

Conséquences biologiques de l'irradiation mitochondriale chez le nématode *C. elegans*

L'ADN contenu dans le noyau cellulaire est considéré comme étant la principale cible des dommages radio-induits (Morgan, 2003). Cependant, la validité de ce dogme a été questionnée (Pinto et al., 2002) par la découverte des phénomènes non-ciblés, tels que l'instabilité génétique ou les effets bystander observés *in vitro* ou *in vivo* dans les cellules non exposées (Trijuat et al., 2018, Pereira et al., 2014) ce qui remet en question ce dogme central en radiobiologie. En effet, les rayonnements ionisants peuvent interagir avec d'autres organites cellulaires que le noyau, et en particulier avec les mitochondries. Ces dernières peuvent représenter plus de 30 % du volume cellulaire et contiennent également de l'ADN, ce qui en fait des candidates crédibles comme cible principale des rayonnements ionisants avec le noyau (Azzam et al., 2012).

Plusieurs études, revues récemment par Kam et Banati (2013), montrent que les rayonnements ionisants peuvent affecter la structure et la fonction des mitochondries. En termes d'atteinte à l'ADN mitochondrial (ADNmt), il a été montré que ce dernier est plus radiosensible que l'ADN nucléaire, ce qui peut avoir des conséquences fonctionnelles étant donné que la quasi-totalité de l'ADN mitochondrial (ADNmt) est codante (vs 1 % de l'ADN nucléaire). La variabilité génétique de l'ADN mitochondrial est utilisée pour évaluer les changements évolutifs des organismes et la radiosensibilité interindividuelle. En effet, des niveaux élevés de mutations ponctuelles et de délétions de l'ADN mitochondrial sont observés chez les patients irradiés, et de surcroît, permettent de prédire le risque de développer des complications secondaires des radiothérapies. Par ailleurs, les rayonnements ionisants peuvent augmenter le niveau de points chauds de délétions ou 'délétions communes' de l'ADNmt, associées habituellement à des pathologies et au vieillissement. Les complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, permettant de produire l'ATP, peuvent être affectés par les rayonnements ionisants, induisant un dysfonctionnement métabolique et du stress oxydatif, dû à la fuite d'électrons dans la chaîne de transport électronique mitochondriale. Outre les études identifiant les mitochondries comme la source majeure de stress oxydant radioinduit, il a été montré une propagation du signal entre les mitochondries, pouvant amplifier les effets des radiations. Ce signal peut être propagé entre la mitochondrie et le noyau. Enfin, les mitochondries peuvent être la source d'effets décalés dans le temps suite à une irradiation (e.g. dans des cellules HeLa 72 h post-irradiation (Hosoki et al., 2012), dans les cellules filles de cellules irradiées (Kim et al., 2006) ou dans la progéniture de poissons irradiés au stade adulte (Hurem et al., 2017)).

Dans ce contexte général, la thèse proposée vise à étudier la contribution de l'irradiation des mitochondries sur le devenir cellulaire et tissulaire chez le nématode *C. elegans*, à l'aide du microfaisceau MIRCOM permettant de cibler des cellules isolées ou des compartiments cellulaires spécifiques avec un nombre de particules ionisantes prédéterminé et une précision de tir de l'ordre du micromètre. Les données acquises dans le cadre de ce travail permettront également de nourrir la réflexion en cours dans le domaine du développement des Adverse Outcome Pathways (AOPs) pour les rayonnements ionisants. Les AOPs sont utilisés dans le cadre de la toxicologie prédictive, et consistent à relier des événements moléculaires initiateurs à des réponses adverses plus tardives, ayant une valeur réglementaire (Chauhan et al., 2019).

La thèse se réalisera en 4 étapes :

1. Développement de puces microfluidiques ultra-fines. L'irradiation *in vivo* à l'aide d'un microfaisceau nécessite d'immobiliser les organismes afin de ne pas altérer la précision du tir. Cet axe de la thèse visera à développer un système basé sur la microfluidique afin d'irradier les nématodes à haut-débit et avec une grande précision.

2. Caractérisation des conséquences de l'irradiation mitochondriale chez le nématode *C. elegans* à l'échelle moléculaire. Cet axe de la thèse consistera à étudier les effets de l'irradiation ciblée des mitochondries dans les neurones. Diverses méthodes seront utilisées pour caractériser le dysfonctionnement des mitochondries suite à leur irradiation (e.g. analyse de la morphologie des mitochondries, de leur dynamique cellulaire, du fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire, du stress oxydant). Des mutants de *C. elegans* seront également choisis afin d'étudier certaines voies particulières (e.g. lignée Sod-3 associée à la Mn superoxyde dismutase). L'étude de ces réponses biologiques sera réalisée suite à une irradiation avec des protons, selon une gamme de dose - réponse, afin d'identifier le seuil d'induction de ces réponses.

En fonction du déroulement de cet axe, une comparaison avec un modèle biologique beaucoup plus radiorésistant, le tardigrade, pourrait être faite, afin de confirmer les voies de la radiosensibilité mitochondriale chez un autre modèle biologique, ce qui permettrait de renforcer la portée biologique de cette étude.

3. Caractérisation des conséquences de l'irradiation mitochondriale chez le nématode *C. elegans* à l'échelle tissulaire. Les conséquences de l'irradiation des mitochondries des neurones seront recherchées via l'étude du comportement tel que décrit auparavant (Sakashita et al., 2010).

4. Caractérisation de la dose radiologique délivrée. Le logiciel open source Geant-4 sera utilisé pour modéliser la dose délivrée aux mitochondries de la même façon que précédemment décrit (Zein et al., 2017), afin de comparer les résultats à ceux déjà acquis sur culture cellulaire (Walsh et al., 2017).

Profil et Personne à contacter.

Master en toxicologie et biologie moléculaire ; compétences en développement de systèmes microfluidiques. Envoyer vos CV avec une lettre de recommandation, par mail à Christelle Adam-Guillermin IRSN/PSE-SANTE/SDOS/LMDN - Site de Cadarache - Bât. 159 - B.P.3 - 13115 Saint-Paul-Lez-Durance CEDEX - 04 42 19 94 01 - christelle.adam-guillermin@irsn.fr avant le 15 avril 2020.

Biological consequences of mitochondrial irradiation in the nematode *C. elegans*

DNA in the cell nucleus is considered to be the primary target for radiation damage (Morgan, 2003). However, the validity of this dogma has been questioned (Pinto et al., 2002) by the discovery of non-targeted phenomena, such as genetic instability or the bystander effects observed in vitro or in vivo in unexposed cells (Trijau et al., 2018, Pereira et al., 2014) which questions this central dogma in radiobiology. Indeed, ionizing radiation can interact with other cellular organelles than the nucleus, and in particular with the mitochondria. The latter can represent more than 30% of cell volume and also contain DNA, which makes them credible candidates as the main target of ionizing radiation with the nucleus (Azzam et al., 2012).

Several studies, recently reviewed by Kam and Banati (2013), show that ionizing radiation can affect the structure and function of mitochondria. In terms of damage to mitochondrial DNA (mtDNA), it has been shown that the latter is more radiosensitive than nuclear DNA, which can have functional consequences given that almost all mitochondrial DNA (MtDNA) is coding (vs 1% of nuclear DNA). The genetic variability of mitochondrial DNA is used to assess evolutionary changes in organisms and interindividual radiosensitivity. Indeed, high levels of point mutations and deletions of mitochondrial DNA are observed in irradiated patients, and in addition, predict the risk of developing secondary complications of radiotherapy. In addition, ionizing radiation can increase the level of deletion hotspots or "common deletions" of mtDNA, usually associated with pathologies and aging. Complexes in the mitochondrial respiratory chain, used to produce ATP, can be affected by ionizing radiation, inducing metabolic dysfunction and oxidative stress, due to the leakage of electrons in the mitochondrial electronic transport chain. In addition to studies identifying mitochondria as the major source of radio-induced oxidative stress, signal propagation has been shown between mitochondria, which can amplify the effects of radiation. This signal can be propagated between the mitochondria and the nucleus. Finally, mitochondria can be the source of time-delayed effects following irradiation (eg in HeLa cells 72 h post-irradiation (Hosoki et al., 2012), in daughter cells of irradiated cells (Kim et al., 2006) or in the offspring of irradiated fish in the adult stage (Hurem et al., 2017)).

In this general context, the proposed thesis aims to study the contribution of mitochondrial irradiation on cell and tissue fate in the nematode *C. elegans*, using the MIRCOM microbeam to target isolated cells or specific cell compartments with a predetermined number of ionizing particles and a shooting accuracy of the order of a micrometer. The data acquired in the context of this work will also feed the current reflection in the field of the development of Adverses Outcome Pathways (AOPs) for ionizing radiation. PDOs are used in the context of predictive toxicology, and consist in linking initiating molecular events to later adverse responses, which have regulatory value (Chauhan et al., 2019).

The thesis will be carried out in 4 stages:

1. Development of ultra-thin microfluidic chips. In vivo irradiation using a microbeam requires immobilizing organisms so as not to alter the accuracy of the shot. This axis of the thesis will aim to develop a system based on microfluidics in order to irradiate nematodes at high speed and with high precision.
2. Characterization of the consequences of mitochondrial irradiation in the nematode *C. elegans* at the molecular level. This axis of the thesis will consist in studying the effects of targeted mitochondria irradiation in neurons. Various methods will be used to characterize the dysfunction of the mitochondria following their irradiation (e.g. analysis of the morphology of the mitochondria, their cell dynamics, the functioning of the respiratory chain complexes, oxidative stress). Mutants of *C. elegans* will also be chosen to study certain specific pathways (e.g. Sod-3 line associated with Mn superoxide dismutase). The study of these biological responses will be carried out following irradiation with protons, according to a dose-response range, in order to identify the induction threshold for these responses.
Depending on the development of this axis, a comparison with a much more radioresistant biological model, tardigrade, could be made, in order to confirm the pathways of mitochondrial radiosensitivity in another biological model, which would make it possible to strengthen the biological significance of this study.
3. Characterization of the consequences of mitochondrial irradiation on the nematode *C. elegans* on a tissue scale. The consequences of the mitochondria irradiation of neurons will be investigated through the study of behavior as described above (Sakashita et al., 2010).
4. Characterization of the radiological dose delivered. The open source software Geant-4 will be used to model the dose delivered to the mitochondria in the same way as previously described (Zein et al., 2017), in order to compare the results with those already acquired on cell culture (Walsh et al., 2017).

Profile and Contact Person.

Master in toxicology and molecular biology; skills in the development of microfluidic systems. Send your CV with a letter of recommendation, by email to Christelle Adam-Guillermin IRSN / PSE-SANTE / SDOS / LMDN - Cadarache site - Bât. 159 - B.P. 3 - 13115 Saint-Paul-Lez-Durance CEDEX - 04 42 19 94 01 - christelle.adam-guillermin@irsn.fr before April 15, 2020.