - le ratio 28S/18S dont la valeur optimale est de 2 (2:1). Plus la qualité de l'ARN diminue plus le ratio diminue. Le 28S correspond à l'ARN<sub>ribosomal</sub> de la grande sous unité ribosomique alors que le 18S correspond l'ARN<sub>ribosomal</sub> de la petite sous unité ribosomique.
  - La valeur de RIN (= RNA Integrity Number), qui est comprise entre 1 et 10 est déterminée par calcul en prenant en compte l'ensemble du profil électrophorétique. Plus cette valeur est élevée plus la qualité de l'ARN est bonne. Il permet d'obtenir un niveau de qualité de l'ARN plus fiable que celui établi par le ratio 28S/18S. Afin de pouvoir obtenir des résultats optimaux par la qPCR, on veillera à avoir un RIN supérieur à 7.

## **2.6 La PCR quantitative en temps réel**

### **2.6.1 La transcription inverse**

Dans le cadre de l'étude de l'expression de gènes, l'amplification doit se réaliser à partir de l'ARN. Afin d'appliquer la qPCR à l'étude de l'ARN, l'échantillon doit d'abord subir une étape dite de rétrotranscription, ou de transcritpion inverse, transformant l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc va servir de matrice utilisable par la polymérase.

Après avoir extrait l'ARN, le protocole se trouvant en annexe 7 a été suivi afin d'obtenir de l'ADNc utilisable pour la qPCR.

La Kit utilisé pour cette rétrascriptpion est le kit commercialisé par la firme Promega : « GoScript™ Reverse Transcritpion System » contenant ; du tampon RT buffer,

MgCl<sub>2</sub>, dNTP, un inhibiteur de RNase, la transcriptase inverse et l'amorce hexanucléotidique aléatoire. Un thermocycleur permettant une variation de température de manière automatisable a été employé. Le thermocycleur utilisé est le thermocycleur « GeneAmp® PCR System 9700 ».

Une fois l'étape de transcription inverse terminée, la concentration en ADNc de tous les échantillons est ajustée à 1 ng/μl.

## 2.6.2 La PCR quantitative en temps réel

Contrairement à la PCR classique qui permet uniquement une analyse en point final, la PCR quantitative en temps réel va permettre la quantification de l'ADN synthétisé en temps réel.

La technique de la PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification des amplicons formés à l'aide d'un marqueur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons, c'est-à-dire aux fragments d'ADN amplifiés lors de la PCR. Les PCR quantitative ont été réalisées à l'aide de l'automate 7500 Real-Time PCR Systems.

Le marqueur fluorescent utilisé pour la détection de l'amplicon est le SYBR Green I (figure 9). Le SYBR Green est un fluorophore spécifique de l'ADN double brin. Lorsque celui-ci se trouve à l'état libre, il n'émet qu'une très faible fluorescence, mais une fois lié à l'ADN db, il va émettre une fluorescence importante. En PCR quantitative en temps réel, la mesure de cette fluorescence s'effectue au cours de l'étape d'élongation de chaque cycle, durant laquelle l'ADN se trouve sous sa forme double brin.

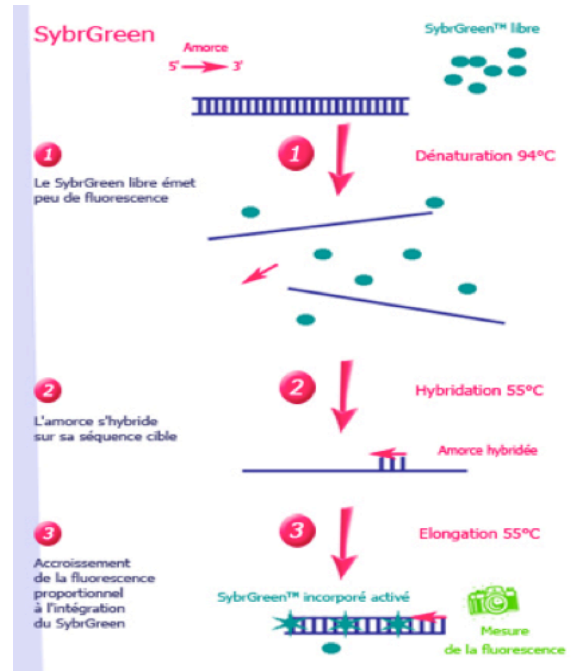


Figure 9: Principe de détection par SYBR Green

En suivant la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de celle-ci en trois phases distinctes (Figure 10) :

- La **phase de bruit de fond** pour laquelle la quantité de fragments amplifiés est trop faible pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond. Cependant, durant cette phase, l'amplification se trouve déjà sous forme exponentielle.
- La **phase exponentielle** où la quantité de fragments amplifiés va générer un signal fluorescent supérieur au seuil de détection défini par l'appareil. C'est durant cette phase que l'on observe que le logarithme de la quantité de produits formés est proportionnel au logarithme de la quantité d'ADN de départ. Durant cette phase linéaire, le nombre de produits amplifié doublera à chaque cycle.
- La **phase plateau ou de saturation**, pour laquelle certains composants de la réaction, tel que l'enzyme, vont devenir limitant. Le système ne permettant plus une amplification exponentielle, la quantité de produit formé n'est plus proportionnelle à la quantité d'ADN de départ.

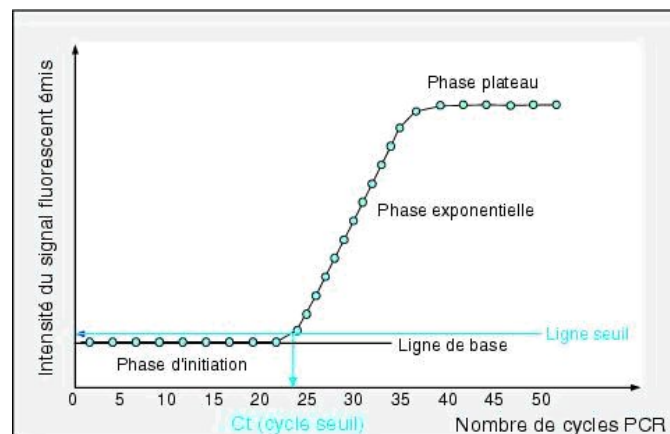


Figure 10 : Graphique de l'amplification qPCR. Intensité du signal fluorescent en fonction du nombre de cycle qPCR.

Durant la phase exponentielle, une des mesures importantes sera la détermination du nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal supérieur au seuil de détection. Cette valeur appelée Ct (cycle threshold ou cycle seuil) est en corrélation directe avec la quantité d'ADN initiale. Étant donné que plus la quantité initiale d'ADN est importante, moins il faudra de cycle pour que le signal dépasse la valeur seuil, la valeur du Ct est donc inversement proportionnelle à la concentration d'ADN initiale. On observe donc un déplacement horizontal de la courbe en fonction de la valeur du Ct et donc de la concentration d'ADN initiale.

## 2.6.3 Essai d'un nouveau couple d'amorces

### 2.6.3.1 Détermination du rendement de la PCR

Afin de déterminer le rendement des amorces utilisées il est nécessaire de réaliser une courbe de dilution standard (Figure 11). La réalisation de dilutions d'un échantillon d'ADN pris comme référence va permettre d'obtenir une droite d'étalonnage du Ct en fonction de la concentration en ADN. Une série de 5 dilutions successives allant de la concentration initiale à une dilution 1 : 625 va être appliquée et chacune de ces dilutions va être réalisée en triplacas.

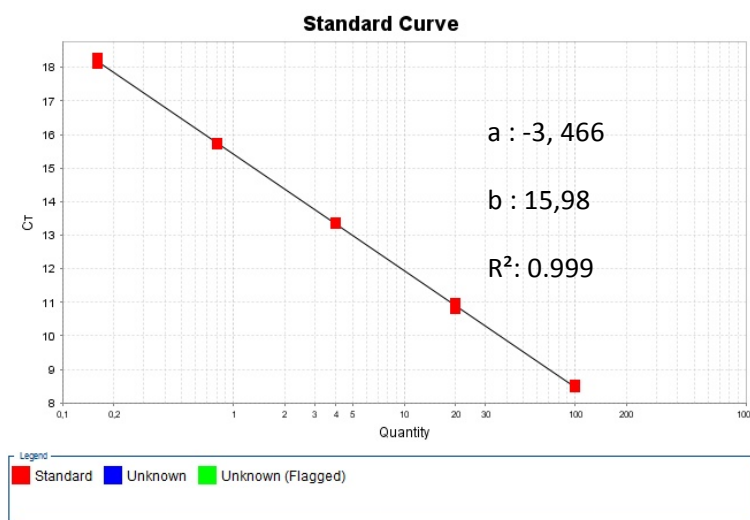


Figure 11: Droite de standardisation utilisée dans le but de déterminer l'efficacité des amorces de l' $\alpha$ -2 globine

Suite à la détermination de la droite de régression, on obtient l'équation suivante :

$$Ct = a(\log_{10}Q_0)+b$$

Où a = pente de la droite

b = intersection avec l'axe y

et  $Q_0$  = quantité initiale d'ADN

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) obtenu permet d'apprécier la linéarité de la qPCR. Ce  $R^2$  reflétant la dispersion des points par rapport à la droite de régression.



L'efficacité (E) de la qPCR, est déterminée par :  $E = 10^{-1/a}$ . Cette efficacité étant propre à chacune des amorces d'un gène cible, il est nécessaire de la déterminer pour chaque nouvelle amorce utilisée.

Le nombre initial d'ADN peut être déterminé par l'équation suivante :

$$N_0 = N_n * E^n$$

Où n = nombre de cycle

$N_0$  = quantité initiale d'ADN

$N_n$  = quantité d'ADN après n cycle

### 2.6.3.2 Test de la spécificité des amorces par une courbe de fusion

L'utilisation du SYBR Green ne permettant pas une coloration spécifique des amplicons, la spécificité de l'amplification ne dépend dès lors que des amorces utilisées. Afin de vérifier cette spécificité, une courbe de fusion est déterminée.

Cette courbe de fusion va permettre de vérifier que les deux amorces possèdent une complémentarité parfaite avec la séquence cible, qu'elles ne permettent l'hybridation qu'à un seul endroit et donc qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. La courbe de fusion permet également de vérifier l'absence de hairpin (repliement de l'amorce sur elle-même par complémentarité des bases) ainsi que l'absence de complémentarité entre les deux amorces.

Après une série de 40 cycles, les amplicons formés vont être soumis à une augmentation de la température et la mesure de signal fluorescent se réalise en continu. La courbe obtenue correspondant à la variation de la fluorescence en fonction de la température.

En appliquant la dérivée première à cette courbe, on observe un pic mettant en évidence la  $T_m$ , soit la température de fusion propre à l'amplicon (FFiFigure 12).

L'obtention de plusieurs pics à des températures différentes ou un pic décalé par rapport au  $T_m$  attendu montrerait la présence d'un mélange d'amplicons ou d'amplicons possédant une séquence différente.

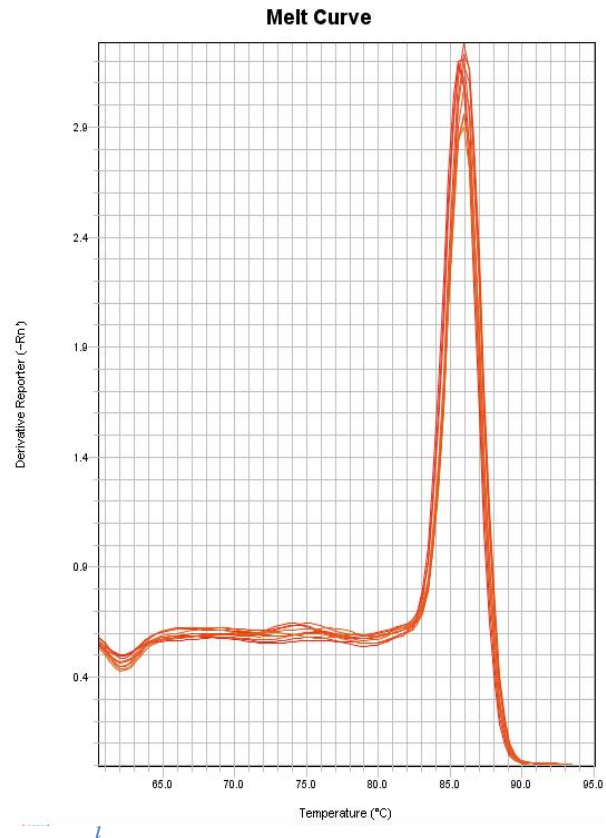


Figure 12: Dérivée première de la courbe de fusion de l' $\alpha$ -globine

#### 2.6.4 Quantification relative

Dans le cadre de l'étude de l'expression de gènes, la quantification a été réalisée par la méthode dite de quantification relative ou comparative. La quantification s'est réalisée par la méthode Pfaffl étant une variante de la méthode des  $\Delta\Delta C_t$  mais tenant compte de l'efficacité propre de chaque amorce du gène (Pfaffl, 2001).

Un des échantillons nommé calibrateur pour lequel on attribuera une valeur arbitraire de 1, va permettre la quantification des autres échantillons comparativement à ce calibrateur. Cet échantillon étant choisi comme référence, n'aura dès lors pas subi de modifications, telle qu'une exposition à des rayonnements. Les différentes données ont été analysées à l'aide du logiciel 7500 Fast Real-Time PCR System v2.06 et du programme Microsoft Excel ainsi que du programme GraphPad Prism 5.

### 2.6.5 Utilisation de Housekeeping gene (gène de référence)

La quantification se réalisant durant la phase exponentielle, une faible modification expérimentale, par exemple, durant l'étape de dilution de l'ADNc, peut modifier considérablement la valeur du Ct obtenu et donc fausser la comparaison des Ct.

Afin de s'assurer de la fiabilité de la comparaison des résultats, la quantification relative fait intervenir un gène de référence (Housekeeping gene). Ce gène de référence joue le rôle de standard interne dans la qPCR. Ce gène de référence dont l'expression est stable et qui ne se verra pas modifier par les conditions expérimentales.

Il permet dès lors le calcul de la quantité relative normalisée (NRQ) égale à :  $E^{\Delta Ct \text{ gène cible}} / E^{\Delta Ct \text{ std interne}}$ . Ce rapport permettant de normaliser la différence d'expression du gène d'intérêt en fonction de la différence d'expression du gène standard interne. Ce gène va donc permettre de corriger d'éventuelles erreurs se produisant tout au long du processus telles que des variations dans la quantité et la qualité des échantillons, le rendement d'extraction différent entre les échantillons, les variations d'efficacité de la transcription inverse ou encore d'annuler la présence d'un inhibiteur dans le milieu réactionnel,...

Les gènes de référence utilisés lors des diverses qPCR réalisées sont : le *HRPT1* ainsi que le *PGK1*. L'utilisation de deux gènes de référence augmente la fiabilité des résultats.

### 2.6.6 Analyse qPCR de gènes radio-induits

Plusieurs gènes sensibles aux rayonnements (identifiés préalablement à l'aide des microarrays) ont été choisis pour la réalisation de la PCR quantitative en temps réel. Ces gènes sélectionnés étant connus pour être des gènes cibles de la p53 : *DDB2*, *PCNA*, *FDXR* et *TNFRSF10B* ainsi que des possible gènes cibles de p53 : *VWCE* et *NDUFA6*. La réalisation de qPCR sur ces gènes va permettre de mettre en évidence la surexpression de ces gènes en réponse à une irradiation.

## **2.7 Extraction protéique**

L'extraction protéique s'est réalisée au départ des cellules TK6 et NH32 non irradiées ainsi qu'à partir des cellules TK6 irradiées. L'extraction a été effectuée par deux différentes méthodes d'extraction. L'extraction protéique a été réalisée par la méthode utilisant le tampon RIPA qui permet la lyse cellulaires et la solubilisation des protéines (annexe 8). La seconde méthode d'extraction protéique a été réalisée à l'aide du kit « AllPrep DNA/RNA/Protein » qui permet entre autre l'isolation et la purification des protéines (annexe 9). La quantification des protéines a été réalisée par la méthode BCA donnant une coloration pourpre aux protéines et permettant leur quantification par spectrophotométrie (annexe 10).

## **2.8 Coloration par immunofluorescence**

La coloration par immunofluorescence des histones H2AX phosphorylés ( $\gamma$ H2AX) a été réalisée à partir de PBMCs ayant été exposées à 1 Gy de rayons X ainsi qu'à partir de PBMCs témoins (non irradiées). Les cellules ont été fixées 2 heures après l'irradiation. Elles ont ensuite été perméabilisées et incubées avec un anticorps primaire de souris spécifique à la forme phosphorylée de l'histone H2AX (9F3, Abcam, avec un rapport de dilution de 1:300). Ensuite, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris-FITC (fluorescéine isothiocyanate) (F2012, Sigma Aldrich, avec un rapport de dilution de 1: 300). En dernier lieu, une contre-coloration du noyau a été réalisée à l'aide du colorant DAPI. Les cellules ont été visualisées à l'aide du microscope à fluorescence Nikon Ti avec un objectif à huile 40X Fluor.

Le protocole suivi pour la réalisation de la coloration par immunofluorescence se trouve en annexe 2.

## 2.9 Western blot

### 2.9.1 Principe et appareillage

Le western blot est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection de protéines à l'aide d'anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt.

Après avoir extrait les protéines des cellules, une première étape de dénaturation des protéines est nécessaire avant l'électrophorèse. On place le lysat protéique en présence d'un tampon appelé « tampon Laemmli ». Ce tampon contient une solution tampon (tampon tris), un colorant ; le bleu de bromophénol ainsi que du glycérol facilitant le dépôt des échantillons en augmentant leur densité par rapport au tampon. Il contient également un détergent ; le SDS qui dénature les protéines et leur confère une charge globale négative, permettant ainsi une séparation protéique uniquement sur base de leur poids moléculaire. Les échantillons sont ensuite incubés pendant cinq minutes à 95°C brisant les faibles liaisons intramoléculaires et déroulant ainsi complètement les protéines.

Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse et un courant électrique de 200 V est appliqué à l'aide de la station « Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra cell » (Figure 13). La migration des protéines peut être suivie à l'aide du bleu de bromophénol contenu dans le tampon Laemmli.

En plus des échantillons un marqueur de poids moléculaire va être déposé dans les des puits. Ce marqueur est composé de protéines précolorées de poids moléculaire connu permettant de surveiller la progression de l'électrophorèse des protéines, de confirmer l'efficacité du transfert et également de pouvoir déterminer le poids moléculaire des protéines transférées.

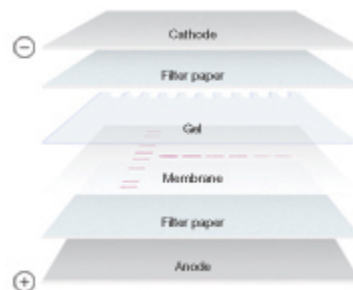
Le gel utilisé est un gel prêt à l'emploi « 4-15 % Mini PROTEAN<sup>®</sup>TGX Stain free <sup>TM</sup>» commercialisé par la firme Bio Rad. Le gel possédant un gradient de concentration en polyacrylamide (4-15%) et contenant du bisacrylamide comme agent réticulant, permet la séparation optimale des échantillons de large gamme de poids moléculaires.

Ce gel contient également un composant trihalo qui permet la visualisation rapide des protéines par fluorescence. Ce composé permet donc l'élimination des diverses étapes de coloration/décoloration requises pour la détection des protéines totales.



*Figure 13 : gel précoulé "Mini PROTEAN" et station (Biorad, 2014)*

Une fois les protéines séparées sur base de leur poids moléculaire, celles-ci sont transférées par électroblotting sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) à l'aide du système de transfert «Trans blot ® Turbo » de Bio Rad (Figure 14). La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique est appliqué. Les protéines chargées négativement vont donc migrer depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Les différentes protéines contenues dans le gel seront adsorbées sur cette surface mince facilitant les étapes de détections ultérieures.



*Figure 14: Illustration d'un transfert de membrane (Biorad, 2014)*

Afin d'éviter les interactions non spécifiques entre les anticorps primaires et la membrane, une étape de « blocage » de la membrane est nécessaire. La membrane va être saturée en présence d'un tampon de saturation contenant une solution protéique concentrée.

La membrane de PVDF est traitée par un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Il s'agit de l'anticorps primaire issu de diverses origines animales telles que de lapin, souris, poulet ou encore de rat, etc...

Après avoir éliminé par lavage l'excès d'anticorps primaire, la membrane est mise en contact avec un anticorps secondaire dirigé contre la fraction constante de l'anticorps primaire. Ainsi,

si un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine d'intérêt a été utilisé, l'anticorps secondaire sera par exemple un anticorps secondaire de souris anti-lapin. Cet anticorps secondaire est conjugué à une peroxydase HRP.

Une fois l'élimination par lavage de l'excès d'anticorps secondaire, la membrane est mise en contact avec le substrat, permettant la chimiluminescence amplifiée, de l'enzyme conjugué à l'anticorps secondaire. Cette peroxydase va réagir avec la solution contenant du peroxyde d'hydrogène et du luminol provoquant l'oxydation du luminol qui va retourner à son état fondamental en émettant de la lumière. Le produit formé permet donc la visualisation de la protéine d'intérêt.

## **2.9.2 Réactifs**

### 2.9.2.1 Pour l'électrophorèse

- Tampon « Laemmli sample buffer » (4x concentré)
- Tampon de séparation 1x concentré : tampon Tris-Glycine-SDS (TGS)
- Gel «4-15 % Mini PROTEAN®TGX Stain free™» (12 puits et 20 µl d'échantillons/puits)
- β-mercaptoéthanol
- Station « Mini-PROTEAN® Tetra cell »
- Marqueurs de poids moléculaire
  - Pour le western blot p53: « Full range Amersham Rainbow Marker»
  - Pour le western blot VWCE : « Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ »

### 2.9.2.2 Pour le blotting

- Système de transfert «Trans blot® Turbo »
- Membrane de PVDF «Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Pack»
- Tampon de saturation (5% lait écrémé dans du TBST (TBS contenant 0.1% de Triton X))
- TBST (Tampon Tris Salin + 0.1% triton X)

- Anticorps primaire
  - Pour le western blot p53 : anticorps monoclonal de souris anti p53 (P53 (DO-1) SC126)
  - Pour le western blot VWCE : anticorps polyclonal de lapin pour la protéine VWCE humaine (ab184772)
  - Pour le western blot de la p53 phosphorylée : anticorps primaire de lapin anti-p53 phosphorylée (p-p53(515))
- Anticorps secondaire : anticorps secondaire anti-lapin/anti-souris couplé à la HRP
- Solution de révélation : « Clarity™ Western ECL Blotting Substrate »

### 2.9.3 Protocole

#### 2.9.3.1 Préparation des échantillons protéiques

Le volume total pouvant être chargé dans chaque puits est de 20 µl. Chaque échantillon devra être mis en solution avec le tampon Laemmli 4 x concentré soit 5 µl par puits, ainsi que 0,5 µl de β-mercaptoéthanol. Le volume maximal d'échantillon sera donc de 14,5 µl et si nécessaire on complètera le volume avec de l'eau. Vortexer et centrifuger brièvement les échantillons. Incuber pendant 5 minutes à 95°C. Vortexer et centrifuger une seconde fois.

#### 2.9.3.2 Préparation des tampons

- Tampon de séparation (« running buffer ») : Ajouter 100 ml de tampon TGS 10x concentré à 900 ml d'eau milieuQ.
- Tampon de saturation (« blocking buffer ») : Pour la préparation du TBST, ajouter 0.1 % de Triton X à la solution de TBS. Ajouter 5% de lait écrémé.
- Solution d'Ac primaire : diluer l'anticorps primaire avec la dilution adéquate dans du tampon de saturation
  - ➔ Pour l'Ac anti p53 : dilution 1 : 1000
  - ➔ Pour l'Ac anti VWCE : dilution 1 : 500
  - ➔ Pour l'Ac p53 phosphorylée : dilution 1 : 200
- Solution d'Ac secondaire : diluer l'Ac secondaire (dilution 1 : 5000) dans du tampon de saturation



- Préparation de la solution de révélation ECL : Préparer 7 ml de solution ECL par membrane en mélanger un volume de la solution A avec un volume de la solution B. Cette solution est à préparer extemporanément ou à conserver à l'abri de la lumière.

### 2.9.3.3 Préparation du gel

Retirer le gel de son emballage et retirer la bande du fond du gel. Rincer à l'eau déminéralisée. Assembler la chambre électrophorétique et remplir la partie intérieure située entre les deux gels avec le tampon de séparation afin de s'assurer qu'il n'y a pas de fuite. Remplir la partie extérieure jusqu'à la ligne indiquée sur la station. Retirer délicatement les peignes et rincer les puits à l'aide du tampon de séparation. Le gel est maintenant prêt à être chargé.

### 2.9.3.4 Chargement des échantillons et du marqueur

Charger les échantillons (20 µl/puits) ainsi que le marqueur de poids moléculaire (5 µl). Si possible, on veillera à laisser les deux puits situés aux extrémités vides ainsi qu'un puits vide entre le marqueur.

### 2.9.3.5 Électrophorèse

Effectuer la migration à 200 V constant jusqu'à ce que le bleu de bromophénol contenu dans le tampon Laemmli sorte du gel. Cela dure environ 30 à 45 minutes. Une fois l'électrophorèse terminée, débrancher la station et retirer le gel. Optionnel : il est possible, après l'étape d'électrophorèse de visualiser les protéines totales, à l'aide du colorant contenu dans le gel, afin de vérifier que la séparation protéique s'est effectuée correctement.

### 2.9.3.6 Transfert

Assembler le système buvard comme indiqué sur l'emballage et le placer dans le système de transfert. Sélectionner le programme approprié tel que celui conçu pour les « mini gel ». Le transfert dure 7 minutes. Optionnel : Après l'étape de transfert, il est également possible de visualiser les protéines totales afin de vérifier que le transfert s'est effectué correctement.

### 2.9.3.7 Saturation de la membrane

Transférer la membrane dans le tampon de saturation et incubé pendant une heure et demie à deux heures.

### 2.9.3.8 Réactions avec les anticorps

Ajouter l'anticorps primaire avec la dilution appropriée. Incuber la membrane pendant une à deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Laver ensuite la membrane trois fois pendant 5 minutes avec du TBST.

Ajouter l'anticorps secondaire préalablement dilué (dilution 1 : 5000) et incubé pendant 45 minutes à température ambiante. Laver ensuite deux fois à l'aide du tampon TBST et une fois avec du tampon tris.

### 2.9.3.9 Révélation des liaisons Ac-protéine

Ajouter la solution ECL et incubé pendant 5 minutes. La membrane est maintenant prête à être visualisée.

### 2.9.3.10 Coloration des protéines totales à l'aide du bleu de Coomassie

Après la réalisation du western blot, il est possible de réaliser une coloration des protéines totales à l'aide du bleu de Coomassie. De plus, il est faisable de réutiliser cette même membrane afin de réaliser un second western blot à l'aide d'un autre anticorps primaire ciblant une autre protéine à mettre en évidence.

Pour ce faire la membrane doit subir une étape préalable dit de « décapage » permettant de retirer les anticorps présents sur la membrane.

- Retirer le milieu dans lequel la membrane se trouve afin d'éviter son dessèchement et rincer celle-ci dans du TBS. Ajouter 12 ml de la solution « Restore PLUS Western blot Stripping buffer ». Incuber 5 à 15 minutes. Retirer ensuite cette solution de décapage et laver la membrane dans du TBS. Laver deux fois dans du TBS et une fois dans de l'eau. La membrane étant maintenant prête à être colorée.
- Colorer une minute dans le bleu de Coomassie et décolorer 20 minutes dans une solution de décoloration (contenant : 80 ml d'eau, 20 ml d'acide acétique et 100 ml d'éthanol).

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 Coloration des $\gamma$ H2AX

Suite à une désintégration ionisante, la cellule va subir certains dommages tels que des cassures doubles brins au niveau de l'ADN. L'un des mécanismes important dans la réparation de ces dommages est la phosphorylation des histones H2AX. Ces histones H2AX phosphorylés sont appelés  $\gamma$ H2AX. La formation de ces molécules  $\gamma$ H2AX autour de chaque CDB donne lieu à des foyers  $\gamma$ H2AX qui peuvent être visualisés par des techniques d'immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques  $\gamma$ H2AX Ser139. Il est également possible de visualiser le noyau des cellules à l'aide de la coloration DAPI, celle-ci se liant fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN.

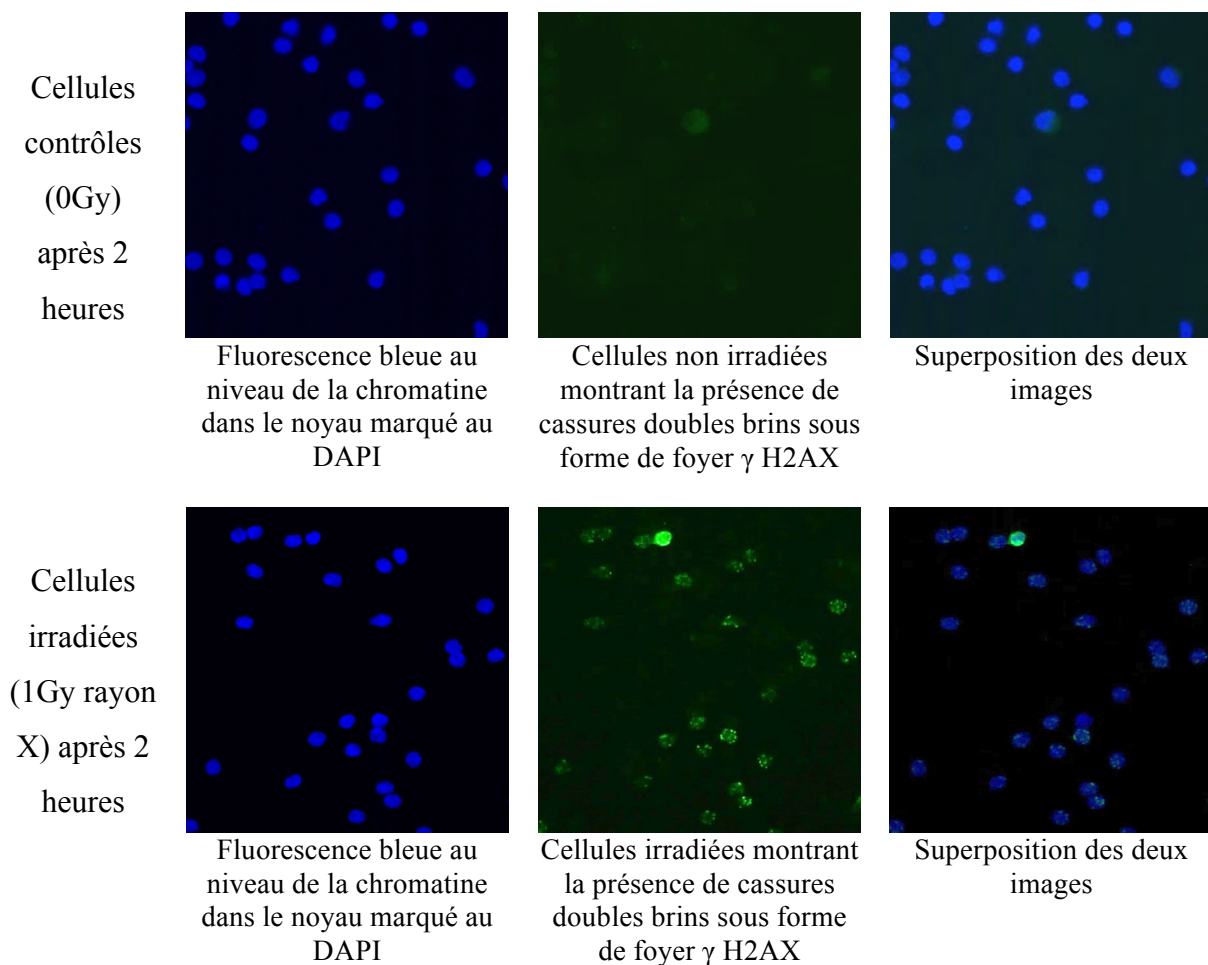


Figure 15: Immunofluorescence des  $\gamma$  H2AX de cellules mononuclées du sang périphérique

La présence de spot lumineux verts montre la présence de foyers de  $\gamma$ H2AX dans les cellules irradiées et non irradiées (Figure 15). Concernant les cellules non irradiées, la présence d'un unique spot montre la phosphorylation d'histones dans une seule cellule. La phosphorylation des histones est un phénomène apparaissant également lorsqu'une cellule rentre en apoptose. Dans des conditions physiologiques, il est tout à fait normal, d'observer quelques cellules en apoptose et donc d'observer la phosphorylation de ses histones. À l'inverse, pour les cellules irradiées nous pouvons observer de nombreux foyers de  $\gamma$ H2AX dans l'ensemble des cellules. Suites à l'irradiation, on observe que de nombreux histones se trouvent phosphorylés suites aux cassures double brin de l'ADN.

Les résultats obtenus confirment donc que les rayonnements ionisants provoquent des cassures double brin de l'ADN ainsi que l'activation de la réparation de l'ADN, entre autre, par la phosphorylation des histones  $\gamma$ H2AX.

### **3.2 Comparaison de deux kits d'extraction de l'ARN**

Deux différents kits d'extraction de l'ARN ont été utilisés : le « QIAmp RNA Blood mini » et le « PAXgene Blood RNA » tous deux fournis par la firme Qiagen<sup>®</sup>. Afin de déterminer quel kit correspond le mieux à nos attentes et à nos critères, dans le cadre de l'étude de l'expression de gènes. Pour ce faire, diverses comparaisons ont été réalisées d'un point de vue qualitatif et quantitatif de l'ARN obtenu. En plus de la comparaison de ces deux kits, la séparation des leucocytes avant extraction a été effectuée afin d'observer si cette étape est nécessaire avant nos différentes manipulations. Différentes modifications ont également été apportées aux protocoles initiaux afin de déterminer l'impact que celles-ci ont sur la qualité de l'ARN ainsi que sur sa quantité. La Figure 16 regroupe l'ensemble des différents protocoles suivis dans le but de l'extraction de l'ARN.

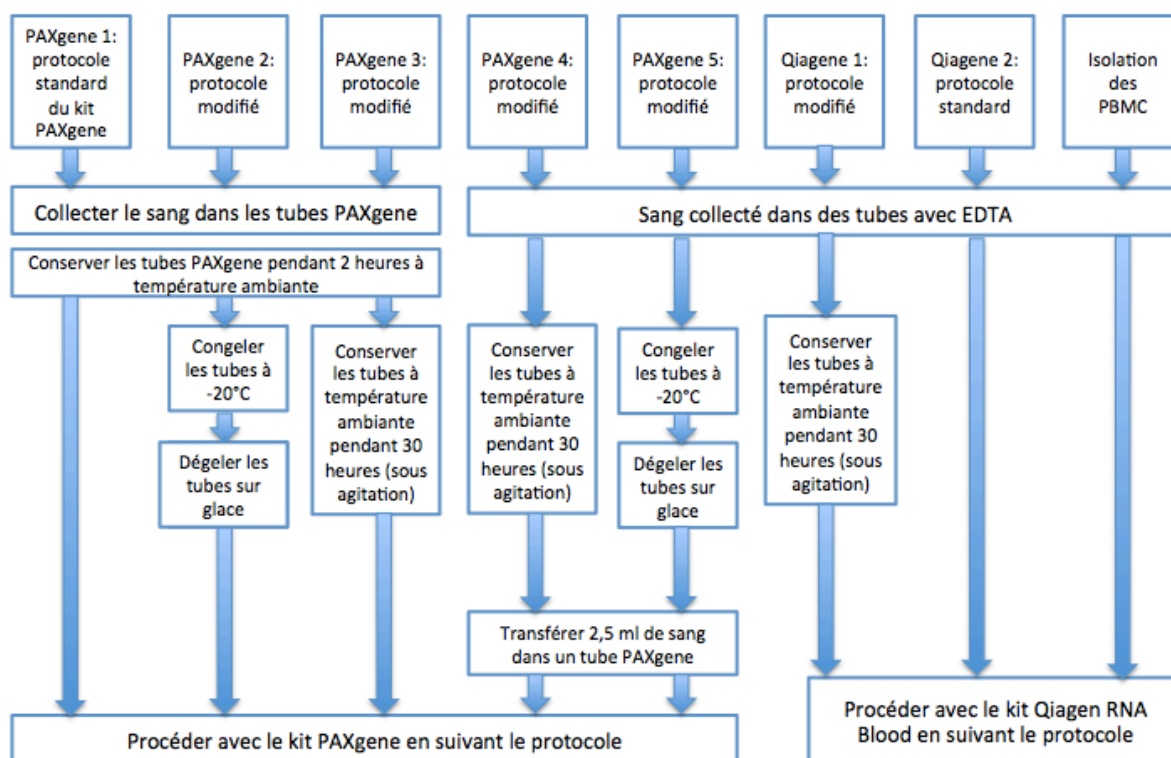


Figure 16 : Schéma des différents protocoles suivis dans le but de l'extraction d'ARN au départ de sang total.

### 3.2.1.1 Comparaison de la qualité et quantité de l'ARN extrait

La qualité de l'ARN a été déterminée à l'aide du Bioanalyseur Agilent 2100. Le tableau comparatif ci-dessous reprenant ; la quantité d'ARN obtenu par ml de sang, le RIN, le ratio A260/A280 ainsi que le ratio A260/A230.

Donneur		1	2	3	4	5	Moyenne
PAXgene 1 (Protocole standard)	ARN ng/ ml de sang	3296,0	3772,8	2854,4	1595,0	4019,2	<b>3107,5</b>
	RIN	9	8,8	9,2	8,6	8,6	<b>8,8</b>
	A260/A280	2,16	2,14	2,17	2,36	2,16	<b>2,20</b>
	A260/A230	0,66	0,75	0,61	0,30	0,81	<b>0,63</b>
PAXgene 2 (Tubes PAXgene conservés à -20°C)	ARN ng/ ml de sang	3446,4	3952,0	3257,6	2451,2	4390,4	<b>3775,3</b>
	RIN	9,5	9,4	9,3	9,1	8,8	<b>9,2</b>
	A260/A280	2,17	2,16	2,18	2,2	2,14	<b>2,17</b>
	A260/A230	0,54	0,81	0,74	0,45	0,64	<b>0,64</b>

PAXgene 3 (Tubes PAXgene garder pendant 30h à TA)	ARN ng/ ml de sang	4073,6	4931,2	3267,2	2960,0	3548,8	<b>3756,2</b>
	RIN	8,2	8,4	8,2	8,5	8,8	<b>8,4</b>
	A260/A280	2,14	2,14	2,19	2,25	2,18	<b>2,18</b>
	A260/A230	0,82	0,90	0,68	0,46	0,69	<b>0,71</b>
PAXgene 4 (EDTA garder pendant 30h à TA)	ARN ng/ ml de sang	2579,2	3312,0	1977,6	1284,0	3206,4	<b>2471,8</b>
	RIN	10	8,9	9,4	9,4	8,3	<b>9,2</b>
	A260/A280	2,22	2,16	2,22	2,35	2,14	<b>2,22</b>
	A260/A230	0,56	0,68	0,47	0,30	0,68	<b>0,54</b>
PAXgene 5 (EDTA conservé à – 20°C)	ARN ng/ ml de sang	1385,6	1724,8	1088,0	564,0	1065,6	<b>1165,6</b>
	RIN	6	7,7	7,7	5,2	7,6	<b>6,8</b>
	A260/A280	2,31	2,26	2,34	2,84	2,32	<b>2,41</b>
	A260/A230	0,36	0,44	0,30	0,16	0,29	<b>0,31</b>
Qiagen 1 (EDTA gardés pendant 30h à TA)	ARN ng/ ml de sang	3872,0	4480,0	2906,7	2394,7	2794,7	<b>3289,6</b>
	[RIN]	9,6	9,9	10	10	10	<b>9,9</b>
	A260/A280	2,01	2,03	2,00	2,00	1,98	<b>2,00</b>
	A260/A230	1,05	1,92	1,39	1,37	2,07	<b>1,56</b>
Qiagen 2 (Protocole Standard)	ARN ng/ml de sang	3840,0	3429,3	4373,3	3248,0	3045,3	<b>3587,2</b>
	RIN	9,6	9,7	9,6	9,8	9,8	<b>9,7</b>
	A260/A280	2,10	2,01	2,06	2,03	2,01	<b>2,04</b>
	A260/A230	1,64	1,70	0,27	1,75	1,82	<b>1,44</b>
PBMC	ARN ng/ml de sang	1973,3	3032,0	3618,7	3149,3	-	<b>2943,3</b>
	RIN	-	-	-	-	-	<b>-</b>
	A260/A280	2,05	2,05	2,07	2,04	-	<b>2,05</b>
	A260/A230	2,18	2,27	2,28	2,20	-	<b>2,23</b>

Tableau 4: Tableau comparatif des différents méthodes d'extraction d'ARN

Les concentrations en ARN obtenues à l'aide de PAXgene 2 et 3 sont supérieures à celles obtenues pour PAXgene 1 mais également supérieures à l'ensemble des autres résultats obtenus. L'extraction de l'ARN n'a pas été réalisée directement après le prélèvement mais après un certain temps d'incubation (Figure 16). L'augmentation du temps d'incubation des cellules dans le tampon de lyse, contenu dans les tubes PAXgene, va ainsi améliorer la lyse de cellules. Toutes les cellules seront donc lysées expliquant la raison pour laquelle les concentrations d'ARN sont plus élevées. Les RIN obtenus pour ces deux protocoles sont plutôt bons (9,2 et 8,4), montrant que malgré des temps d'incubation important avant extraction, la qualité de l'ARN reste bonne.

La concentration moyenne obtenue pour le PAXgene 1 est légèrement inférieure à celle obtenue par Qiagen mais reste tout à fait acceptable. Le RIN obtenu est bon (8,8) mais est également inférieur à celui obtenu par Qiagen.

Concernant les résultats suivant le protocole PAXgene 4 ayant été prélevés à partir de tubes EDTA, on remarque que la quantité en ARN est fortement diminuée par rapport aux autres protocoles. Une des explications possibles serait le fait que les cellules étant conservées dans des conditions non physiologique pendant une longue durée commencent à mourir. Au moment de l'extraction de l'ARN, il y a donc moins de cellules vivantes et par conséquent la quantité d'ARN est moins élevée. La valeur des RIN reste bonne (8,8).

Les résultats obtenus pour le protocole PAXgene 5 (prélevés à partir de tubes EDTA et congelés) montrent une très faible quantité d'ARN. La congélation des tubes EDTA, en l'absence d'un agent protecteur de l'ARN, détruit les cellules et provoque le relargage de l'ARN en présence des RNases causant sa dégradation. Ce phénomène de dégradation de l'ARN se reflète également dans la valeur moyenne du RIN de 7, qui est la valeur minimale pour exploiter l'ARN.

Les ratios A260/A280 obtenus pour l'ensemble des protocoles PAXgene sont bons (>2). La proportion en protéines dans les échantillons est donc faible. Néanmoins, les ratios A260/A230 obtenus sont tous inférieurs à 1, indiquant la présence d'un contaminant organique. La méthode PAXgene posséderait donc un composant qui interfère avec la méthode de mesure de l'ARN.

Les protocoles Qiagen 1 et 2 ont permis d'obtenir de très bons RIN (9,7 et 9,9) montrant que l'intégrité de l'ARN extrait est excellente. Les valeurs des ratio A260/A280

obtenues sont également très correctes, ( $> 2$ ). La contamination en protéines étant donc tout à fait acceptable. Les valeurs pour les ratio A260/A230 sont également élevées ( $>1,5$ ) montrant la faible présence de contaminants. La concentration en ARN obtenue pour le Qiagen 1 est supérieure au Qiagen 2.

Cependant, il faut noter la présence d'une forte variation dans les résultats obtenus pour chacun des donneurs allant d'une concentration en ARN du simple au double. Il est dès lors difficile de pouvoir établir une moyenne fiable des concentrations en ARN. Ces fortes variations de quantités d'ARN pouvant s'expliquer par diverses erreurs de manipulation provoquant la perte d'acides nucléiques.

L'isolation des PBMC avant extraction de l'ARN a permis d'obtenir une qualité d'ARN nécessaire pour la réalisation de PCR quantitative. Le ratio A260/A280 obtenu étant supérieur à 2, montre une faible contamination par les protéines. Le ratio A260/A230 est également très élevé (2,23), indiquant un faible présence de contaminants. La concentration en ARN par ml de sang est relativement élevée. La perte inéluctable de PBMC au cours des diverses manipulations que cette méthode nécessite pourrait expliquer que cette quantité d'ARN soit inférieure à celle obtenue à l'aide du kit Qiagen. De plus, cette méthode, nécessitant une étape préalable d'isolation des PBMC, possède donc le désavantage d'être plus longue à réaliser que les méthodes utilisant le sang total.

### 3.2.1.2 Comparaison de la contamination par l'ARN de la globine

Un autre aspect de la qualité de la purification de l'ARN, est la contamination de l'échantillon par l'ARNm de la globine. Pour mettre en évidence cette contamination, une qPCR en temps réel a été réalisée. L'hémoglobine étant une protéine uniquement retrouvée dans les cellules érythrocytaires, sa présence montre une contamination par les érythrocytes. Jusqu'à 70% de la biomasse de l'ARNm dans le sang total est composé des transcrits de l'ARN de la globine. Ces transcrits de la globine «indésirables» diluent fortement la population de l'ARNm et diminuent dès lors la sensibilité de la détection des ARNm d'intérêt. De plus, l'hémoglobine étant un puissant inhibiteur de la Taq polymérase, le rendement de la qPCR en serait réduit.



Afin de vérifier que les kits utilisés ne présentent pas ce problème de contamination, deux couples d'amorces spécifiques aux séquences codantes pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la globine ont été sélectionnés pour la réalisation de la qPCR.

Cette qPCR a été réalisée à partir des échantillons issus du kit de Qiagen (protocole initial), du kit PAXgene (protocole initial) ainsi que sur les échantillons PBMC, servant d'échantillons de référence (ceux-ci n'étant pas contaminés par l'ARNm de la globine). Les deux gènes de référence utilisés étaient le *HPRT1* et *PGK1*.

Le sang total, à partir duquel a été réalisé l'extraction de l'ARN à l'aide des kits PAXgene et Qiagen, contient donc l'ensemble des éléments figurés du sang. Parmi ces éléments, il y a les réticulocytes représentant 1 à 4% des érythrocytes. Ces réticulocytes possédant un noyau contiennent dès lors de l'ARN. Une mauvaise purification de l'ARN, conservant des traces de l'ARNm de la globine dans ces échantillons pourrait provoquer des erreurs dans l'analyse des qPCR. Le graphique ci-dessous représente le taux d'expression des gènes codant pour les chaînes de l' $\alpha$ -globine et  $\beta$ -globine pour les différents échantillons (Figure 17).

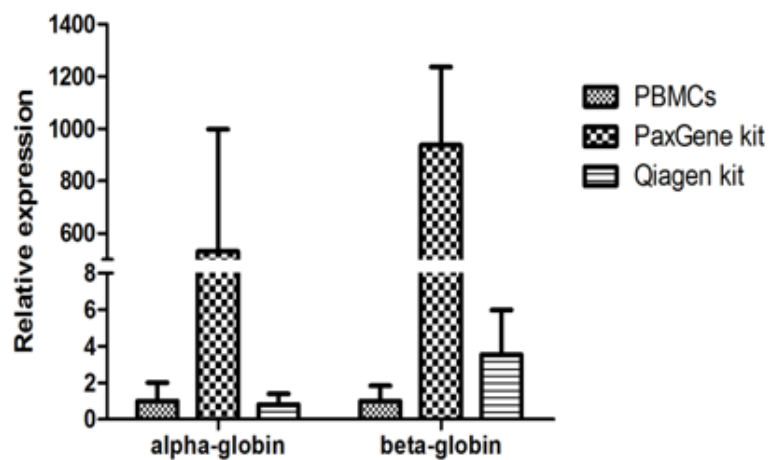


Figure 17: Graphique de l'expression des  $\alpha$ -globine et  $\beta$ -globine sur les échantillons issus du kit Qiagen et du kit PAXgene ainsi que des PBMC.

On observe qu'avec le kit PAXgene, l'expression des gènes  $\alpha$ -globine et  $\beta$ -globine est fortement exprimée par rapport au kit Qiagen et aux PBMCs. Si l'expression génique de la globine est si importante cela montre qu'il y a contamination de cette globine. Le kit Qiagen n'a que très peu de contamination par la globine contrairement à PAXgene. De plus la

présence d'érythrocytes et donc de réticulocytes, possédant également de l'ARN, pourrait provoquer une erreur par excès de la quantité réelle d'ARN issus des leucocytes.

### 3.2.1.3 Conclusion

D'un point de vue conservation des échantillons, le kit PAXgene est plus adéquat étant donné qu'il permet la congélation des tubes à -20°C ce dont le kit Qiagen n'est pas prévu. La méthode PAXgene permet donc de « fixer » les cellules et de conserver le taux d'expression génique la plus représentative de celle au moment du prélèvement et non pas celle au moment de l'extraction d'ARN. Par exemple, après un accident nucléaire, cette méthode se verrait être intéressante car elle permettrait le prélèvement d'échantillon sanguin de victimes sur place ainsi que l'analyse des échantillons après un certain laps de temps. De plus, comme vu précédemment, la méthode PAXgene, pour laquelle il est possible de congeler les échantillons, permet l'obtention de résultats exploitables pour des analyses tels que la qPCR à condition d'utiliser les tubes spécifiques « PAXgene tubes ».

Cependant, pour une utilisation en laboratoire, les résultats obtenus pour le kit Qiagen sont en de nombreux points supérieurs à ceux obtenus par le kit PAXgene. C'est pourquoi, dans la suite de ces expériences, les diverses extractions d'ARN ont été réalisées à partir du kit Qiagen, en suivant le protocole initial.

## 3.3 Effets de la température de conservation des tubes sanguins dans l'expression des gènes

Pour cette expérience, le sang de cinq donneurs sains a été prélevé dans des tubes EDTA et irradié *in vitro* (voir point 2.2). L'extraction de l'ARN s'est réalisée après différents temps après irradiations soit après 8 et 24 heures à l'aide du kit Qiagen « QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood kit ». Pour la conservation des échantillons sanguins, les tubes de trois donneurs (en bleu sur les graphiques Figure 18) ont été placés à l'étuve à 37°C sous agitation alors que d'autres échantillons (en rouge sur les graphiques Figure 18)) ont été conservés sous agitation mais à température ambiante.

Afin d'illustrer les résultats obtenus, l'expression du gène *DDB2* en fonction des doses de radiations a été sélectionné comme exemple.

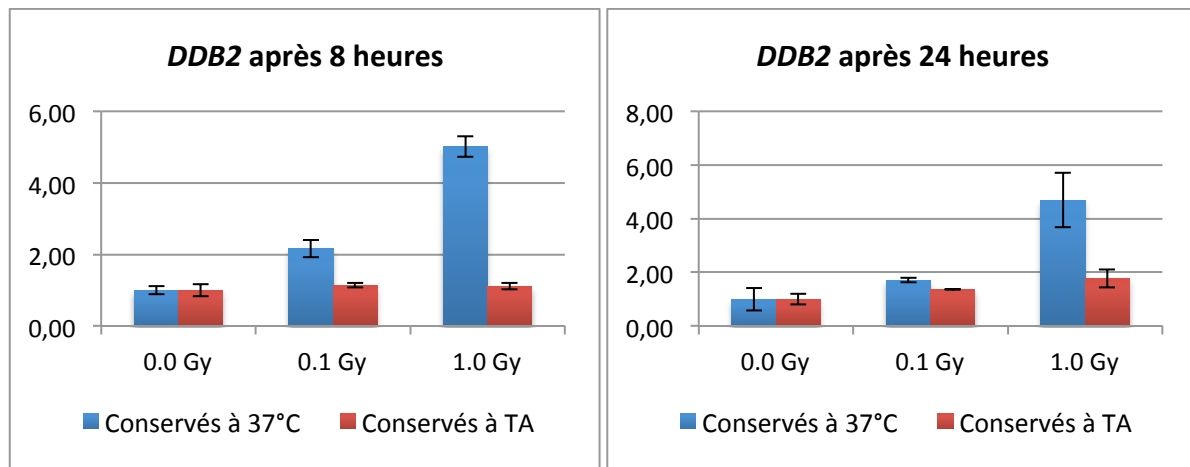


Figure 18: Graphique de l'expression du gène *DDB2* en fonction de la dose d'irradiation et de la température de conservation des échantillons sanguins.

Les graphiques ci dessous montrent clairement que les échantillons sanguins ayant été conservés à température ambiante, ne donnent pas les mêmes résultats que ceux obtenus pour les échantillons ayant été conservés à 37°C.

Pour les échantillons ayant été conservés à 37°C sous agitation, on observe une corrélation entre l'expression du gène et la dose d'irradiation reçue. Plus la dose d'irradiation est importante, plus l'expression des gènes étudiés est importante.

Concernant les échantillons ayant été conservés à TA sous agitation, l'expression du gène s'est faiblement exprimée. Cela montrant que les cellules n'ont pas réagi suite à l'irradiation.

Les résultats obtenus montrant que la conservation des tubes EDTA à TA ne permet donc pas la réalisation de l'étude de l'expression des gènes. Cependant, l'analyse qualitative de l'ARN dans ces conditions (conservation des tubes EDTA à TA sous agitation) avait été réalisée préalablement. Les résultats obtenus avaient montrés que la qualité de l'ARN était suffisante pour l'analyse moléculaire. Les cellules ayant conservé l'intégrité de leur ARN, ne semblent donc pas pouvoir réguler l'expression de ses gènes à TA. La régulation de l'expression des gènes faisant intervenir de nombreux mécanisme complexes, elle nécessiterait dès lors que les cellules se trouvent à leur température normale soit à 37°C.

### 3.4 Corrélation entre l'expression des gènes et l'exposition aux rayons X

Cette expérience a pour but de mettre en évidence l'expression de 6 différents gènes suite à une large gamme de dose d'irradiation. Ces échantillons de sang provenant de deux donneurs ont été soumis à une gamme de doses d'irradiations allant de 0 Gy (servant de contrôle) à 4,00 Gy (Tableau 2).

- Le gène *PCNA*

Un des gènes cibles de p53 étudié est le gène *PCNA* codant pour la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Cette protéine eucaryote appartenant à la famille des sliding clamp possède trois sous unités formant un anneau protéique. Le rôle de cette protéine est d'augmenter la processivité des ADN polymérases. Cet anneau protéique permettant d'encercler le brin d'ADN tout en se liant à l'ADN polymérase coulisse le long de brin d'ADN. En plus d'avoir un rôle important dans la réplication des génomes, il est impliqué dans des processus de réplication et de recombinaison de l'ADN ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN.

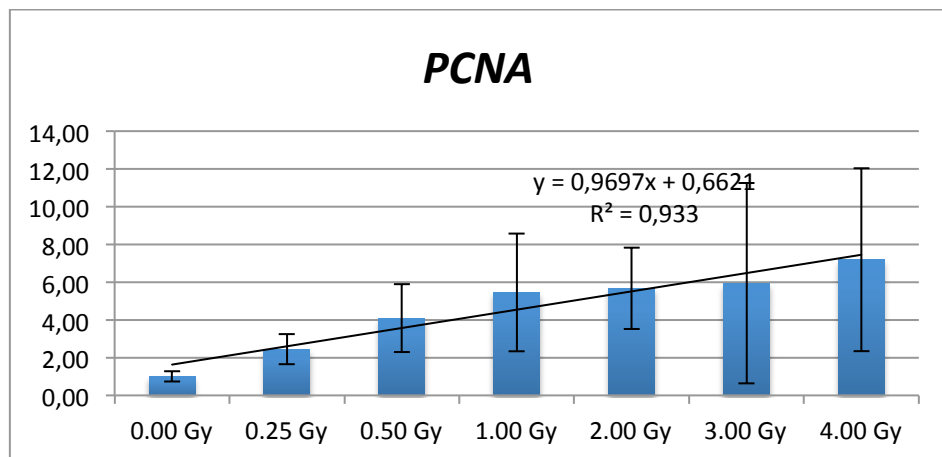


Figure 19: Graphique de l'expression normalisée du gène *PCNA* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculés par la déviation standard normalisée.

Comme la Figure 19 le montre, il existe une corrélation entre la dose reçue par les cellules sanguines et l'expression du gène *PCNA*. Le rôle de la protéine codée par ce gène jouant un rôle dans la réparation cellulaire, on voit donc que plus la dose augmente, plus les dégâts cellulaires sont importants, et plus l'expression de ce gène augmente.

- Le gène *FDXR*

Le gène *FDXR* également p53 dépendant, est activé lors de dommages de l'ADN, comme par exemple, suite à une irradiation des cellules. Suite à différents stress cellulaires, l'activation de la p53 va induire l'expression du gène *FDXR*. Le produit de ce gène ; la ferrédoxine réductase, va sensibiliser les cellules à l'apoptose (Gang, 2002).

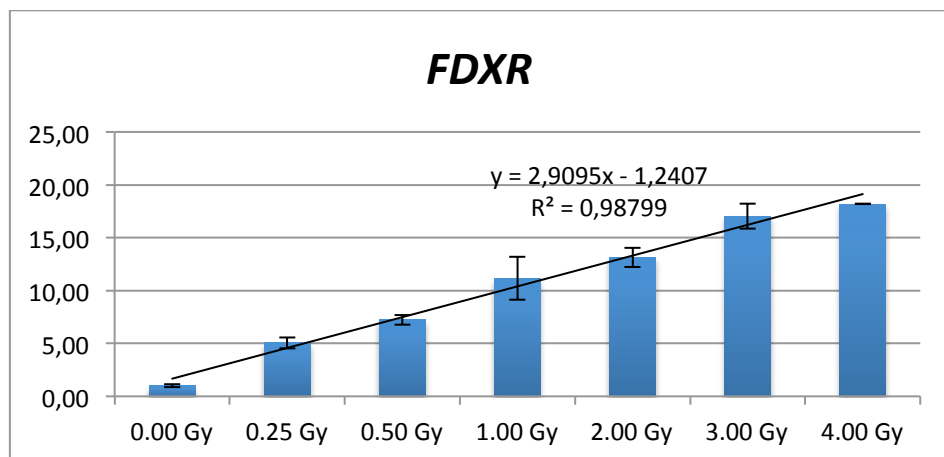


Figure 20: Graphique de l'expression normalisée du gène *FDXR* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculées par la déviation standard normalisée.

La graphique de l'expression du gène *FDXR* en fonction de la dose d'irradiation montre une corrélation entre ces deux paramètres. On observe qu'avec l'augmentation de la dose d'irradiation, l'expression du gène *FDXR* est également augmentée.

- Le gène *DDB2*

Le gène *DDB2* codant pour la protéine du même nom DDB2 (Damage DNA Binding 2) jouant un rôle dans la réparation de l'ADN. Cette protéine faisant partie d'un complexe protéique participant à la réparation des dommages principalement par la réparation par excision des nucléotides. Ce complexe participe aussi à l'ubiquitination des histones H3 et H4 facilitant la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN.

L'expression du gène est également induite par la p53 suite à l'exposition aux RI ou aux UV.

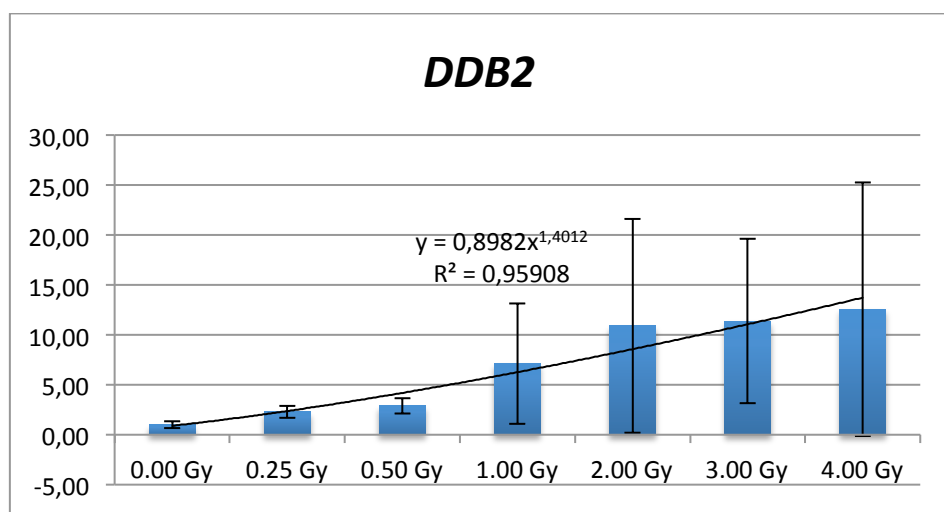


Figure 21: Graphique de l'expression normalisée du gène *DDB2* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculées par la déviation standard normalisée.

On observe également pour ce gène, une augmentation significative de l'expression du gène en fonction des différentes doses.

- Le gène *TNFRSF10B*

Le gène *TNFRSF10B* (Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily member 10B) code pour une protéine appartenant à la super famille des récepteurs TNF (facteur de nécrose tumoral). Cette protéine réceptrice pouvant être liée à un facteur de nécrose tumorale va induire l'apoptose de la cellule.

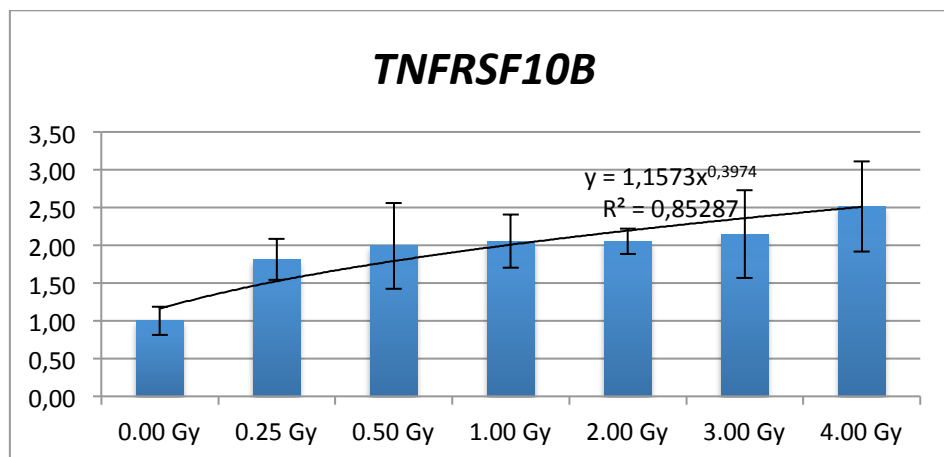


Figure 22: Graphique de l'expression normalisé du gène *TNFRSF10B* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculées par la déviation standard normalisée.

Concernant le gène *TNFRSF10B*, le graphique de l'expression du gène en fonction de la dose montre une légère augmentation (Figure 22). Ce gène jouant un rôle dans l'induction de l'apoptose de la cellule on observe que plus la dose d'irradiation est importante, plus l'expression du gène augmente. Par exemple, pour une dose de 4,00 Gy de rayons X, on observe que l'expression du gène est 2,5 fois plus exprimée. Les dommages de l'ADN augmentant avec la dose, on voit donc que la p53 induit le gène *TNFRSF10B* participant à l'apoptose de la cellule.

- Le gène *VWCE* et *NDUFAF6*

Le rôle exact de ces gènes reste encore inconnu mais il pourrait s'agir de gènes cibles de la p53.

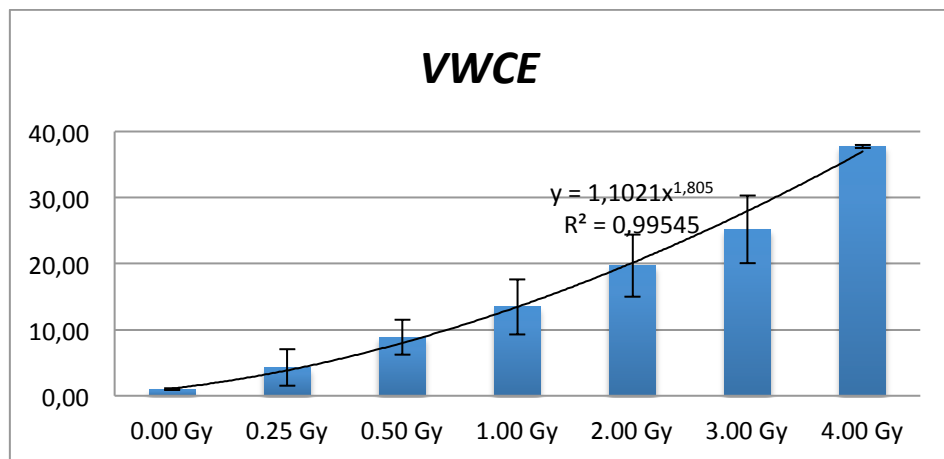


Figure 23: Graphique de l'expression normalisé du gène *VWCE* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculées par la déviation standard normalisée.

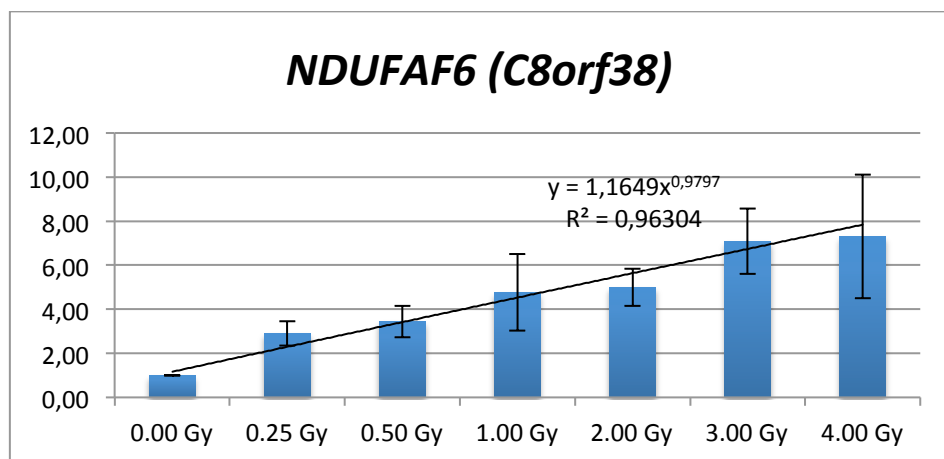


Figure 24: Graphique de l'expression normalisé du gène *NDUFAF6 (C8orf38)* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) Les résultats obtenus correspondent à la moyenne pour deux donneurs avec les barres d'erreurs calculées par la déviation standard normalisée.

Les résultats ci-dessus (Figure 23, Figure 24) indiquent que l'expression de ces gènes est en corrélation avec la dose d'irradiation. Ces gènes permettent, de plus, d'obtenir la meilleure corrélation de leur expression avec la dose d'irradiation parmi tous les gènes testés. Ces deux gènes semblent donc être les plus appropriés pour la prédiction de la dose et pour la dosimétrie biologique.



### 3.5 Radiosensibilité individuelle

Suite aux résultats obtenus pour ces diverses expériences sur l'expression des gènes en fonction des doses d'irradiation, le phénomène de radiosensibilité individuelle a pu être mis en évidence.

Lors de la réalisation de l'étude de l'expression de gènes sur une large gamme d'étalonnage, cette étude a été réalisée à partir d'échantillons sanguins provenant de deux donneurs différents. L'irradiation *in vitro* du sang par une large gamme de dose a montré que la réponse de l'expression des gènes augmentait avec la dose mais, cependant, cette augmentation n'était pas identique pour tous les donneurs.

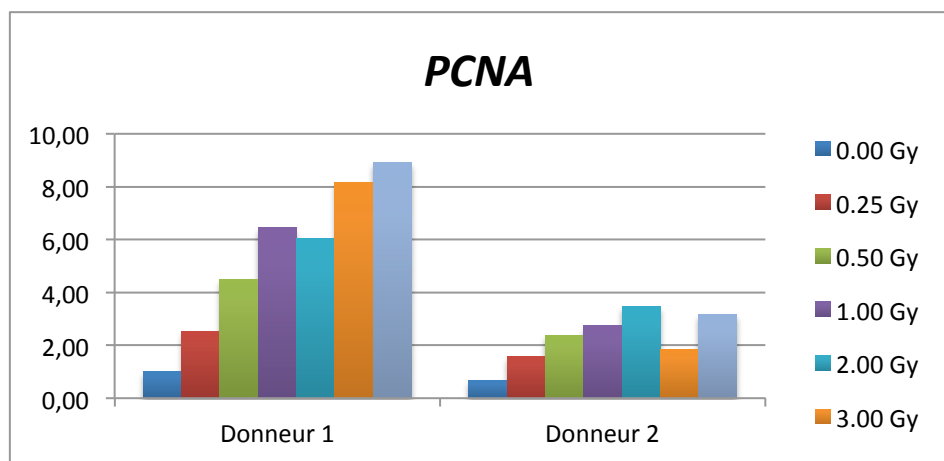


Figure 25: Graphique de l'expression du gène *PCNA* suite à une large gamme de dose d'irradiation. Les résultats montrant l'expression du gène pour chacun des deux donneurs

A titre d'exemple, l'expression du gène *PCNA* (Figure 25), montre que la surexpression du gène n'est pas la même pour les deux donneurs. Pour le donneur 1, la surexpression du gène est plus importante que celle pour le donneur 2.

Pour certains gènes, on a pu observer que la surexpression des gènes ne se faisait pas de la même manière pour tous les individus. Pour certains donneurs, on observait une forte augmentation de l'expression du gène en fonction de la dose reçue, alors que pour d'autres donneurs l'augmentation de l'expression des gènes avait également lieu mais était moins importante.

### 3.6 Western blot de la protéine p53

Dans le but de confirmer la présence de la protéine p53 dans les cellules issues de la lignée cellulaire TK6 et de confirmer l'absence de celle-ci dans les cellules NH32 (p53 knock out), un Western blot a été effectué. Le Western blot va permettre la comparaison de la synthèse de cette protéine entre ces deux lignées cellulaires à l'aide d'anticorps primaire et secondaire. Ce western blot a également permis la comparaison des différentes méthodes d'extraction protéiques utilisées ; par la méthode RIPA et celle utilisée par Qiagen. Tous les échantillons ayant été réalisés en duplicats.

Afin de pouvoir au mieux comparer l'expression protéique entre ces divers paramètres, une même quantité de protéine a été déposée dans chacun des puits (4µg). Le tableau ci-dessous reprenant les échantillons protéique dans l'ordre de dépôts (Tableau 5).

Puits n°	
1	
2	Ladder
3	
4	TK6 RIPA 1
5	TK6 RIPA 2
6	NH32 RIPA 1
7	NH32 RIPA 2
8	TK6 QIAGEN 1
9	TK6 QIAGEN 2
10	NH32 QIAGEN 1
11	NH32 QIAGEN 2
12	

Tableau 5: Echantillon protéique pour le Western blot (dans l'ordre de dépôt)

- Western blot de la protéine p53

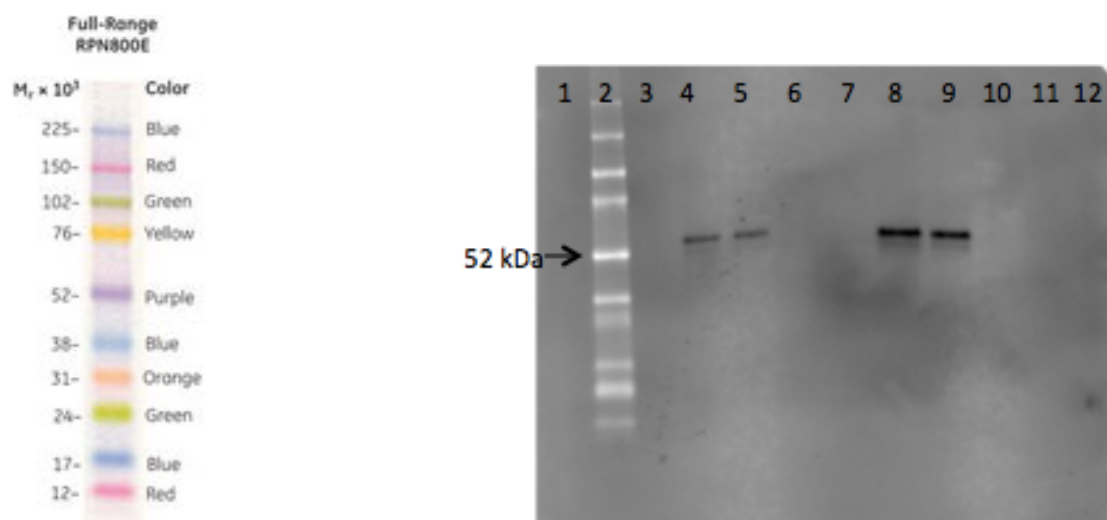


Figure 26 : Western blot de la protéine p53

Figure 27 marqueur de poids moléculaire  
« Full range Amersham Rainbow Marker »

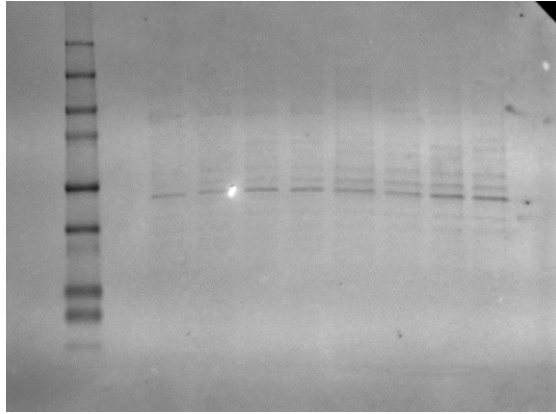
Sur la Figure 26, on observe, pour les échantillons issus des cellules TK6 extraites par la méthode RIPA ainsi que pour les cellules TK6 extraites par le kit Qiagen (puits n°4, 5 et 8, 9), une bande se situant au niveau de la bande purple correspondant à 52kDa. Cette bande protéique attestant la présence de la protéine p53 dans cette lignée cellulaire.

De plus, les bandes obtenues par la méthode Qiagen semblent être plus épaisses que les bandes obtenues à l'aide de la méthode RIPA. Il semblerait que la quantité de protéine p53 extraite soit plus importante pour les cellules TK6 extraite à l'aide du kit Qiagen.

L'absence de bande au niveau de 53 kDa pour les lignées cellulaires NH32 aussi bien pour la méthode RIPA que pour celle de Qiagen confirme l'absence de la protéine p53 dans cette lignée cellulaire.

- Coloration des protéines totales

La coloration des protéines totales a permis de mieux comparer l'extraction protéique réalisée par ces deux différentes méthodes. La quantité protéique étant faible (4 µg/puits), et ne permettant pas la coloration Stain free, nous avons réalisé la coloration au bleu de Coomassie, plus sensible que cette dernière (Figure 28).



*Figure 28: Coloration des protéines totales par la coloration au bleu de Coomassie*

Les bandes des échantillons extraits à l'aide du kit Qiagen apparaissent plus marquées que celles obtenues pour la méthode RIPA. Il semblerait que la concentration protéique de ces échantillons soit plus importante. Cependant, la quantification des protéines avaient pourtant été effectuées au préalable par la méthode BCA et les échantillons avaient été dilués afin d'obtenir la même quantité protéique dans chacun des puits. On observe cependant, une différence de concentration entre ces deux différentes méthodes. L'hypothèse émise serait que la méthode quantitative des protéines par NanoDrop 2000, surestime la concentration protéique obtenue par la méthode RIPA ou qu'elle sous-estime la concentration protéique par la méthode Qiagen. Il semblerait qu'une substance interférente soit présente dans l'une des deux méthodes d'extraction faussant la concentration réelle protéique.

L'absence de bande au niveau de la protéine p53 sur le western blot, mais la présence de bandes suites à la coloration des protéines totales montrent bien qu'il s'agit d'une absence de cette protéine dans les cellules NH32 et non pas un manque de protéines totales pouvant limiter la fixation des Ac sur la protéine d'intérêt.

Les résultats obtenus de l'expression protéique de la p53 pour ces deux lignées cellulaires correspondent donc bien aux résultats attendus.

### 3.7 Western blot de la p53 phosphorylée

Suite aux radiations ionisantes, la protéine p53, par divers mécanismes, va être activée afin de jouer son rôle dans la réparation des dommages de l'ADN. Pour ce faire, la p53 va subir diverses modifications telles que sa phosphorylation au niveau des Ser15 et Ser20. La phosphorylation altère la capacité de la MDM2 à se lier à p53, favorisant à la fois l'accumulation et l'activation de p53 en réponse à des dommages à l'ADN

Afin de mettre en évidence l'activation de la p53 suite à une exposition aux radiations ionisantes, un western blot a été effectué à partir d'un lysat protéique issus des cellules TK6 (figure 29). Comme il a été démontré dans nos expériences ultérieures, les cellules TK6 possédant la protéine p53 sauvage présentent donc un bon modèle dans l'étude de la phosphorylation de cette protéine en réponse aux radiations ionisantes.

Les cellules TK6 ont subi une irradiation de 3 Gy par rayons X et pour lesquelles l'extraction protéique s'est réalisée après 12 et 24 heures. Un échantillon protéique issu de cellules TK6 non irradiées a également été ajouté afin de servir de contrôle. Pour chacun des échantillons, une quantité de 4 µg par puits a été déposée dans le gel.

La mise en évidence de la p53 phosphorylée s'est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire de lapin (p-p53(Ser15)). La révélation de la p53 s'est quant à elle réalisée comme décrit précédemment.

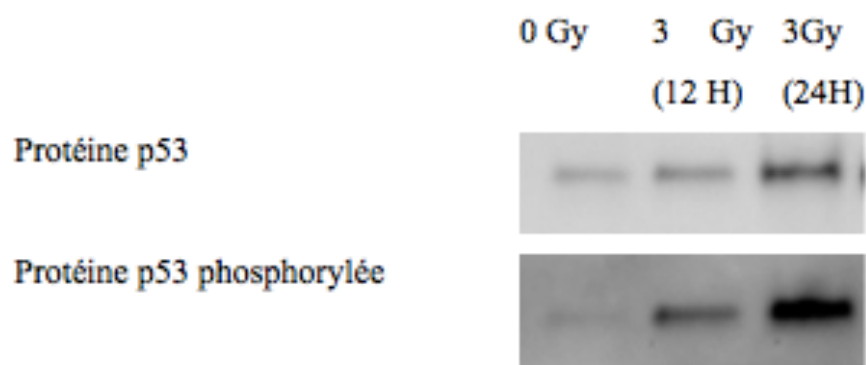


Figure 29: Analyse par Western blot de la phosphorylation de la protéine p53 par irradiation aux rayons X.

Les résultats obtenus montrent que la taille de la bande de la p53 est plus importante pour les échantillons irradiés que non irradiés (Figure 29). Pour l'échantillon contrôle, la présence de cette fine bande signe la présence de la p53 dans les cellules mais en faible quantité. La quantité de la protéine p53 contenue dans cet échantillon contrôle constituera le taux basal de cette protéine. Par ailleurs, pour les échantillons irradiés, la taille des bandes augmente également avec le temps après irradiation. Ces résultats montrant une légère augmentation de la quantité de p53 contenue dans les cellules TK6 après irradiation.

Concernant le western blot de la protéine p53 phosphorylée, une très fine bande qui n'est que très peu perceptible a été obtenue pour l'échantillon contrôle. Ce résultat montrant que les cellules TK6 contrôles possède également la p53 sous sa forme activée mais en très faible quantité. Concernant les échantillons irradiés, une nette augmentation de la taille de la bande par rapport au contrôle est observée.

Afin de confirmer la validité des résultats obtenus par Western blot, il est important de vérifier que la quantité protéique déposée ait été la même dans chacun des puits. Seule une quantité protéique homogène permet de pouvoir comparer les différentes bandes obtenues sur le Western blot de manière fiable.

Pour cela, la coloration des protéines totales a été réalisée. Cette coloration va nous permettre de vérifier la bonne migration des protéines ainsi que de juger de l'uniformité de la quantité protéique déposée dans chacun des puits. Les quantités déposées étant faibles (4 µg/puits), cette coloration a été réalisée à l'aide du bleu de Coomassie.

- Visualisation des protéines totales

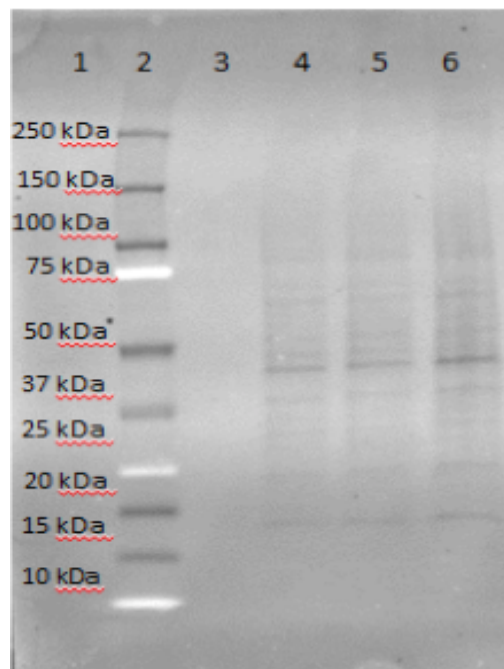
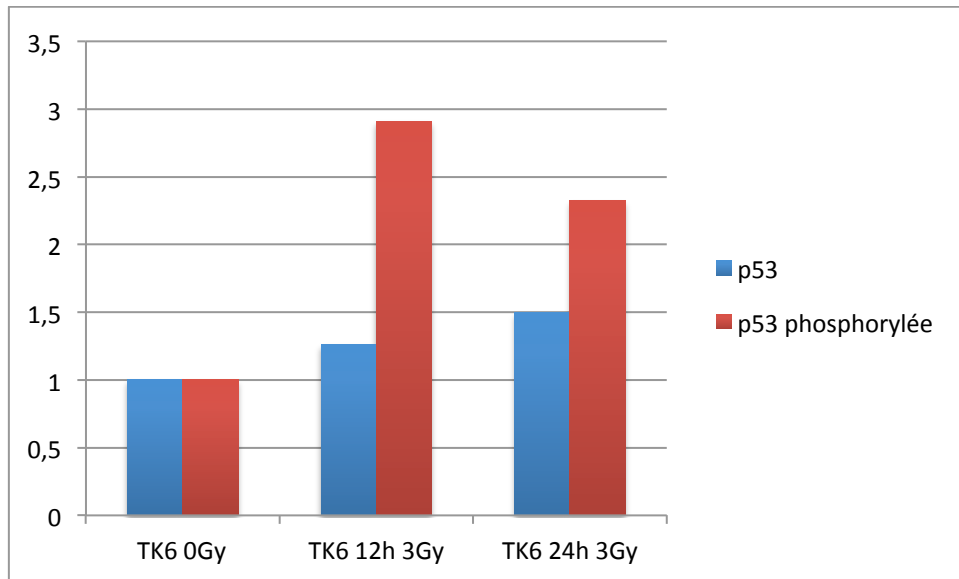


Figure 30: Coloration des protéines totales à l'aide du bleu de Coomassie.

La coloration des protéines totales (Figure 30), indique que la quantité protéique déposée dans chacun des puits n'est pas uniforme. La quantité protéique de l'échantillon TK6 3 Gy après 24 heures, semble plus importante que celle pour les deux autres échantillons.

L'analyse des résultats des Western blot ne peut donc se réaliser sans une normalisation par rapport à la quantité totale déposée dans les puits. L'utilisation d'un programme permettant l'analyse densitométrique des bandes protéique va permettre de normaliser les quantités de protéine p53 et p53 phosphorylée en fonction du taux totales protéiques.

La Figure 31 ci-dessous, représente le taux des protéines p53 et p53 phosphorylée des cellules irradiées par rapport au taux des protéines des cellules non irradiées pour lesquelles la valeur de 1 a été donnée arbitrairement.



*Figure 31: Taux de protéines p53 et p53 phosphorylée. Les résultats ont été obtenus à partir des cellules TK6 ayant été irradiés à 3 Gy et dont l'extraction protéique s'est réalisée après différents temps*

Concernant le taux de p53, une légère augmentation linéaire du taux de la protéine p53 est observable. Cependant cette augmentation reste très légère étant donné que l'activation de la protéine se réalise sous sa forme phosphorylée.

Concernant les résultats obtenus pour la p53 phosphorylée, l'échantillon protéique ayant été extrait 12 heures après l'irradiation aux rayons X (3 Gy) montre une très forte augmentation de taux de p53 phosphorylée comparativement au taux de p53 phosphorylée des cellules contrôles. Suite aux radiations ionisantes, les résultats obtenus permettent dès lors de confirmer l'activation de la p53 par sa phosphorylation. Après un délai de 24 heures après irradiation, nous observons ce taux de p53 phosphorylée a diminué. Cela peut s'expliquer par le fait, qu'après un certain temps, la cellule ayant déjà réparé une partie des dommages de l'ADN, voit son taux de p53 phosphorylée régresser.



### 3.8 Western blot de la protéine VWCE

Le but de ce Western blot a été de mettre en évidence la protéine VWCE dans divers échantillons tels que dans nos deux lignées cellulaires TK6 et NH32. Divers échantillons issus de diverses lignées cellulaires disponibles au laboratoire ont également été testés. Ces échantillons n'étant pas en lien avec notre expérimentation, ont permis de vérifier que l'anticorps anti VWCE fonctionnait correctement.

Puits n°	Echantillon
1	
2	Ladder
3	
4	TICAE
5	HeLa
6	PC3
7	Caco 2
8	TK6
9	NH32
10	
11	Foie de souris
12	

Tableau 6: Echantillon protéique pour le Western blot de la protéine VWCE

Après avoir réalisé l'électrophorèse, la visualisation des différentes bandes obtenues sur le gel a permis de vérifier que l'électrophorèse s'est réalisée correctement. Pour ce faire, le colorant contenu dans le gel, qui a la particularité de se fixer aux résidus tryptophane des protéines, a été employé. Comme le montre la Figure 32, la séparation protéique s'est correctement déroulée. Cependant, les bandes protéiques se trouvant fort proches du bas du gel, peuvent être le signe qu'un temps trop long a été appliqué durant l'électrophorèse provoquant la sortie des bandes hors du gel.

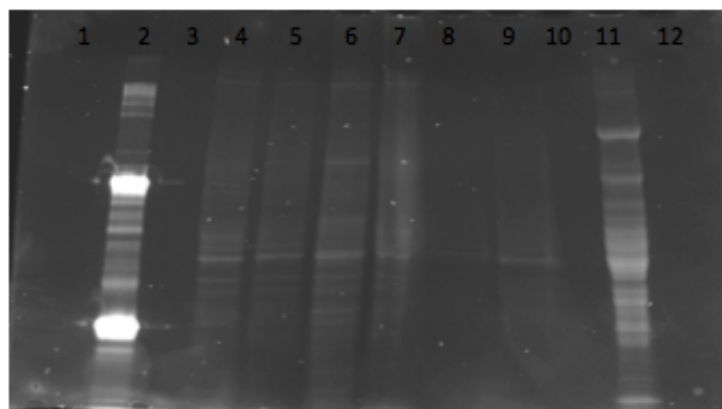


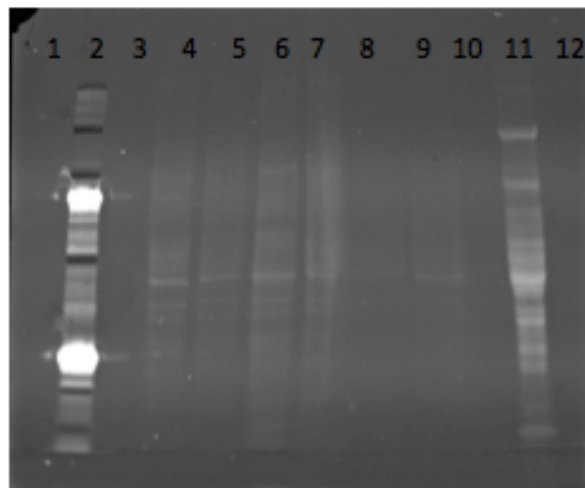
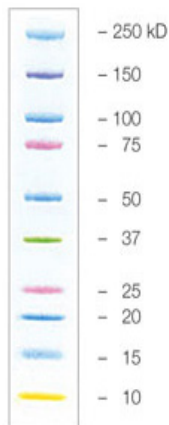
Figure 32 : Coloration des protéines totales à l'aide du colorant « Stain free » (gel)

Concernant l'échantillon NH32 (n°9), les bandes protéiques sont difficilement visibles, celles-ci apparaissant légèrement. Toutes fois, pour l'échantillon TK6 (n°8), une légère bande au niveau de 50 kDa est visible. La quantité protéique déposée pour ces échantillons est trop faible pour permettre une visualisation correcte des bandes protéiques.

Pour l'échantillon issu du foie d'une souris, un grand nombre de bandes épaisses est visible, montrant que la quantité chargée en protéines était très importante.

Concernant les échantillons des puits allant de 4 à 7, les séparations protéiques se sont effectuées correctement.

- Visualisation des protéines totales sur la membrane

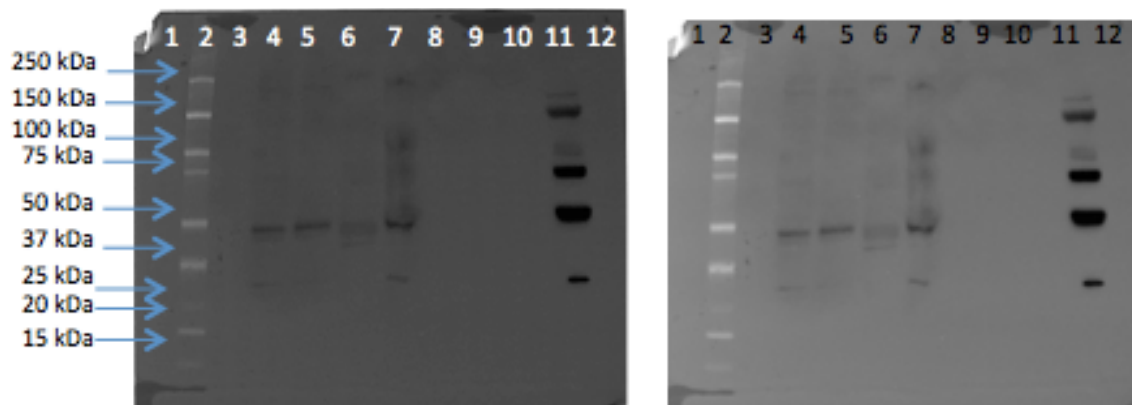


*Figure 33 : Coloration des protéines totales à l'aide du colorant « Stain free » (membrane)*

*Figure 34: Marqueur de poids moléculaire : Kaleidoscope™ Standards #161-0375*

Après la réalisation du transfert sur membrane, la visualisation de la séparation de ces protéines a été effectuée afin de vérifier le bon déroulement du transfert. En comparant les Figure 33 et la Figure 32, les protéines semblent avoir conservé leur position.

- Visualisation du Western blot de la protéine VWCE.



*Figure 35: Western blot de la protéine VCWE*

En observant le marqueur de poids moléculaire, nous pouvons constater que toutes les bandes protéiques n'y apparaissent pas clairement (Figure 35). Comme énoncé précédemment, il semblerait que l'électrophorèse ait été réalisée sur une trop longue durée provoquant la sortie de certaines bandes protéiques de faibles poids moléculaire. La bande protéine de poids moléculaire de 10 kDa n'est d'ailleurs pas visible sur la membrane, celle-ci étant soit sortie du gel, soit l'artéfact se trouvant en bas à gauche pourrait cacher celle-ci.

L'échantillon issu du foie d'une souris (dépôts n°2), de nombreuses bandes. Cet échantillon étant composé d'un lysat tissulaire, il contenait donc énormément des substances complexes qui peuvent provoquer des liaisons aspécifiques.

Pour le dépôt n°7, diverses bandes ont été mises en évidence. Nous pouvons observer qu'il y a une bande aux alentours de 50 kDa ainsi qu'une autre bande entre 25 et 37 kDa. De plus, ces deux bandes sont également visibles sur les échantillons 4 et 5.

L'entreprise n'ayant pas fourni le poids moléculaire de cette protéine, il est difficilement concevable de déterminer avec certitude que les bandes apparaissant sur le western blot correspondent bien à la protéine d'intérêt. La protéine pouvant posséder diverses isoformes ou que celle-ci, au cours du western blot, ait subi plusieurs modifications affectant son poids moléculaire, etc...

Cependant, à la vue des résultats, l'hypothèse émise serait que la protéine possède deux isoformes. Une première isoforme à environ 50 kDa ainsi qu'une seconde aux environs de 35 kDa.

En ce qui concerne les dépôts des échantillons TK6 et NH32, aucune bande n'a été observée sur le Western blot. Cependant, on ne peut conclure que ces deux lignées cellulaires TK6 et NH32 ne possèdent pas cette protéine. Etant donné que lors de la coloration protéique totale, il était difficile de visualiser les bandes, signifiant une quantité protéique trop faible. L'anticorps dirigé contre cette protéine pouvant difficilement se lier à celle-ci, il est donc naturel de ne pas pouvoir mettre en évidence cette protéine.

### **3.9 L'expression des gènes *VWCE* et *NDUFAF6* dans les cellules TK6 et NH32**

Comme les résultats du Western blot de la p53 (point 3.6) l'ont confirmé, les cellules TK6 possèdent bien la p53 contrairement aux cellules NH32.

L'étude suivante s'est réalisée à partir de ces deux lignées cellulaires permettant de faire le lien entre la surexpression de certains gènes et la présence de cette protéine.

La réalisation de PCR quantitative a permis de mettre en évidence l'expression de deux gènes dont on ne connaît ni leur fonction ni leur mécanisme d'activation. Pour ce faire, ces cellules vont être irradiées par différentes doses. L'extraction de l'ARN s'effectuera également à différents moments après l'irradiation permettant ainsi d'observer la réponse cellulaire sur différents laps de temps. Chaque échantillon étant réalisé en 3 exemplaires.

- Le gène *VWCE*

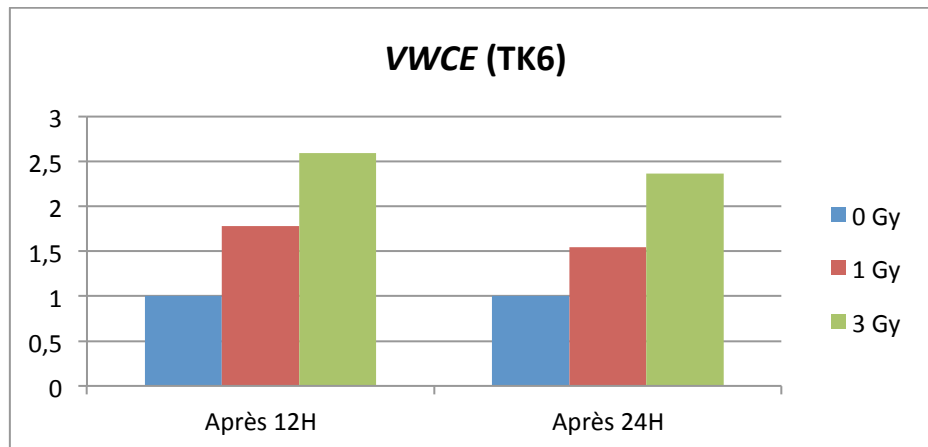


Figure 36: Graphique de l'expression normalisé du gène *VWCE* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.

L'étude de l'expression du gène *VWCE* sur les cellules TK6 montre qu'en fonction de la dose reçue, l'expression du gène augmente significativement. Les résultats obtenus pour les échantillons dont l'extraction a été réalisée après 12 et 24 heures après irradiations, montre des résultats similaires.

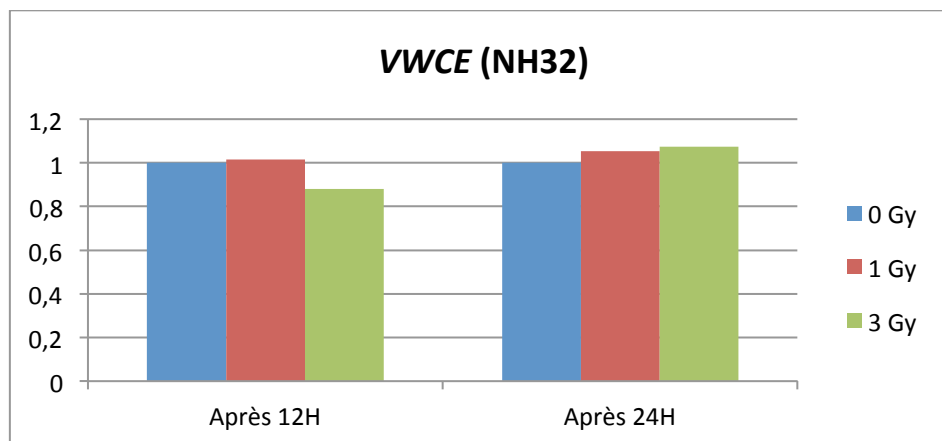


Figure 37: Graphique de l'expression normalisé du gène *VWCE* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules NH32.

Concernant les résultats obtenus pour les cellules NH32, et ceux pour tous les temps suivant l'irradiation, ne permettent pas de montrer une corrélation entre la dose reçue par les cellules

et une réponse dans l'expression du gène *VWCE*. Le gène *VWCE* est donc bien présent dans ces cellules mais ne semble pas être régulé.

La seule différence entre ces deux lignées cellulaires étant la présence de la p53, les résultats différents, entre ces deux lignées cellulaires, permettent de mettre en évidence que le gène *VWCE* est donc activé par cette protéine.

- Le gène *NDUFAF6*

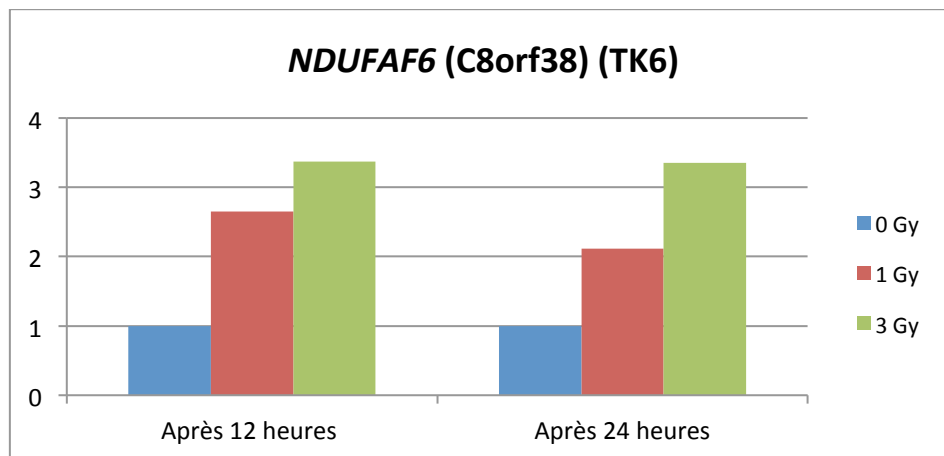
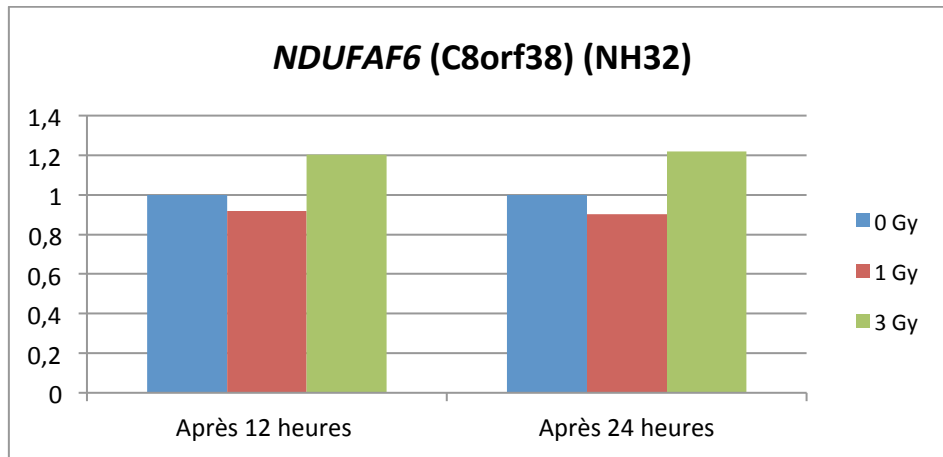


Figure 38: Graphique de l'expression normalisé du gène *NDUFAF6* en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.

Concernant l'expression du gène *NDUFAF6*, on observe une corrélation entre l'expression du gène en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les cellules TK6 (Figure 38). La surexpression de ce gène, en réponse aux rayonnements ionisants, montre bien le rôle joué par la p53.



*Figure 39: Graphique de l'expression normalisé du gène NDUFAF6 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.*

Contrairement aux résultats obtenus pour les cellules TK6 (p53+/+), ceux obtenus par les cellules NH32 (p53-/-) ne montrent pas de corrélation de l'augmentation de l'expression du gène en fonction de la dose (Figure 39).

En conclusion, les résultats obtenus pour cette étude ont démontré le rôle de la protéine p53 dans la régulation des gènes *VWCE* et *NDUFAF6*. On observe dès lors pour les cellules possédant cette protéine une surexpression de ces gènes après irradiation des cellules.

## 4. Conclusion générale et perspectives

### 4.1 Conclusion générale

Suite à cette étude de nombreuses conclusions ont pu être effectuées. Premièrement, d'après la comparaison des deux différents kits d'extraction de l'ARN, il a été démontré que le kit « QIAamp® RNA Blood Mini », permettait d'obtenir la meilleure qualité d'ARN en vue d'analyses moléculaires ultérieures dans les conditions de laboratoire. Cependant, en cas de réelle situation d'accident radiologique, l'utilisation de kit PAXGene se verrait être le plus approprié pour des raisons pratiques. Lors de la réalisation d'expériences *in vitro*, cette étude a également permis de mettre en évidence l'importance de la conservation des tubes sanguins à une température de 37°C.

Deuxièmement, ce travail a également permis d'identifier deux gènes ; *VWCE* et *NDUFAF6* montrant une dose-réponse très claire après une exposition à des doses allant de 0,1 à 4,0 Gy endéans 24 heures après l'irradiation. Ces gènes pouvant être considérés comme des biomarqueurs très prometteurs de l'exposition aux rayonnements ionisants.

Par la connaissance du rôle centrale que joue la protéine p53 dans la réponse cellulaire à des rayonnements ionisants par l'activation de nombreux gènes. Nous avons tenté de déterminer si cette protéine était responsable de l'activation de ces deux gènes. Les résultats de l'étude des lignées cellulaires TK6 (p53+/+) et NH32 (p53-/-) réalisée a permis de montré la dépendance de l'activation des gènes mentionnés ci-dessus d'après le statut de p53 de la cellule.

D'une manière générale, nos résultats permettent d'apporter un nouvel éclairage sur les études de biodosimétrie utilisant l'expression génétique comme biomarqueur de l'exposition aux rayonnements ionisants.

### 4.2 Perspectives

Suite à la mise en évidence de la régulation des gènes *VWCE* et *NDUFAF6* par la protéine p53 après l'exposition aux rayonnements ionisants, il aurait pu être intéressant de déterminer le rôle de ces gènes. Pour ce faire, la réalisation de silencing, soit l'extinction du gène, aurait été nécessaire pour identifier la fonction des gènes.



## 5. Abréviation

Ac : anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

db : double brin

RI : Rayonnement ionisant

CDB : cassure double brin

PBMC : cellules mononuclées isolées à partir du sang humain périphérique

TA : température ambiante

## 6. Lexique

Amplicon : fragment d'ADN amplifié par PCR.

Cellules mononuclées : ensemble de cellules comprenant les lymphocytes (Ly B, Ly T et les cellules NK), les monocytes ainsi que les cellules dendriques.

Epidémiologie : science qui étudie, au sein d'une population, la fréquence et la répartition des problèmes de santé dans le temps et dans l'espace, ainsi que le rôle des facteurs qui le détermine.

Génotoxique : agents d'origine chimique ou physique conduisant à l'altération du génome c.à.d. de l'ADN et pouvant conduire à des mutations.

Ion : atome ayant perdu ou gagné un ou plusieurs électrons

Radio-isotope : atome instable pouvant se transformer en un autre atome, stable ou instable, et émettant de l'énergie sous forme de particules ou de rayonnements. Le terme radio-isotope ne s'applique que pour les éléments d'une même entité chimique (ex. iode 123 et iode 124).

Radionucléides (ou radioélément) : le préfixe « radio » désignant la radioactivité et le suffixe « nucléide » signifiant le noyau, il s'agit d'un élément chimique (atome) possédant une radioactivité qui peut être naturelle ou artificielle.

Rayonnement : émission d'énergie et/ou d'un faisceau de particules.

## 7. Bibliographie

Agilent Technologies (2013), Agilent RNA 6000 Nano Kit, Quick Start Guide, Publication Number G2938-90037.

Agilent Technologies (2003), Agilent 2100 Bioanalyzer 2100, Expert User's Guide, Publication Number G2946-90000.

Agilent Technologies (2004), RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control, Agilent Application note, Publication Number 5989-1165EN

Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., & Fornace, A. J., Jr. (2000). Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, *154*(3), 342-346.

Bregues, M., Paap, B., Bittner, M., Amundson, S., Seligmann, B., Korn, R., . . . Zenhausern, F. (2010). Biodosimetry on small blood volume using gene expression assay. *Health Phys*, *98*(2), 179-185. doi: 10.1097/01.HP.0000346706.44253.5c

Gang, L., & Xinbin C. (2002). The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, *21*(47), 7195-7204. doi:10.1038/sj.onc.1205862

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, *40*(2), 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019

Coy, S. L., Cheema, A. K., Tyburski, J. B., Laiakis, E. C., Collins, S. P., & Fornace, A., Jr. (2011). Radiation metabolomics and its potential in biodosimetry. *Int J Radiat Biol*, *87*(8), 802-823. doi: 10.3109/09553002.2011.556177

Ghardi, M., Moreels, M., Chatelain, B., Chatelain, C., & Baatout, S. (2012). Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human

- peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(5), 769-780. doi: 10.3892/ijmm.2012.907
- Hada, M., & Georgakilas, A. G. (2008). Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res*, 49(3), 203-210.
- Hartlerode, A.; & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochemical Journal*, 423(2): 157–168. doi:10.1042/BJ20090942
- Helton, E. S., & Chen, X. (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem*, 100(4), 883-896. doi: 10.1002/jcb.21091
- IRSN (2012). Les bases de la radioactivité. In *IRSN : Institut de Radioprotection et de sûreté Nucléaire*. [http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Nucleaire\\_et\\_societe/education-radioprotection/bases\\_radioactivite/Pages/sommaire.aspx#.VSKqE7oVyQt](http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Nucleaire_et_societe/education-radioprotection/bases_radioactivite/Pages/sommaire.aspx#.VSKqE7oVyQt) Consulté en ligne le 28 Mars 2015.
- Ivey, R. G., Subramanian, O., Lorentzen, T. D., & Paulovich, A. G. (2009). Antibody-based screen for ionizing radiation-dependent changes in the Mammalian proteome for use in biodosimetry. *Radiat Res*, 171(5), 549-561. doi: 10.1667/RR1638.1
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. doi: 10.1038/nature08467
- Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F.,... Badie, C. (2011). Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int J Radiat Biol*, 87(2), 115-129. doi: 10.3109/09553002.2010.519424
- Kang, C. M., Park, K. P., Song, J. E., Jeung, D. I., Cho, C. K., Kim, T. H.,...Lee, Y. S. (2003). Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat Res*, 159(3), 312-319. doi: Doi 10.1667/0033-7587(2003)159[0312:Pbfire]2.0.Co;2

- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y. W., & Murray, D. (2013). Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci*, *14*(11), 22409-22435. doi: 10.3390/ijms141122409
- Mori, M., Benotmane, M. A., Vanhove, D., van Hummelen, P., Hooghe-Peters, E. L., & Desaintes, C. (2004). Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4+ T lymphocytes and in Jurkat cells: unraveling novel pathways in radiation response. *Cell Mol Life Sci*, *61*(15), 1955-1964.
- Munro, T. R. (1970). The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res*, *42*(3), 451-470.
- Paul, S., & Amundson, S. A. (2008). Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *71*(4), 1236-1244. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.03.043
- Pernot, E., Hall, J., Baatout, S., Benotmane, M. A., Blanchardon, E., Bouffler, S., . . . Cardis, E. (2012). Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res*, *751*(2), 258-286. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.05.003
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45
- Qiagen (2010), QIAamp® RNA Blood Mini Handbook: For total RNA purification from human whole blood, Second Edition.
- Qiagen (2009), PAXgene : Blood RNA Kit Handbook, Version 2, reference 762164, 2009.
- Redon, C. E., Dickey, J. S., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2009). gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res*, *43*(8), 1171-1178. doi: 10.1016/j.asr.2008.10.011
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(5), 402-412. doi: 10.1038/nrm2395

- Romm, H., Ainsbury, E., Barnard, S., Barrios, L., Barquinero, J. F., Beinke, C.,...Wojcik, A. (2013). Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large scale radiation accidents. *Mutat Res*, 756(1-2), 174-183. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.013
- Rothkamm, K., & Horn, S. (2009). gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45(3), 265-271.
- Rothkamm, K., & Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5057-5062. doi: 10.1073/pnas.0830918100
- Steel, G. G. (1996). From targets to genes: a brief history of radiosensitivity. *Phys Med Biol*, 41(2), 205-222.
- Swartz, H. M., Burke, G., Coey, M., Demidenko, E., Dong, R., Grinberg, O., . . . Schauer, D. A. (2007). In vivo EPR for dosimetry. *Radiation Measurements*, 42(6-7), 1075-1084. doi: DOI 10.1016/j.radmeas.2007.05.023
- Swartz, M. D., Thomas, D. C., Daw, E. W., & 11, G. (2007). Model selection and Bayesian methods in statistical genetics: Summary of group 11 contributions to Genetic Analysis Workshop 15. *Genet Epidemiol*, 31, S96-S102. doi: Doi 10.1002/Gepi.20285
- Toussaint, E. (2014). Radioprotection. Syllabus, Haute Ecole Louvain en Hainaut, Fleurus.
- WHO. (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles *ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 155*.
- Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 40, 363-383. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090451
- Zimmermann R., La médecine nucléaire La radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie, Les Ulis Cedex A, EDP Sciences, 2006

## Tables des figures

Figure 1: Illustration des différents rayonnements dans notre quotidien (IRSN, 2012).....	9
Figure 2: Exposition moyenne aux rayonnements ionisants par habitant (UNSCEAR 2008)	10
Figure 3: Dommages de l'ADN induits par les rayonnements, mécanismes de réparation et possible conséquences dans les cellules de mammifères .....	13
Figure 4: Nombre de cassures double brin par cellules en fonction de la dose (Gy) d'irradiation.....	14
Figure 5: Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN causés par l'irradiation..	16
Figure 6: Procédure d'extraction .....	24
Figure 7: Procédure d'extraction de .....	25
Figure 8: Résultats obtenus à partir du ladder et à partir d'un échantillon .....	27
Figure 9: Principe de détection par SYBR Green.....	29
Figure 10 : Graphique de l'amplification qPCR. Intensité du signal fluorescent en fonction du nombre de cycle qPCR. ....	30
Figure 11: Droite de standardisation utilisée dans le but de déterminer l'efficacité des amorces de l' $\alpha$ -2 globine.....	31
Figure 12: Dérivée première de la courbe.....	33
Figure 13 : gel précoulé "Mini PROTEAN" et station (Biorad, 2014).....	37
Figure 14: Illustration d'un transfert de membrane (Biorad, 2014) .....	37
Figure 15: Immunofluorescence des $\gamma$ H2AX de cellules mononuclées du sang périphérique	42
Figure 16 : Schéma des différents protocoles suivis dans le but de l'extraction d'ARN au départ de sang total. ....	44
Figure 17: Graphique de l'expression des $\alpha$ -globine et $\beta$ -globine sur les échantillons issus du kit Qiagen et du kit PAXgene ainsi que des PBMC.....	48
Figure 18: Graphique de l'expression du gène DDB2 en fonction de la dose d'irradiation et de la température de conservation des échantillons sanguins. ....	50
Figure 19: Graphique de l'expression normalisé du gène PCNA en fonction de la dose d'irradiation (Gy) .....	51
Figure 20: Graphique de l'expression normalisé du gène FDXR en fonction de la dose d'irradiation (Gy) .....	52

Figure 21: Graphique de l'expression normalisé du gène DDB2 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) .....	53
Figure 22: Graphique de l'expression normalisé du gène TNRF5F10B en fonction de la dose d'irradiation (Gy) L.....	54
Figure 23: Graphique de l'expression normalisé du gène VWCE en fonction de la dose d'irradiation (Gy) .....	55
Figure 24: Graphique de l'expression normalisé du gène NDUFAF6 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) .....	55
Figure 25: Graphique de l'expression du gène PCNA suite à une large gamme de dose d'irradiation.....	56
Figure 26 : Western blot de la protéine p53.....	58
Figure 27 marqueur de poids moléculaire .....	58
Figure 28: Coloration des protéines totales par la coloration au bleu de Coomassie .....	59
Figure 29: Analyse par Western blot de la phosphorylation de la protéine p53 par irradiation aux rayons X.....	60
Figure 30: Coloration des protéines.....	62
Figure 31: Taux de protéines p53 et p53 phosphorylée.....	63
Figure 32 : Coloration des protéines totales à l'aide du colorant « Stain free » (gel) .....	64
Figure 33 : Coloration des protéines totales à l'aide.....	65
Figure 34: Marqueur de poids moléculaire :.....	65
Figure 35: Western blot de la protéine VCWE.....	66
Figure 36: Graphique de l'expression normalisé du gène VWCE en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.....	68
Figure 37: Graphique de l'expression normalisé du gène VWCE en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules NH32. ....	68
Figure 38: Graphique de l'expression normalisé du gène NDUFAF6 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.....	69
Figure 39: Graphique de l'expression normalisé du gène NDUFAF6 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) reçus par les cellules TK6.....	70

## 8. Annexes

### Tables des annexes

Annexe 1 : Isolation des PBMCs par la méthode Histopaque (Histopaque-1077)

Annexe 2 : Protocole de la coloration des foyers  $\gamma$ -H2AX dans les PBMCs par immunofluoromicroscopie

Annexe 3 : Protocole du kit PAXgene

Annexe 4 : Protocole du kit Qiagen « QIAamp RNA Blood Mini Kit »

Annexe 5 : Quantification de l'ARN à l'aide de Trinean Xpose

Annexe 6 : Analyse qualitative de l'ARN par Agilent Bioanalyseur

Annexe 7 : Protocole de la transcription inverse

Annexe 8: Extraction protéique de cellules en suspension à par la méthode RIPA

Annexe 9: Extraction protéique de cellules en suspension à l'aide du kit « AllPrep »

Annexe 10: Quantification des protéines par la méthode BCA



## **Annexe 1 : Isolation des PBMCs par la méthode Histopaque (Histopaque-1077)**

L'isolation des PBMCs doit se faire endéans les 6 heures après le prélèvement sanguin. Entre temps, placer les tubes sur un agitateur afin de prévenir l'hypoxie des cellules.

1. Equilibrer la solution d'Histopaque dans un tube conique de 15 ml (avec un rapport de un volume d'Histopaque pour un volume de sang) à TA. La solution de PBS (tampon phosphate salin) et la solution LGM-3 (solution pour la croissance lymphocytaire moyen-3) seront également équilibrer à température ambiante.
2. Mélanger le tube de sang par léger retournement et ajouter doucement le sang dans la solution d'Histopaque.
3. Centrifuger 30 minutes à 400 g (avec les options breaks et acceleration désactivées)
4. Les PBMCs se trouvent en anneau. Pipeter les PBMCS et les placer dans un nouveau tube à fond rond.
5. Ajouter 10 ml de PBS, mélanger doucement et centrifuger 10 min à 250g (avec les options breaks et accélération enclenchées).
6. Retirer le surnageant par aspiration et resuspendre les cellules par léger mouvement. Ajouter 5 ml de LGM-3 et centrifuger pendant 10 min à 250g.
7. Retirer le surnageant par aspiration et resuspendre les cellules par léger mouvement.

## **Annexe 2 : Protocole de la coloration des foyers $\gamma$ -H2AX dans les PBMCs par immunofluoromicroscopie**

### 1. Fixation des cellules PBMCs

Transférer le volume adéquat de cellules en suspension dans un tube Eppendorf de 1,5ml. Une quantité de 0,5 à  $1.10^6$  cellules sont nécessaire pour chaque échantillon. Centrifuger à 6000 rpm pendant 4 minutes. Eliminer le surnageant.

Ajouter par la suite 400 $\mu$ l de PFA 4% (4% de paraformaldéhyde dans du PBS (pH 7,4)) et homogénéisé. Laisser incuber à 4°C pendant 20 min ou à TA pendant 10 min. Centrifuger ensuite à 6000 rpm pendant 4 min. Eliminer le surnageant et resuspendre dans 1 ml de PBS. Les échantillons peuvent ensuite être conservé à 4°C si besoin.

Remarque : L'échantillon témoin non irradié est soumis à la même condition que les cellules irradiées et est fixé au même point de temps que les cellules irradiées.

### 2. Cytospin

Centrifuger les cellules à 6000 rpm pendant 4 min. à température ambiante. Prudemment, retirer le surnageant par pipetage. Resuspendre le culot cellulaire dans 200 $\mu$ l de PBS-FBS 10% froid. Centrifuger à 6000 rpm pendant 4 min. à TA.

Durant la centrifugation, les Shandon EZ Double Cytofunnel<sup>®</sup> (Thermo scientific, USA) ont préparé pour la cytopspin en plaçant une lame Starfrost (Waldemar Knittel, Allemagne) à l'intérieur du Cytofunnel. Lorsque la lame est placée de manière correcte, placer une lamelle ronde sous l'ouverture de l'entonnoir et fermer la Cytofunnel en s'assurant que son contenu est bien en place afin de réaliser la cytopspin.

Après la centrifugation, retirer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans 200  $\mu$ l de PBS-FBS 10%. Pipeter la solution cellulaire et l'introduire dans la cytopspin, et placer le capuchon sur l'extrémité de l'entonnoir. Placer le cytofunnel dans la centrifugeuse Cytopspin et centrifuger à 900 rpm pendant 5 min. à TA. Après centrifugation, retirer les lamelles couvre-objet et les placer dans un puits d'une plaque de culture 4 multi-puits de sorte que la face contenant les PBMCs soient vers le haut. Les lamelles peuvent être séchées à l'air pendant 2 minutes. Doucement rincer deux fois les lamelles à l'aide de 500  $\mu$ l de PBS froid pendant 5 minutes sous agitation.

### 3. Perméabilisation

Incuber les échantillons pendant 3 min. avec 300 µl de PBS-Triton X-100 0,25% à TA. Laver ensuite les cellules trois fois à l'aide de 500 µl de PBS pendant 5 minutes sous agitation.

### 4. Saturation

Incuber les cellules dans 500 µl de PBS contenant du BSA 3% pendant 30 minutes à TA.

### 5. Incubation avec l'anticorps primaire

Calculer le volume d'anticorps primaire nécessaire en sachant que la solution totale d'Ac doit être de 30 µl par lamelle (d'un diamètre de 1 à 1,3 cm). La dilution de cet Ac. primaire doit être dilué d'un facteur 1 : 300 dans du PBS.

Assembler une chambre humide afin d'éviter l'évaporation de la solution d'anticorps primaire. Pour faire celle-ci, prendre une boîte plastique à l'intérieur de laquelle on placera un papier épais trempé d'eau. Retirer l'excès d'eau et placer un parafilm par dessus le papier. Pour chaque différents temps une zone spécifique est attribuée dans la chambre humide.

Pipeter 30 µl de la solution d'anticorps primaire du  $\gamma$ -H2AX et déposer sur le parafilm en une petite goutte. Retirer les lamelles du puits, et l'essuyer afin d'éviter les dilutions de l'Ac. primaire. Placer les lamelles de manière que le coté avec les cellules soit en contact direct avec la solution d'AC. primaire. Incuber pendant une heure à 37°C.

Après le temps d'incubation, retirer les lamelles de la chambre humide et placer les dans des puits d'une plaque multi-puits avec le coté contenant les cellules dirigés vers le haut. A l'aide d'une pipette, retirer la solution et laver les cellules trois fois à l'aide de 500 µl de PBS pendant 10 minutes sous agitation.

### 6. Incubation avec l'anticorps secondaire

A partir de maintenant jusqu'à la fin du protocole, il est indispensable de travailler dans l'obscurité. Ceci évitant ainsi l'excitation du fluorochrome contenu dans la solution d'anticorps secondaire.

Calculer la quantité nécessaire de solution d'Ac. primaire (30 µl/échantillon). Diluer l'anticorps secondaire dans du PBS d'un facteur de 1 : 300.

Nettoyer la chambre humide et pipeter 30 µl de la solution d'Ac primaire sur une nouvelle feuille de parafilm en formant une petite goutte. Retirer les lamelles de la plaque multi-puits, retirer l'excès de liquide à l'aide d'un papier et déposer les lamelles sur le parafilm de telle

manière que la face contenant les cellules soient en contact direct avec la solution d'Ac. Incuber pendant une heure à 37°C dans l'obscurité.

Après le temps d'incubation, retirer les lamelles de la chambre humide et placer les dans des puits d'une plaque multi-puits avec le coté contenant les cellules dirigés vers le haut. A l'aide d'une pipette, retirer la solution et laver les cellules deux fois à l'aide de 500 µl de PBS pendant 10 minutes sous agitation

#### 7. Contre-coloration des noyaux par DAPI

Contre-colorer à l'aide du colorant 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pendant 20 min à l'aide de 250 µl de DAPI préalablement dilué dans du PBS (1 : 1000). Laver ensuite deux fois les cellules dans du PBS pendant 10 min.

#### 8. Montage

Les lamelles couvre-objet sont montées sur des lames Starfrost. Déposer une goutte de solution de montage à l'aide d'une pipette sur des lames Starfrost. Retirer les lamelles de la plaque multi-puits et déposer les sur une goutte avec le coté contenant les cellules vers le bas. Tourner la lame et presser doucement sur un tissu pour enlever l'excès de solution de montage.

#### 9. Visualisation à l'aide du microscope par immunofluorescence

Les images d'immunofluorescence sont capturées avec un microscope TE2000E Nikon automatisé à épifluorescence, équipé d'un objectif 40x et un objectif de 60x huile de plan, d'une caméra Andor Ixon + EM-CCD. Les images sont ensuite traitées par le logiciel IQ Andor.

### **Annexe 3 : Protocole du kit PAXgene Blood RNA mini kit**

Avant de commencer, ajouter l'éthanol au tampon BR4 et préparer la solution de DNase I stock. Dissoudre le disque de DNase I (1500 Kunitz units) dans 550 µl d'eau exempte de RNase fournie avec le kit. Veiller à ne pas perdre de DNase lors de l'ouverture du flacon. Ne pas vortexer la reconstitution de DNase. Le mélange devra seulement être effectué par de légers retournements du tube. Pour un stockage à long terme du DNase I, retirer la solution stock du flacon en verre, diviser en aliquotes individuelles (pour cela utiliser des tubes de microcentrifugation de 1.5 ml), et stocker à -20°C pendant 9 mois au maximum. Décongelés, les aliquotes peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 6 mois maximum. Ne pas recongeler les aliquotes après décongélation.

1. Centrifuger le tube PAXgene Blood RNA pendant 10 min à 3000 – 5000 g en utilisant une centrifugeuse à rotor oscillant.
2. Retirer le surnageant par décantation ou par pipetage, dans un premier temps retirer par décantation c.-à-d. en retournant le tube, et dans un deuxième temps, retirer le surnageant résiduel par pipetage. (Attention : Veiller à ne pas décrocher le culot cellulaire lorsque que l'on retourne le tube, et à sécher les bords du tube avec un morceau de papier propre!) Ajouter 4 ml d'eau exempte de RNase sur le culot cellulaire, et fermer le tube en utilisant un nouveau bouchon BD Hemogard.
3. Vortexer jusqu'à ce que le culot soit visiblement solubilisé, et centrifuger pendant 10 min à 3000 – 5000 g en utilisant une centrifugeuse à rotor oscillant. Retirer et jeter l'entièreté du surnageant.
4. Ajouter 350 µl de tampon BR1 et vortexer jusqu'à dissolution du culot.
5. Pipeter l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1.5 ml. Ajouter 300 µl de tampon BR2 et 40 µl de protéinase K. Mélanger par vortex pendant 5 secondes, et incubé pendant 10 min à 55°C en utilisant un mélangeur/incubateur à 400 – 1400 rpm (dans notre cas à 700 rpm). (Après incubation, régler la température du mélangeur/incubateur à 65°C si l'étape n°20 est réalisée → ce n'est pas le cas pour notre manipulation). Cette étape permet de dénaturer/détruire les protéines présentes dans l'échantillon.

Remarque : ne pas mélanger le tampon BR2 avec la protéinase K ensemble avant de les avoir ajoutés à l'échantillon.

6. Pipeter le lysat directement dans une colonne PAXgene Shredder (mauve) placée dans un tube de traitement de 2 ml, et centrifuger pendant 3 min à vitesse maximale (mais en n'excédant pas 20 000 g)
7. Délicatement, transférer l'entièreté du surnageant de la fraction éluée dans un nouveau tube de microcentrifugation sans toucher le culot du tube de traitement.
8. Ajouter (à ce surnageant) 350 µl d'éthanol (100%). Mélanger par vortex et centrifuger brièvement (ne pas excéder 1 à 2 sec à 500 – 1000 g) afin de récupérer les gouttelettes de l'intérieur du capuchon vers l'intérieur du tube.
9. Pipeter 700 µl de l'échantillon dans la colonne PAXgene RNA (rouge) placée dans un tube de traitement de 2 ml, et centrifuger pendant 1 min à 8000 – 20 000 g. Placer la colonne sur un nouveau tube de traitement, et jeter l'ancien tube de traitement contenant l'éluât.
10. Pipeter le restant de l'échantillon dans la colonne PAXgene RNA, et centrifuger pendant 1 min à 8000 – 20 000 g. Placer la colonne dans un nouveau tube de traitement, et jeter l'ancien tube contenant l'éluant.
11. Pipeter 350 µl de tampon BR3 dans la colonne PAXgene RNA. Centrifuger 1 min à 8000–20 000 g. placer la colonne dans un nouveau tube de traitement et jeter l'ancien tube contenant l'éluât. Ce tampon est un tampon de lavage permettant ainsi de purifier l'ARN.
12. Ajouter 10 µl de solution stock de DNase I à 70 µl de tampon RDD dans un tube de microcentrifugation. Mélanger par léger mouvement du tube, et centrifuger brièvement pour collecter le liquide résiduel des parois du tube. Si on prévoit le traitement de 10 échantillons par exemple, on va ajouter 100 µl de solution stock de DNase à 700 µl de tampon RDD. Remarque : la DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Le mélange devra seulement être effectué par léger mouvement du tube. Ne pas vortexer !
13. Pipeter la solution mix incubée de DNase (80 µl) directement sur la membrane de la colonne PAXgene RNA, et placer sur la paillasse (20–30°C) pendant 15 min.
14. Pipeter 350 µl de tampon BR3 dans la colonne PAXgene RNA, et centrifuger 1 min à 8000-20 000 g. Placer la colonne sur un nouveau tube de traitement de 2 ml, et jeter l'ancien tube de traitement contenant l'éluât.
15. Pipeter 500 µl de tampon BR4 (en s'assurant que l'éthanol ait bien été ajouté) dans la colonne PAXgene RNA et centrifuger 1 min à 8000–20 000 g. Placer la colonne dans un nouveau tube de traitement, et jeter l'ancien tube de traitement contenant l'éluât.

16. Ajouter à nouveau 500 µl de tampon de tampon BR4 dans la colonne PAXgene RNA. Centrifuger pendant 3 min à 8000–20 000g.
17. Jeter le tube contenant l'éluât et placer la colonne sur un nouveau tube de traitement de 2 ml. Centrifuger 1 min à 8000–20 000 g.
18. Jeter le tube contenant l'éluât. Placer la colonne PAXgene RNA dans un tube de microcentrifugation de 1.5 ml, et pipeter 40 µl de tampon BR5 directement sur la membrane de la colonne PAXgene RNA. Centrifuger 1 min à 8000–20 000 g afin d'éluier l'ARN. Il est important d'humidifier l'entièreté de la membrane avec le tampon BR5 afin de s'assurer d'un maximum d'éluion efficace.

Attention, une fois l'ARN en solution, conserver les tubes sur glace.

19. Répéter l'étape d'éluion (étape 18) comme décrit, en utilisant 40 µl de tampon BR5 et dans le même tube de microcentrifugation.
20. Etape facultative : incuber l'éluât pendant 5 min à 65°C dans le mélangeur/ incubateur (voir étape 5) sans mélanger. Après incubation, conserver immédiatement sur glace. Cette étape d'incubation à 65°C va permettre la dénaturation de l'ARN pour la réalisation d'application en aval. Cette étape de dénaturation de l'ARN ne sera cependant pas réalisée à ce stade. Mais elle sera effectuée pendant la manipulation de synthèse de l'ADNc (=transcription inverse).
21. Réaliser des aliquotes de l'éluât obtenu. Une aliquote de 5 µl servant à la quantification de l'ARN. Et une autre aliquote avec le reste de l'éluât.
22. Conserver les échantillons à -80°C.

#### **Annexe 4 : Protocole du kit Qiagen « QIAamp RNA Blood Mini Kit »**

Avant de commencer, ajouter l'éthanol au tampon RPE et le  $\beta$ -mercaptoéthanol au tampon RLT : 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol par ml de tampon RLT. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol jouant un rôle dans la dénaturation des protéines (et de l'ARN) en brisant les ponts disulfures.

1. Ajouter 1.5 ml de sang dans un tube Falcon de 15 ml. Ajouter ensuite 7.5 ml de tampon EL.
2. Incuber pendant 10 à 15 min dans la glace. (Vortexer brièvement 2 fois durant l'incubation)
3. Centrifuger à 400 g pendant 10 min à 4°C. Après centrifugation, retirer la totalité du surnageant et le jeter. Les leucocytes quant à eux vont former un culot. S'assurer que le surnageant est complètement retiré.

→ Le tampon EL permet de lyser les érythrocytes (qui vont se trouver dans le surnageant). Les leucocytes quant à eux sont intacts et forment un culot cellulaire.

4. Ajouter 3 ml de tampon EL au culot de cellules. Resuspendre les cellules en vortexant brièvement.
5. Centrifuger à 400 g pendant 10 min à 4°C, et retirer complètement le surnageant et le jeter. Cette étape permettant de s'assurer de l'élimination de tous les érythrocytes.
6. Ajouter 600  $\mu$ l de tampon RLT au culot de leucocytes. Pipeter pour mélanger jusqu'à ne plus voir d'amas cellulaires visibles. Cette étape permettant l'obtention d'un lysat cellulaire de leucocytes. Le tampon RLT va permettre la lyse des leucocytes une fois que ceux-ci aient été séparés du reste des cellules sanguines.
7. Pipeter directement la totalité du lysat dans la colonne QIAshredder préalablement fixée à un tube collecteur de 2 ml. Centrifuger pendant 2 min à vitesse maximale pour homogénéiser l'échantillon. Ensuite, jeter la colonne QIAshredder et conserver le lysat homogénéisé. Le rôle de la colonne est de rendre l'échantillon visqueux, plus liquide.
8. Ajouter 600  $\mu$ l d'éthanol 70% pour homogénéiser le lysat et mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger.
9. Prudemment, pipeter l'échantillon, y compris les précipitations qui auraient pu s'être formées, dans une nouvelle colonne QIAamp contenant un tube collecteur, sans humidifier (toucher) les bords de la colonne.



Centrifuger 15 sec à plus de 8000 g (ou plus de 10 000 rpm). Le volume maximum de chargement est de 700 µl. Si le volume de l'échantillon excède 700 µl, charger successivement l'échantillon par-dessus la colonne QIAamp et centrifuger de nouveau. Jeter le tube collecteur contenant le liquide obtenu et conserver la colonne. L'ARN est maintenant retenu dans la colonne. Tout le reste sera éliminé et se trouvera dans le tube collecteur.

10. Transférer la colonne QIAamp sur un nouveau tube collecteur. Ajouter 700 µl de tampon RW1 à la colonne QIAamp et centrifuger 15 sec à plus de 8000 g (ou plus de 10 000 rpm) afin de purifier l'ARN. Jeter le contenu du tube ainsi que le tube collecteur.

Remarque : il est également possible de conserver le tube collecteur de l'étape 10 afin de le réutiliser pour l'étape 11.

11. Placer sur la colonne QIAamp un nouveau tube collecteur de 2 ml. Pipeter 500 µl de tampon RPE (pour lequel l'éthanol avait été préalablement ajouté), dans la colonne QIAamp et centrifuger 15 sec à plus de 8000 g (ou plus de 10 000 rpm). Jeter le tube collecteur et son contenu.

12. Ouvrir prudemment la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon RPE. Fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale (20 000 g ou 14 000 rpm) pendant 3 min.

13. Recommandé : placer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et jeter l'ancien tube contenant le filtrat. Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 min.

14. Transférer la colonne QIAamp dans un tube de microcentrifugation de 1.5 ml et pipeter 30 à 50 µl d'eau exempte de RNase directement par-dessus la membrane QIAamp. Centrifuger pendant 1 min à plus de 8000 g (ou plus de 10 000 rpm) afin d'éluer l'ARN. Répéter l'opération si plus de 0.5 ml de sang total a été traité.

Remarque : une fois que l'ARN se trouve en solution, celle-ci est fragile et il sera nécessaire de la conserver sur de la glace.

## Annexe 5 : Quantification de l'ARN à l'aide de Trinean Xpose

Attention : Veiller à bien mélanger l'échantillon en vortexant avant pipetage.

### 1. Chargement du blanc et des échantillons (2µl/puits) :

- Tremper la pointe du tips de la pipette dans l'échantillon et appuyer sur le bouton jusqu'à légèrement dépasser le premier arrêt.
- Relâcher doucement le bouton, afin d'éviter la formation de bulle d'air.
- Déposer l'échantillon dans le slide avec un angle de 45° entre celui-ci et le tips.

Remarque :

En plus de dépôts des échantillons, la réalisation d'un blanc est nécessaire. Ce blanc sera toujours constitué d'eau et non pas du tampon (tel que le SDS 10% pour l'analyse des protéines). En effet, cela pourrait interférer dans les résultats des échantillons.

### 2. Lancement de l'analyse :

- Sur le menu d'accueil, appuyer sur le bouton "measure".
- Sélectionner votre nom d'utilisateur et le type de Slide utilisé.
- Définir la position du blanc ainsi que des échantillons.
- Appuyer sur la flèche de droite et suivre les instructions. Après quelques instants, l'écran vous demandera de charger votre slide dans l'appareil.

Durant l'analyse des échantillons, il est possible d'inscrire les informations concernant les échantillons.

- Entrer le nom de l'expérience ainsi que celui des échantillons.
- Sélectionner l'application désirée pour l'analyse. Attention : une fois sélectionnée et enregistré, il n'est plus possible de sélectionner une autre application.

Une fois que la mesure est terminée, il vous est demandé de retirer la Slide et un écran avec vos résultats apparaîtra. Les mesures sont maintenant prêtes à être analysées ou exportées.

## **Annexe 6 : Analyse qualitative de l'ARN par Agilent Bioanalyseur**

### Conditions de stockage

Congeler à  $-20^{\circ}\text{C}$  le tube ARN de référence (=ladder, = standard) qui n'a pas encore été ouvert. Des aliquotes doivent être conservées à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Garder tous les autres réactifs à  $4^{\circ}\text{C}$  pour éviter d'obtenir de mauvais résultats causés par la dégradation des réactifs.

Protéger le colorant et les mélanges de colorants de la lumière. Retirer le capuchon uniquement durant le pipetage. Le colorant se décompose lorsqu'il est exposé à la lumière.

### Protocole

Durant les différentes étapes, veiller à laisser les échantillons sur glace (afin d'éviter la dégradation de l'ARN).

#### • **Préparation du standard RNA**

1. Centrifuger brièvement le ladder et pipeter dans un flacon exempt de RNase.
2. Dénaturer en le chauffant 2 min à  $70^{\circ}\text{C}$  et placer directement dans la glace.
3. Préparer les aliquotes dans un flacon exempt de RNase avec le volume nécessaire pour une analyse ( $>1\mu\text{l}$ ).
4. Conserver les aliquotes à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Après la dénaturation préalable, les aliquotes congelées ne doivent pas être dénaturés à nouveau.
5. Avant utilisation, dégeler le ladder dans la glace (pour éviter un réchauffement trop important)

#### • **Préparation du gel**

1. Pipeter  $550\mu\text{l}$  de RNA gel matrix (bouchon rouge) et déposer sur un filtre muni d'un tube collecteur.
2. Centrifuger à  $1500\text{ g}$  pendant 10 min.
3. Faire des aliquotes de  $65\mu\text{l}$  de gel filtré dans des tubes de microcentrifugation exempt de RNase de 0.5 ml. Ces aliquotes de gel filtré peuvent être conservées durant 4 semaines à  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### • **Préparation du Gel-Dye mix**

1. Laisser le RNA dye concentrate (bouchon bleu) s'équilibrer à température ambiante durant 30 min.

2. Vortexer le RNA dye concentrate pendant 10 secondes, centrifuger brièvement et ajouter 1  $\mu$ l du colorant dans une aliquote de 65  $\mu$ l de gel filtré.
3. Vortexer la solution. Centrifuger pendant 11 minutes à 13000 rpm. Il faut utiliser cette préparation dans la journée.
4. Pendant la centrifugation, il est judicieux de réaliser la dénaturation des échantillons.

Remarque : les échantillons d'ARN doivent subir une dénaturation. Les échantillons seront dénaturés durant 2 min à 70°C. On veillera à respecter ce temps car si la dénaturation dure trop longtemps l'ARN risque d'être détruit. Après cette dénaturation, on replacera directement les échantillons dans la glace.

- **Chargement du Gel-Dye Mix**

1. Prendre une puce à ARN et la placer sur la station
2. Prélever 9  $\mu$ l de gel-dye mix et le déposer dans le puits marqué par "G"
3. Vérifier que la seringue de la station se trouve bien en position 1 ml. Fermer la station jusqu'à entendre un "clic".
4. Pousser le piston jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip. Attendre 30 secondes.
5. Relâcher le piston et attendre quelques instants que celui-ci se stabilise.
6. Rouvrir la station et déposer 9  $\mu$ l de gel-dye mix dans les deux autres puits marqués par "G"

- **Chargement du marqueur**

1. Pipeter 5  $\mu$ l de RNA marker (bouchon vert) et le placer dans les 12 puits d'échantillons ainsi que dans le puits de la référence.

- **Chargement du standard et des échantillons**

1. Pipeter 1  $\mu$ l du standard dans le puits marqué par une échelle.
2. Pipeter 1  $\mu$ l de chacun des 12 échantillons dans chacun des 12 puits.

Remarque : il est important de placer 1  $\mu$ l de RNA marker dans chacun des puits n'étant pas utilisé par un échantillon afin de le contact avec les électrodes puissent s'effectuer correctement.

3. Garder la puce horizontalement et déposer la dans le IKA vortex. Vortex 1 min à 2400 rpm.
4. Déposer la puce dans l'Agilent 2100 bioanalyseur et fermer le couvercle.

5. Démarrer la lecture après sélection du programme.

Remarque : l'analyse de la puce Agilent doit être réalisée dans les 5 min après sa préparation.

**Remarque:** il est important de veiller à la propreté des électrodes du Bioanalyseur avant et après son utilisation. C'est pourquoi avant toute première utilisation, l'utilisation d'une puce spécifique contenant de RNase Zap ainsi qu'une puce contenant de l'eau va permettre la décontamination et le rinçage des électrodes.

1. Rincer les électrodes à l'aide de 350 µl de RNase Zap durant 1 minute.
2. Rincer les électrodes à l'aide de 350 µl d'eau exempte de RNase durant 10 sec
3. Laisser le couvercle du Bioanalyseur ouvert quelques instants afin que les électrodes sèchent complètement avant l'analyse.

- **Lancement du programme**

1. Allumer l'ordinateur et choisir le programme " 2100 Expert". Le menu "Instrument" apparait.
2. Vérifier que le bioanalyseur soit bien en communication avec l'ordinateur; lors de l'ouverture/fermeture du couvercle du bioanalyseur, cela apparaîtra automatiquement sur l'écran du pc.
3. Déposer la puce dans le Bioanalyseur 2100 et fermer délicatement le couvercle
4. Cliquer sur l'icone "Assay" et sélectionner le type d'analyse souhaitée (Il existe différentes possibilités d'ARN telles que ; procaryotes ou eucaryotes, Nano ou Pico, total ou messenger).
5. Cliquer sur le bouton "Start".

## Annexe 7 : Protocole de la transcription inverse

Quelques modifications ont été apportées au protocole initial. Nous n'avons pas travailler avec un échantillon de 5  $\mu\text{l}$  mais uniquement avec 4.5  $\mu\text{l}$ .

Avant de commencer, il est nécessaire de laisser les échantillons et l'amorce pour la RT (Random Primers) décongeler dans la glace. Placer également : eau exempte de RNase (contenu dans le kit),  $\text{MgCl}_2$ , le Tampon de Reaction, la solution PCR Mix (qui contient les dNTPs).

Cependant, on laissera le plus longtemps possible au frigo, les 2 enzymes; Transcriptase inverse et la RNase inhibitor.

Mélanger et centrifuger légèrement chacun des composants avant leur utilisation. Préparer le mélange réactionnel suivant sur glace;

Réactifs	Volume
Eau	Vol pour compléter jusqu'à 5 $\mu\text{l}$ ( si besoin)
ARN matrice (5 $\mu\text{g}$ /réaction)	Jusqu'à <b>4.5 <math>\mu\text{l}</math></b> (ou 5 $\mu\text{l}$ )
Amorce aléatoire hexamère (=Random hexamer primer )(0.5 $\mu\text{g}$ /réaction)	<b>0.5 <math>\mu\text{l}</math></b>
	<b>Volume total : 5 <math>\mu\text{l}</math></b>

Fermer hermétiquement chacun des tubes d'ARN. Placer les tubes dans un bloque préchauffé à 70°C pendant 5 min. Ensuite, placer les immédiatement sur de la glace pendant au moins 5 minutes. Centrifuger chacun des tubes pendant 10 secondes dans une microcentrifugeuse pour collecter la condensation et maintenir le volume initial. Garder les tubes fermés et dans la glace jusqu'à l'ajout du mélange réactionnel de la transcriptase inverse.

Préparer la solution réactionnelle de la transcriptase inverse en mélangeant les éléments suivants du GoScript™ Reverse Transcription System dans des tubes de microcentrifugation placés dans la glace.

Réactifs	Volume ( $\mu$ l) par réaction
GO Script 5X Reaction Buffer	4
Magnesium chloride ( $C_i$ :25 mM et $C_f$ : 3.33mM)	2
PCR Nucleotide mix (final conc. 0,5 mM each dNTP)	1
RNase inhibitor Recombinant RNasin	0.5
GoScript RT enzyme	1
Nuclease-Free water	6.5
Volume total/ réaction : 15 $\mu$ l	

Préparer une solution suffisante pour permettre l'ajout de 15  $\mu$ l dans chacun des tubes de réaction pour la synthèse de l'ADNc. Déterminer le volume nécessaire de chacun des composants, et combiner les dans l'ordre énuméré. (Veiller à préparer un volume supérieur au volume nécessaire) Vortexer légèrement pour mélanger et garder dans la glace jusqu'à distribution dans les tubes.

Ajouter 15  $\mu$ l de la solution réactionnelle dans chacun des tubes contenant l'ARN et les amorces. Attention aux contaminations croisées. Mélanger légèrement et centrifuger.

Hybridation: Incuber le mélange dans le thermocycleur à 25 °C pendant 5 minutes.

Elongation : Incuber dans le thermocycleur à 42°C pendant 60 minutes.

Inactivation de la transcriptase inverse : Le but étant de par la suite réaliser une qPCR, l'enzyme doit être inactivée avant amplification. Incuber les tubes à 70°C pendant 15minutes. Placer les tubes sur glace et centrifuger légèrement. Ceux ci peuvent être conservés à -20°C

## **Annexe 8: Extraction protéique de cellules en suspension à par la méthode RIPA**

Premièrement, préparer la tampon RIPA comme suit :

- 50mM de tampon Tris-HCl (pH 7,4)
- 150mM NaCl
- 1% NP-40/IGELPAL CA-630
- 0,5% Sodium déoxycholate
- 0,1% Sodium dodécylsulfate
- une tablette d'inhibiteur des protéases par 10ml de tampon
- une tablette d'inhibiteur des phosphatases

Les deux différentes tablettes doivent être ajouté juste avant l'utilisation du tampon. La solution de tampon peut être conservée à 4°C.

Déterminer le nombre de cellules en suspension et prélever le volume adéquat pour avec une quantité de  $10^6$  cellules. Centrifuger les cellules en suspension à 2500 g (6000 rpm) pendant 5 minutes et éliminer ensuite le surnageant. Laver deux fois le culot cellulaire dans 1 ml de PBS froid. Centrifuger à nouveau à 2500 g (6000 rpm) pendant 5 minutes et retirer le surnageant. Ajouter le tampon RIPA au culot cellulaire et pipeter le mélange afin de resuspendre les cellules. Utiliser 1 ml de tampon RIPA pour environ  $2 \cdot 10^6$  cellules lymphoblastoïdes. Agiter le mélange légèrement pendant 15 minutes sur glace. Afin de réduire la viscosité, passer le lysat au travers d'une aiguille 26 gauge attachée à une seringue de 1 ml. Incuber pendant 10 minutes sur glace ou à 4°C. Centrifuger par la suite à 14000g pendant 15 minutes à 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires. Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour les



## **Annexe 9: Extraction protéique de cellules en suspension à l'aide du kit « AllPrep »**

Déterminer le nombre de cellules en suspension et prélever le volume adéquat pour avoir une quantité de  $10^6$  cellules. Centrifuger les cellules en suspension à 300 g pendant 5 minutes et éliminer ensuite le surnageant. Homogénéiser le culot cellulaire dans 350  $\mu$ l de tampon RLT. Passer ensuite le lysat au moins 5 fois à travers une aiguille 20 gauge. Transférer le lysat homogénéisé dans une colonne « AllPrep DNA Spin column » placée sur un tube collecteur de 2 ml. Fermer doucement le couvercle et centrifuger pendant 30 secondes à plus de 8000 g ( $> 10\,000$  rpm). Jeter la colonne contenant l'ADN dont nous n'avons pas besoin. Récupérer le tube contenant l'éluant et ajouter 250  $\mu$ l d'éthanol 70%. Mélanger correctement par pipetage afin de précipiter l'ARN. Transférer ensuite la solution incluant les éventuelles précipitations qui se seraient formés dans une colonne « RNeasy spin column » sur un tube collecteur de 2 ml. Centrifuger pendant 15 secondes à plus de 8000 g ( $> 10\,000$  rpm). Conserver le tube collecteur contenant les protéines et y ajouter 600  $\mu$ l de tampon APP. Mélanger vigoureusement et laisser incuber pendant 10 minutes à TA afin de précipiter les protéines. Centrifuger à vitesse maximale pendant 10 min. et retirer le surnageant. Ajouter 500  $\mu$ l d'éthanol 70% au culot protéique et centrifuger à vitesse maximale pendant 1 min. Retirer le surnageant par pipetage et laisser sécher le culot protéique pendant 10 min. à TA permettant ainsi l'évaporation de l'éthanol. Ajouter 100  $\mu$ l d'une solution SDS 10%. Incuber pendant 5 min. à 95°C afin de dissoudre et de dénaturer complètement les protéines.

## **Annexe 10: Quantification des protéines par la méthode BCA**

Préparer le réactif BCA (Solution Acide Biochimique) pour :

- 6 standards, un blanc et un volume en excès = 8 échantillons
- Nombre d'échantillon (en prenant en compte le nombre de dilution si nécessaire)

Il faut 80 µl de solution BCA par échantillon ainsi que le volume de BCA nécessaire divisé par un facteur 50 d'une solution de sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>).

Ajouter 4 µl d'échantillon à 80 µl de BCA (rapport 1 : 20). Les échantillons nécessitant souvent une dilution. Réaliser celle-ci dans la solution de RIPA pour les échantillons ayant été extrait par cette méthode et dans de l'eau pour les échantillons ayant été extrait à l'aide du kit « AllPrep DNA/RNA/Protein ». Vortexer les échantillons et mélanger par pipetage. Laisser incuber à 37°C pendant 30 minutes. Vortexer et pipeter à nouveau afin de s'assurer de l'homogénéité des protéines dans la solution. Attendre que les échantillons soient revenus à température ambiante et réaliser la mesure à l'aide d'un spectrophotomètre. Cependant ne pas attendre plus d'une heure pour l'analyse.



Ce travail réalisé au sein du Centre d'étude de l'énergie nucléaire de Mol aborde l'étude de l'expression de gènes comme biomarqueur des effets des radiations sur les cellules immunitaires humaines. Un des facteurs important dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants étant la protéine p53, le biomarqueur choisi pour cette étude a été l'expression de gènes cibles de cette protéine.

Dans la première partie, ce travail a permis l'étude de divers aspects pratiques de l'utilisation des biomarqueurs de l'expression des gènes en dosimétrie biologique. Cette étude a également permis de déterminer deux gènes ; *VWCE* et *NDUFAF6* comme étant de bons biomarqueurs prédictifs de l'exposition des rayonnements.

Dans la seconde partie, ce travail s'est consacré à l'étude de deux lignées cellulaires possédant un statut p53 différent ; TK6 (p53+/+) et NH32 (p53-/-). Les résultats obtenus ont permis de faire le lien entre la surexpression de certains gènes en réponse aux radiations et la présence de cette protéine. Notamment, il a été démontré que les gènes *VWCE* et *NDUFAF6* sont des gènes cibles de cette protéine.

D'une manière générale, ce travail a permis d'apporter un nouvel éclairage sur les études de dosimétrie biologique utilisant l'expression génétique comme biomarqueur de l'exposition aux rayonnements ionisants.