

M. Hanot<sup>1</sup>, L. Daudin<sup>2</sup>, J. Hoarau<sup>1</sup>, M. Carrière<sup>1</sup>, B. Gouget<sup>1</sup>, H. Khodja<sup>1</sup> <sup>1</sup>CEA-CNRS UMR9956, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France <sup>2</sup>CENBG Bordeaux

Le laboratoire Pierre Süe développe depuis 2004 un dispositif d'irradiation par microfaisceau d'ions légers en mode dit « ion par ion » sur l'installation microsonde nucléaire.

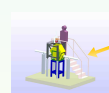
Ce faisceau est produit par un accélérateur de particules de type Van de Graaff de 3.75 MV de tension maximale. Différentes particules peuvent être produites :  $^1\text{H}^+$ ,  $^2\text{H}^+$ ,  $^3\text{He}^+$ ,  $^4\text{He}^+$ , engendrant des pouvoirs d'arrêt de 10 à 100 keV/ $\mu\text{m}$ .

Ce dispositif de micro-irradiation est une méthode de choix pour l'étude des effets biologiques à faible dose et en particulier les effets de voisinage. Il permet l'irradiation de cultures cellulaires dans le plan horizontal, de façon localisée au niveau subcellulaire, avec un nombre prédéterminé d'ions (généralement  $\leq 10$ ). Les résultats obtenus suite à une irradiation localisée sur des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 montrent l'augmentation du taux de cassures de l'ADN ainsi que la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules ciblées et avoisinantes.

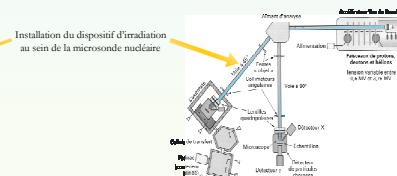
2004

### Définition du projet

Direction verticale du faisceau, dévié par un aimant à 90°



Projet



2005

### Extraction du faisceau, collimation

Le microfaisceau est produit par collimation (30  $\mu\text{m}$ ). L'arrangement optique optimise la densité du faisceau près de la sortie de l'aimant.



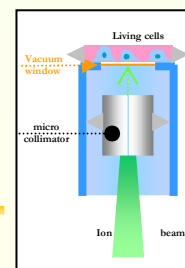
Extraction du faisceau à l'air à travers une fenêtre en mylar.



Installation du microscope à fluorescence.

Platine porte échantillon

- Au dessus de la sortie du faisceau
- Permet déplacements de l'ordre du micromètre,
- Positionne la cellule cible au dessus du collimateur.



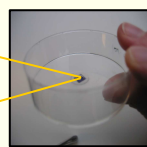
2006

### Collimation, sélection des cibles, protocole d'irradiation

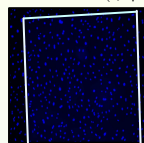
Protocole d'irradiation.



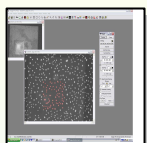
Fenêtre de sortie du faisceau

Support cellulaire: fenêtre  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (2,25 mm<sup>2</sup>)

Repérage des noyaux: Hoechst 33342 (0,1  $\mu\text{M}$ )



Contrôle éclairage UV (&lt;15 s)



Sélection des cibles (Image Pro +)



CR39

Installation collimateur de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre interne. Perte <1% sur cible de 10  $\mu\text{m}$ .

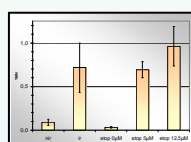
Mise au point des protocoles:

- Immunodétection de cassures double brins ( $\gamma\text{H2AX}$  et 53BP1)
- Détection de cassures de l'ADN (micronoyaux)
- Détection d'espèces réactives de l'oxygène *via* sondes fluorescentes (CM-H<sub>2</sub>DCFDA et Dihydrorhodamine 123)
- Détection du glutathion réduit (sonde CMAM)

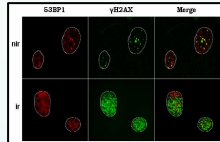
### Validation du système, irradiation de cultures cellulaires

2007

Validation du système.



Numération de micronoyaux.



Détection de cassures doubles brins.

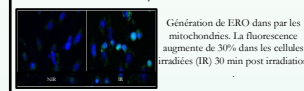
Installation d'un moteur Piezo électrique: contrôle déplacements collimateur. Rapidité d'irradiation.



Installation d'un incubateur *in situ*. Contrôle de température, d'hygrométrie et de CO<sub>2</sub>. Optimisation des conditions de culture cellulaire, environnement non stressant.

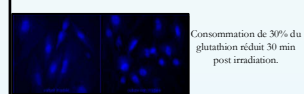


Détection Dihydrorhodamine 123



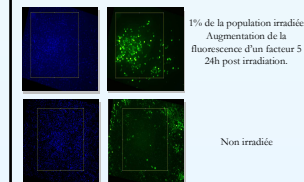
Génération d'ERO dans par les mitochondries. La fluorescence augmente de 30% dans les cellules irradiées (IR) 30 min post irradiation.

Détection du Glutathion réduit



Consommation de 30% du glutathion réduit 30 min post irradiation.

Détection CM-H<sub>2</sub>DCFDA



1% de la population irradiée. Augmentation de la fluorescence d'un facteur 5 24h post irradiation.

Non irradiée