

Bourses SFRP

La SFRP a attribué deux bourses à de jeunes étudiants pour leur stage de maîtrise 2^e année de recherche. Nous avons le plaisir de publier dans cette rubrique destinée aux jeunes chercheurs un résumé de leur stage. Nous leur souhaitons de continuer brillamment leur carrière en souhaitant qu'ils resteront attachés à la radioprotection.

Rôle de la dose de radiations reçue au cœur lors de la radiothérapie dans l'augmentation du risque à long terme de pathologie cardiaque après un cancer de l'enfant.

Mariama Stéphanie Diallo. Laboratoire de l'unité 605 de l'Inserm « épidémiologie des cancers » sous la direction de Florent de Vathaire et Nadia Haddy.

Durant les trois dernières décennies, une importante amélioration de la survie après cancer a été observée grâce au dépistage précoce et aux progrès thérapeutiques. En France, environ 1 600 nouveaux cas de cancers de l'enfant sont diagnostiqués chaque année ; le taux de survie à 10 ans atteint 72 %. Cependant, la radiothérapie et la chimiothérapie, qui constituent les traitements de base de la plupart des cancers ont des effets iatrogènes importants du fait de leur mécanisme d'action cytotoxique. Ainsi, une augmentation du risque à long terme de pathologies telles que les seconds cancers ou les pathologies cardiovasculaires a été observé chez les adultes traités pour un cancer durant l'enfance. Une précédente étude a montré que le risque de décès par pathologie cardiaque chez les survivants d'un cancer de l'enfant est 6 fois plus élevé que dans la population générale (Tukenova *et al.*, 2009).

Lors de mon stage de M2 recherche en santé publique, j'ai étudié le rôle des traitements anticancéreux dans la morbidité à long terme par pathologie cardiaque chez les patients atteints d'un cancer pendant l'enfance. L'objectif de cette étude était de quantifier le risque de développer un infarctus du myocarde, un angor ou une insuffisance cardiaque en fonction des traitements anticancéreux reçus, en particulier selon la dose de radiations au cœur.

La population étudiée est une cohorte de 3 073 patients ayant survécu au moins 5 ans à un cancer de l'enfance, traité en France entre 1942 et 1985 dans l'un des cinq centres régionaux de lutte contre le cancer participant à l'étude. Ces patients font partie de la cohorte Euro2k qui a été décrite dans une précédente publication (de Vathaire *et al.*, 1999). Les données concernant les traitements reçus ont été recueillies rétrospectivement dans les années 90, puis une actualisation des données cliniques a été réalisée à partir de 2002. La dose de radiations cumulée reçue en 7 points du cœur, quelle que soit la localisation de la tumeur à traiter, a été estimée par le logiciel *Dose_EG* (Diallo *et al.*, 1996). La dose moyenne cumulée au cœur est calculée à partir des doses reçues en ces 7 points. Le statut vital des patients et les causes de décès ont été recueillies auprès de l'INSEE et du CepiDc. Les patients vivants ont été interrogés par autoquestionnaires afin de connaître leur état de santé, notamment concernant les pathologies cardiaques. Durant mon stage, j'ai participé à la validation médicale des pathologies cardiaques déclarées par les patients : nous avons élaboré des critères de validation cliniques et biologiques pour chacune des 3 pathologies ; puis nous avons contacté les

BOURSES SFRP

médecins traitants et les cardiologues des patients concernés afin de leur proposer de valider ou non le diagnostic sur la base de ces critères.

J'ai analysé ces données à l'aide d'un modèle de survie à risque proportionnels. L'évènement d'intérêt était soit le décès par infarctus du myocarde ou angor ou insuffisance cardiaque, soit le diagnostic de ces pathologies. Cet évènement sera appelé « évènement cardiaque » dans la suite du résumé.

J'ai calculé les risques relatifs (RR) associés aux différentes modalités des variables décrivant le traitement. J'ai tout d'abord réalisé une analyse bi-variée afin d'étudier individuellement l'effet de chaque facteur, ajusté sur l'âge au diagnostic. Ensuite, afin de choisir le meilleur indicateur de risque cardiaque pour la dose reçue au cœur, j'ai étudié chacune des doses estimée aux 7 points du cœur, la dose maximale et la dose minimale, en les incluant tour à tour dans un modèle ajusté sur l'âge au diagnostic et sur la dose moyenne au cœur. J'ai choisi l'indicateur de l'exposition du cœur aux radiations en fonction des résultats de ces modélisations. Puis j'ai testé un modèle en analyse multivariée, prenant en compte les facteurs identifiés comme ayant un rôle dans la survenue d'un évènement cardiaque.

Le suivi moyen de la cohorte atteint 27,5 ans et 75 % des patients ont été suivis pendant plus de 22 ans. Parmi les 3 073 patients inclus, 1 539 ont reçu de la radiothérapie et de la chimiothérapie, 646 n'ont reçu que de la radiothérapie, 680 n'ont reçu que de la chimiothérapie et 208 ont été traités par chirurgie uniquement. 526 patients sont décédés dont 21 par pathologie cardiaque. Parmi les patients vivants, 35 ont été identifiés comme atteints d'une ou plusieurs des trois pathologies étudiées.

L'analyse bi-variée montre un risque relatif d'évènement cardiaque significativement augmenté pour les patients ayant reçu une dose moyenne cumulée de radiations au cœur comprise entre 5 et 30 Gy (RR = 3,4 ; IC 95 % = 1,5–7,6), ou supérieure à 30 Gy (RR = 8,3 ; IC 95 % = [3,1–21,8]), pour ceux ayant reçu une dose cumulée d'anthracyclines comprise entre 240 et 360 mg/m² (RR = 4,7 ; IC 95 % = [2,0–11,0]) ou supérieure à 360 mg/m² (RR = 7,8 ; IC 95 % = [4,0–15,3]) et pour ceux ayant reçu des vinca-alcaloïdes (RR = 5,3 ; IC 95 % = 2,7–10,4). Les modèles incluant les différentes doses estimées au cœur montrent que la dose moyenne est un bon indicateur de l'exposition du cœur aux rayonnements ionisants. Le modèle multivarié prenant en compte l'âge au diagnostic, le sexe, la dose moyenne cumulée de radiations au cœur, la dose cumulée d'anthracyclines et la prise ou non de vinca-alcaloïdes, confirme ces trois facteurs de risques, avec un risque relatif de 1,08 par Gy pour la dose de radiations au cœur (IC 95 % = [1,06–1,10]). Enfin, nous avons mis en évidence une interaction négative significative entre une dose moyenne cumulée de radiations au cœur supérieure à 5 Gy et une dose cumulée d'anthracyclines supérieure à 240 mg/m² ; le risque relatif des patients cumulant ces deux facteurs atteint néanmoins 73,8 (IC 95 % = [19,6–256,1]).

Cette étude montre que les anthracyclines, les vinca-alcaloïdes et une dose élevée de rayonnement ionisants au cœur sont associés à une augmentation importante du risque à long terme de pathologie cardiaque chez les adultes traités pour un cancer pendant l'enfance. Nous avons quantifié, pour la première fois, le risque de pathologie cardiaque en fonction de la dose de rayonnement ionisant reçue au cœur durant l'enfance pour une radiothérapie. Par ailleurs, si la cardiotoxicité des anthracyclines est connue, le rôle des vinca-alcaloïdes dans le risque de

pathologie cardiaques devra être étudié plus précisément. Ces résultats soulignent l'intérêt d'estimer systématiquement chez les enfants la dose reçue au cœur lors du traitement d'une tumeur par radiothérapie et d'éviter, lorsque des alternatives thérapeutiques sont possibles, d'administrer des doses élevées anthracyclines aux enfants ayant reçu plus de 5 Gy au cœur. L'estimation la dose au cœur permettrait d'identifier les patients les plus à risque de pathologie cardiaque et de leur proposer un suivi cardiologique spécifique.

RÉFÉRENCES

- de Vathaire F., Hawkins M., Campbell S., *et al.* (1999) Second malignant neoplasms after a first cancer in childhood: temporal pattern of risk according to type of treatment, *Br. J. Cancer* **79**, 1884-1893.
- Diallo I., Lamon A., Shamsaldin A., Grimaud E., de Vathaire F., Chavaudra J. (1996) Estimation of the radiation dose delivered to any point outside the target volume per patient treated with external beam radiotherapy, *Radiother. Oncol.* **38**, 269-271.
- Tukenova M., Guibout C., Oberlin O., *et al.* (2009) Long-term overall and cardiovascular mortality following childhood cancer : the role of cancer treatment, *J. Clin. Oncol.* (sous presse).

Rôle du facteur de transcription Slug dans les cellules souches germinales mâles après irradiation. Jean-Philippe Beguel. Stage M2 « Génome, cellules, développement et évolution » au DSV/IRCM/LGAG CEA de Fontenay-aux-Roses, université Paris-Sud, Orsay, sous la direction du Dr I. Allemand.

Les différents stress génotoxiques sont capables de provoquer des dommages de l'ADN qui induisent différentes réponses selon le type cellulaire. Ces réponses peuvent être une survie de la cellule après l'arrêt de son cycle et la réparation de l'ADN, ce qui peut induire des mutations potentiellement cancérogènes, ou bien un processus apoptotique annihilant le risque mutationnel et le processus inflammatoire. De ce fait, dans les lignages en différenciation continue comme l'hématopoïèse et la spermatogenèse, un stress génotoxique entraîne une délétion par apoptose de tout ou partie des progéniteurs tandis que les cellules souches résistantes permettent la restauration d'une différenciation fonctionnelle. L'étude des mécanismes impliqués dans la survie des cellules souches et dans la reprise de la différenciation pourraient expliquer certains cas de résistance aux traitements antitumoraux et par conséquent ouvrir des pistes alternatives de thérapies, mais aussi permettre de définir des outils diagnostics applicables à d'autres lignages en renouvellement.

Les mécanismes de survie des cellules souches restent mal connus et diverses hypothèses sont proposées pour expliquer leur résistance : cela peut être dû à leur état de quiescence, au fait qu'elles disposent de mécanismes de réparation des lésions de l'ADN plus efficaces et une autre hypothèse sur laquelle nous travaillons, l'existence de voies de survies antagonistes des voies de mort.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un stress génotoxique, les rayonnements gamma, sur un lignage en différenciation continue, la spermatogenèse, et ce en utilisant le modèle murin. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un problème plus large qui est l'observation d'une diminution de la fertilité masculine sur laquelle l'effet des rayonnements

à faible dose reste à évaluer, notamment dans le cas d'irradiations chroniques (environnementales, professionnelles ou médicales). Il a été démontré, suite à une irradiation gamma modérée, une déplétion des spermatogonies (qui comprennent les cellules souches et progéniteurs germinaux) entraînant une stérilité transitoire par réduction progressive en spermatocytes et spermatoïdes (les cellules germinales plus différenciées). Cependant, un mois après, la spermatogenèse est de nouveau fonctionnelle indiquant que les cellules souches germinales résistent à la mort radio-induite.

Les résultats précédemment obtenus par le laboratoire ont montré que les spermatogonies mourraient par apoptose p53-dépendante. Une voie d'apoptose qui a été mise en évidence est la voie d'apoptose intrinsèque ou mitochondriale avec un rôle majeur de la molécule proapoptotique Puma, qui fait partie de la famille des *BH3-Only*, dont le gène est transcriptionnellement activé par p53 après irradiation. D'autre part, dans les cellules souches hématopoïétiques en réponse à une irradiation gamma, il a été montré une activation transcriptionnelle du gène *Slug* par la p53. *Slug*, qui fait partie de la famille des facteurs de transcription Snail à doigt de zinc, fut initialement identifié comme un facteur au rôle essentiel dans le développement. En réprimant notamment la transcription du gène *E-cadherine* lors de la transition épithélium-mésenchyme, *Slug* permet la migration cellulaire. Cette capacité en fait un facteur impliqué dans la progression tumorale. Dans le cas des cellules souches hématopoïétiques irradiées, le facteur *Slug* semble favoriser la survie cellulaire notamment par la répression du gène *Puma*.

L'objectif de cette étude est de déterminer si le facteur de transcription *Slug* est impliqué *in vivo* et de manière p53-dépendante dans la survie des cellules souches germinales mâles soumises à un stress génotoxique, comme cela a été montré dans les cellules hématopoïétiques, et si cela passe par l'inhibition du gène proapoptotique *Puma*. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié le taux d'expression du gène *Slug* dans les spermatogonies normales et *p53*^{-/-} ainsi que l'expression de la protéine *Slug* dans les spermatogonies normales et *Slug*^{+/-} après irradiation. Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation significative du taux de transcription du gène *Slug* sept heures après irradiation modérée et ce de manière p53-dépendante. Nous avons également mis en évidence par étude immunohistochimique une expression de la protéine *Slug* dans les spermatogonies suite à une irradiation gamma modérée. Nous avons ensuite étudié, *in vivo*, l'effet de l'inactivation du gène *Slug* dans les spermatogonies irradiées notamment sur leur radiosensibilité. Nos études de cinétique de mort cellulaire, par la technique du TUNEL, ainsi que la quantification des spermatogonies par cytométrie en flux, ont mis en lumière un rôle du facteur *Slug* dans la radio-résistance des spermatogonies irradiées. De plus, ces expériences ont été menées sur des hétérozygotes *Slug*^{+/-}, faute de mâles *Slug*^{-/-}. Les résultats faisant apparaître un effet de dosage génique, il semble alors évident que les spermatogonies *Slug*^{-/-} soient encore plus radio-sensibles, appuyant de ce fait le rôle de *Slug* dans la radio-résistance.

Les résultats obtenus supportent l'idée d'une voie de survie p53-dépendante menée par *Slug* et effective dans les spermatogonies irradiées, même si des études complémentaires restent à effectuer. En effet, il sera par exemple nécessaire d'étudier le taux de transcription du gène *Puma* et l'expression de sa protéine dans les spermatogonies *Slug*^{-/-} irradiées par rapport aux spermatogonies normales irradiées pour déterminer si la radio-résistance des cellules souches germinales peut-être en partie attribuée à l'inhibition de la transcription du gène *Puma* par le facteur *Slug*.