



HAL
open science

Analyse des effets directs de rayonnements ionisants à différents TELs dans un modèle expérimental in vitro de cartilage humain sain et pathologique

Dounia Hamdi

► **To cite this version:**

Dounia Hamdi. Analyse des effets directs de rayonnements ionisants à différents TELs dans un modèle expérimental in vitro de cartilage humain sain et pathologique. Cancer. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS047 . tel-01306286

HAL Id: tel-01306286

<https://theses.hal.science/tel-01306286>

Submitted on 22 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS047

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N°582
Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaire de la biologie

Par

Mme Dounia Houria HAMDI

**ANALYSE DES EFFETS DIRECTS DE RAYONNEMENTS IONISANTS A DIFFERENTS TELS
DANS UN MODELE EXPERIMENTAL *IN VITRO* DE CARTILAGE HUMAIN SAIN ET
PATHOLOGIQUE.**

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Gustave Roussy, le 17 mars
2016 :

Composition du Jury :

Mme. L. Sabatier, DR, CEA, Présidente du Jury
Mme. C. Rodriguez-Lafrasse, PU-PH, Rapporteur
M. G. Noël, PU-PH, Rapporteur
M. N. Fortunel, PhD, HDR, CEA, Examineur
M. J. Guicheux, DR, INSERM, Examineur
M. Y. Saintigny, PhD, HDR, CEA, Directeur de thèse



TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX :	5
LISTE DES ABREVIATIONS :	6
TERMINOLOGIE :	9
AVANT-PROPOS :	11
INTRODUCTION :	13
1) GENERALITES :	13
1.1) <i>Qualité des RIs : TEL et EBR</i> :	14
1.1.1) <i>Transfert d'énergie linéique (TEL)</i> :	15
1.1.2) <i>Efficacité biologique relative (EBR)</i> :	16
1.2) <i>Cibles cellulaires des RIs</i> :	19
2) HADRONTHERAPIE: FOCUS SUR LES IONS CARBONE	23
2.1) <i>Généralités</i> :	23
2.2) <i>Aspects physiques et techniques de l'hadronthérapie</i> :	23
2.2.1) <i>Production des faisceaux : cyclotrons versus synchrotrons</i>	25
2.2.2) <i>Systèmes de modulation de faisceaux</i> :	26
2.3) <i>Aspects biologiques de l'hadronthérapie</i> :	28
2.4) <i>Centres d'hadronthérapie dans le monde</i>	30
2.5) <i>Indications thérapeutiques</i> :	32
3) ÉVOLUTION DES MODELES 3D EN RADIOBIOLOGIE :	34
4) CHONDROSARCOMES :	36
4.1) <i>Classification et localisation des chondrosarcomes</i> :	36
4.2) <i>Approches thérapeutiques dans le traitement des chondrosarcomes</i> :	39
4.3) <i>Expérience clinique de l'utilisation des hadrons dans le traitement des chondrosarcomes</i> :	40
5) CARTILAGE :	43
5.1) <i>Chondrogenèse et homéostasie du cartilage</i> :	45
5.2) <i>Composition du cartilage articulaire mature</i> :	48
5.3) <i>Impact des rayonnements ionisants sur le cartilage articulaire mature</i> :	51
5.4) <i>Ingénierie du cartilage et développement de modèles 3D</i> :	54
5.5) <i>Rôle de l'hypoxie dans l'homéostasie du cartilage et l'ingénierie tissulaire</i> :	55
6) DESCRIPTION ET OBJECTIFS DU PROJET :	57
MATERIELS ET METHODES :	59
1) CULTURE CELLULAIRE :	59
1.1) <i>Culture cellulaire en 2D</i> :	59
1.2) <i>Culture cellulaire en 3D</i> :	60
2) PROTOCOLES D'IRRADIATION :	62
2.1) <i>Irradiation en rayons X (bas TEL)</i> :	62
2.1.1) <i>Description de l'irradiateur X-RAD 225</i> :	62
2.1.2) <i>Description du protocole d'irradiation en 2D et 3D</i> :	63
2.2) <i>Irradiation en ions accélérés</i> :	65
2.1.1) <i>Description de la ligne IRABAT et de sa dosimétrie</i> :	66
2.1.2) <i>Description du protocole d'irradiation en ions accélérés</i> :	68
2.1.3) <i>Simulation de la distribution de TEL dans le modèle 3D</i> :	71
3) TEST DE CLONOGENICITE ET DISTRIBUTION DE TAILLE DE COLONIES :	73
4) ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE (IP ET EDU) :	75

5) MESURE DE L'INDICE DE PROLIFERATION CELLULAIRE :	78
5.1) Immunocytochimie (2D) :	78
5.2) Développement d'un protocole d'immunohistochimie pour les modèles 3D :	79
6) MESURE DE LA RADIOTOXICITE CELLULAIRE DIRECTE (TOXILIGHT™) :	83
7) MESURE DE LA SENESCENCE RADIO-INDUITE :	84
8) MESURE DU STRESS OXYDATIF :	86
9) WESTERN BLOT :	88
9.1) Développement d'un protocole de lyse cellulaire adapté aux modèles 3D :	88
9.2) Dépôt, migration et transfert des gels :	90
10) TESTS STATISTIQUES :	91
CHAPITRE I : MISE AU POINT DES CONDITIONS D'IRRADIATION EN CULTURE 2D	93
1) EFFET OXYGENE SUR LA SURVIE DES CAH ET DE LA LIGNEE SW1353 APRES UNE IRRADIATION EN RX (BAS TEL) : 93	
2) VARIABILITE INTERINDIVIDUELLE DE LA RADIOSENSIBILITE DES CAH APRES IRRADIATION EN RX (BAS TEL) : ...	97
3) DISCUSSION :	100
CHAPITRE II : EFFETS DES IONS CARBONE (TEL INTERMEDIAIRE) SUR UN MODELE 3D DE CARTILAGE ARTICULAIRE	101
1) RESULTATS :	102
1.1) Survie et prolifération post-irradiation des CAH en culture 2D:	102
1.2) Morts cellulaires post-irradiation des CAH en culture 2D :	106
1.3) Prolifération et morts cellulaires post-irradiation en culture 3D :	109
1.4) Sénescence radio-induite en culture 3D :	113
2) DISCUSSION :	115
CHAPITRE III : EFFETS DES IONS ACCELERES SUR LES CHONDROSARCOMES.....	119
1) EFFETS DES IONS CARBONE (TEL INTERMEDIAIRE) SUR UNE LIGNEE DE CHONDROSARCOME EN CULTURE 2D : ...	119
1.1) Résultats :	119
1.1.1) Survie et prolifération de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL vs TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :	119
1.1.2) Analyse par western blot de protéines d'intérêt dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :	123
1.1.3) Induction de stress oxydatif dans lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :	125
1.1.4) Morts cellulaires dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL vs TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :	126
1.2) Discussion :	128
2) MISE AU POINT D'UN MODELE 3D DE CHONDROSARCOME APPLIQUE A DES ETUDES D'HADRONBIOLOGIE :	132
2.1) Caractérisation cellulaire du modèle :	133
2.2) Irradiations et distribution du TEL dans le modèle :	135
2.3) Survie et prolifération post-irradiation :	137
2.4) Cinétique de réparation des dommages à l'ADN (γ -H ₂ AX) :	139
DISCUSSION GENERALE :	143
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	151
ANNEXE : FIGURES SUPPLEMENTAIRES.....	163
Liste de publications.....	167

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification des rayonnements ionisants	13
Figure 2: Structure microscopique du trajet d'un faisceau de proton versus ions carbone de différentes énergies	16
Figure 3: Courbes de survie pour des photons (bas TEL) et des ions lourds (haut TEL) et détermination de l'EBR.....	17
Figure 4: Compilation de données d'EBR en fonction du TEL et de la particule utilisée.....	19
Figure 5: Morts cellulaires radio-induites	22
Figure 6: Courbes de rendement en profondeur: photons, protons et ions carbone	24
Figure 7: Effet biologique relatif: photons, protons et ions carbone	25
Figure 8: Principe d'un système passif (A) et actif (B) de modulation de faisceau d'hadron	27
Figure 9: Uniformité de la dose biologique dans le SOBP d'un faisceau de proton (gauche) et d'ions carbone (droite) ..	29
Figure 10: Exemple de centre dédié entièrement à l'hadronthérapie (HIT)	31
Figure 11: Développement de tumeurs cartilagineuses bénignes et leur évolution en chondrosarcome	38
Figure 12: Localisation des différents types de cartilage dans le corps humain	44
Figure 13: Ossification endochondrale.....	45
Figure 14: Différentes étapes de la chondrogenèse	46
Figure 15: Composition du cartilage articulaire mature.	49
Figure 16: Image en microscopie électronique de l'éponge de collagène vide (A) ou colonisée par des chondrocytes articulaires arthrosiques(B)	61
Figure 17: Configuration interne de l'irradiateur X-RAD 225 Cx montrant le plateau d'irradiation en position intermédiaire ainsi que le collimateur.....	63
Figure 18: Schéma récapitulatif de la configuration d'irradiation en flasque 2D (droite) et modèles 3D (à gauche) en bas TEL.....	64
Figure 19: Schéma des différentes composantes du GANIL.....	65
Figure 20: Schéma de la ligne haute énergie IRABAT utilisée pour les expériences de radiobiologie	67
Figure 21: Schéma de la configuration de l'irradiation au GANIL.....	69
Figure 22: Photo du porteur d'échantillon robotisé en position d'origine (ligne IRABAT).....	70
Figure 23: Capture d'écran de poste de contrôle : écran principal (à gauche) et passeur d'échantillon en position H6..	71
Figure 24: Géométrie du tube en polypropylène et de l'éponge, utilisée pour les simulations sous PHITS et FLUKA	72
Figure 25: Réaction d'addition (click-it) entre EdU et un azide-fluorochrome	75
Figure 26: Protocole de marquage à l'EdU et/ou à l'IP pour analyse du cycle cellulaire	76
Figure 27: Cytomètre en flux GALLIOS (BIOTICLA, Caen).....	77
Figure 28: Analyse du cycle cellulaire par FlowJo. Exemple des SW1353 (6h après ré-ensemencement)	77
Figure 29: Marquage anti-Ki67 dans les SW1353 (A) et les CAH (B).....	79
Figure 30: Résultat de l'IHC-p en mode automatique sur une coupe au microtome du M3DC.....	81
Figure 31: Protocole d'immunohistochimie-p (imprégnation et coupes au microtome).....	81
Figure 32: Protocole de coloration Ki-67 sur lames blanches (paraffine).....	82
Figure 33: Lecteur de plaque Flexstation (UCBN, Caen).....	84
Figure 34: coloration SA- β -gal des CAH non irradiés.....	85
Figure 35: Structure chimique de la sonde CM-H2DCFDA.....	86
Figure 36: Analyse du stress oxydatif par la sonde CM-H2DCFDA.	87
Figure 37: Western blot réalisé sur les M3DC à J4 et J7 de culture.	90
Figure 38: Etude de la prolifération dans les CAH (D1) et la lignée SW1353 en culture 2D normoxique et physioxique.	94
Figure 39: Courbes de survie des CAH (D1) et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL) en culture 2D normoxique et physioxique	94
Figure 40: Analyse de la distribution de taille de colonies des CAH et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL, 2 Gy) en culture 2D physioxique et normoxique	96
Figure 41: Etude de la prolifération des CAH (D1, D2) en culture 2D physioxique	97
Figure 42: Courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL) en culture 2D physioxique	98
Figure 43: Analyse de la distribution de taille de colonies des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL, 2 Gy) en culture 2D physioxique	99

Figure 44: Courbes de survie des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	103
Figure 45: Etude de la prolifération des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	105
Figure 46: Etude de la mort cellulaire des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	107
Figure 47: Etude de la sénescence et du stress oxydatif des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	108
Figure 48: Re-différenciation chondrocytaire dans le M3DCa	109
Figure 49: Distribution de TEL dans le M3DCa	111
Figure 50: Prolifération et morts cellulaires dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire).....	113
Figure 51: Analyse qualitative de l'expression protéique dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire)	114
Figure 52: Mesure de la sénescence dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire)	115
Figure 53: Courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	120
Figure 54: Etude de la prolifération dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	122
Figure 55: Analyse par western blot des protéines γ -H2AX, p21 et pp53 dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique.....	124
Figure 56: Analyse par western blot des protéines γ -H2AX, p21 et pp53 dans la lignée SW1353 post-irradiation (haut TEL) en culture 2D physioxique	125
Figure 57: Analyse du stress oxydatif par la sonde CM-H2DCFDA dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D	126
Figure 58: Analyse de la mort cellulaire et de la sénescence dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	128
Figure 59: Analyse de la taille et de la granulosité dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique	131
Figure 60: Distribution cellulaire de la lignée SW1353 dans le M3DC.....	134
Figure 61: Distribution de TEL dans la partie proximale et distale du M3DC	136
Figure 62: Analyse de la nécrose dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs).....	138
Figure 63: Cinétique de réparation γ -H2AX dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs)	140
Figure 64: Cinétique de réparation γ -H2AX dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas et haut TELs) en culture 2D physioxique	141
Figure 65: Modèle de sénescence radio-induite dans le M3DCa	146
Figure suppl 1: Analyse du cycle cellulaire des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique (marquage EdU)	163
Figure suppl 2: Analyse western blot dans les M3DCa.....	164
Figure suppl 3: Analyse du cycle cellulaire dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique (marquage EdU).....	165

LISTE DES TABLEAUX :

<i>Tableau 1: Liste des centres d'hadronthérapie par ions carbone dans le monde.....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 2: Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des chondrosarcomes.....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 3: Récapitulatif de l'expérience clinique en hadronthérapie : focus sur les chondrosarcomes</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 4: Milieux de culture utilisés et leur composition</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 5: Liste des temps des faisceaux alloués par les comités iPAC et France Hadron dans le cadre de ce projet.....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 6: Paramètres déterminés à partir des courbes de survie</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 7: composition de la solution de coloration pour l'essai SA-β-gal</i>	<i>85</i>
<i>Tableau 8: Liste des anticorps utilisés dans le cadre de ce projet</i>	<i>91</i>
<i>Tableau 9: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1) et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL) en culture 2D normoxique et physioxique.....</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 10: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL) en culture 2D physioxique.....</i>	<i>98</i>
<i>Tableau 11: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique</i>	<i>104</i>
<i>Tableau 12: Caractéristiques des courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 13: Evaluation de la variabilité intra-individuelle de comptage de l'index Ki-67.....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau 14: Distribution de TEL des ions ^{18}O (50 MeV/A) dans le M3DC.....</i>	<i>135</i>
<i>Tableau 15: Caractéristiques des courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas et haut TELs) en culture 2D physioxique</i>	<i>137</i>
<i>Tableau 16: Indice de prolifération Ki-67 dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs).....</i>	<i>139</i>

LISTE DES ABREVIATIONS :

2D : Culture en 2 Dimensions

3D : Culture en 3 Dimensions

ADN : Acide Désoxy-riboNucléique

AK : Adénylate Kinase

ARCHADE: *Advanced Resource Centre for Hadrontherapy in Europe*

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated kinase*

ATR: *ATM and Rad3-related kinase*

BMP-2 : *Bone Morphogenic Protein-2*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CAH : Chondrocytes Articulaires Humains

CDBs : Cassures Double Brin de l'ADN

CH : Chordome

CHS : Chondrosarcome

C-ion : Hadronthérapie par ions carbone

CL : Contrôle Local

COX-2 : Cyclo-OXYgénase 2

CSBs : Cassures Simple Brin de l'ADN

CSMs : Cellules Souches Méenchymateuses

D₁₀ : Dose (Gy) correspondant à 10% de survie

D₃₇ : Dose (Gy) correspondant à 37% de survie

DAB : DiAminoBenzidine

DDR: *DNA Damage Response*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EBR : Efficacité Biologique Relative

ECL : Electro-ChimiLuminescence

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra-Acétate

EdU : 5-Ethynyl-2'-DeoxyUridine

E_{EBR} : Evaluation de l'Efficacité Biologique Relative

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FLUKA : *FLUktuierende KAskade*

FS₂ : Fraction Survivante à 2 Gy

GAG : GlycosAminoGlycane

GAPDH : Glycéraldéhyde-3 Phosphate DésHydrogénase

GH : *Growth Hormone*

GP: GlycoProtéine

GSI : *Gesellschaft für Schwerionenforschung*

HES : Hématoxyline-Eosine-Safran

HIF: *Hypoxia-Inducible Factor*

HIMAC : *Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba*

HIT : *Heidelberg Ion Therapy Centre*

HR : *Homologous Recombination*

HRE : *Hypoxia Responsive Elements*

HRP : *Horseradish Peroxidase*

IGF : *Insulin Growth Factor*

IHC-p: ImmunoHistoChimie-paraffine

Ihh : Indian HedgHog

IP : Iodure de Propidium

IRABAT: Irradiation Basse Température

M3DC : Modèle 3D de Chondrosarcome

M3DCa : Modèle 3D de Cartilage

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MMP: *Matrix MetalloProteinase*

NHEJ : *Non Homologous End Joining*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PBT: PBS-Tween 20

PE: *Plating Efficiency*

PFA : ParaFormAldéhyde

PG : ProtéoGlycane

PHITS : *Particle and Heavy ion Transport code System*

Ph-RT : Photonthérapie

p-RT : Protonthérapie

PTHrP: *ParaThyroid Hormone-related Peptide*

RI : Rayonnement Ionisant

RLU : *Relative Light Unit*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RT : RadioThérapie

RX : Rayons X

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

SG: Survie Globale

Shh: Sonic HedgHog

SOBP : *Spread-Out Bragg peak*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBS : *Tris-Buffered Saline*

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

TGF : *Transforming Growth Factor*

T-PER : *Tissue Protein Extraction Reagent*

TPS : *Treatment Planning System*

TTBS : TBS-Tween 20

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

TERMINOLOGIE :

Contrôle local (CL) : Mise en rémission de la maladie sur son site primitif.

Dose (dose physique) : Quotient de l'énergie déposée par le rayonnement ionisant (RI) dans une masse de matière. L'unité, le gray (Gy), correspond à une énergie absorbée de 1 joule par kilogramme.

Dose biologique équivalente: Dose physique délivrée corrigée par un facteur d'efficacité biologique. Dans le cas de la radiothérapie par ions lourds, l'unité GyE (*Gray Equivalent*) a été longtemps utilisée. Par ailleurs, la communauté de protonthérapie utilise encore le CGE (*Cobalt Gray Equivalent*), qui se réfère à une dose qui est cliniquement isoeffective au ^{60}Co , anciennement le rayonnement le plus couramment utilisé en radiothérapie. La commission ICRU ou *International Commission on Radiation Units and Measurements* a récemment proposé de remplacer cette unité par le Gy(RBE) sachant que : $D_{\text{RBE}(V)} = \text{RBE} * D_V$. Le volume V doit être spécifié (par exemple le volume de la tumeur).

Efficacité biologique relative (EBR): Rapport de la dose d'un rayonnement de référence (rayons X, rayonnement γ du ^{60}Co) à la dose physique du rayonnement étudié produisant un même effet biologique.

Fractionnement : Paramètre utilisé en radiothérapie : nombre de séances par jour et par semaine de la radiothérapie.

Hadrons : Terme venant du grec qui signifie « fort ». Un hadron est un composé de particules subatomiques régi par l'interaction forte comme les protons, les ions, et les neutrons. Dans ce manuscrit, nous n'aborderons que le cas des protons et des ions lourds dont les ions carbone.

Survie globale (SG) : pourcentage de patients dans une étude ou un groupe de traitement qui ne sont pas décédés dans une période de temps définie.

Transfert d'énergie linéique (TEL) : Le TEL d'une particule chargée dans un milieu donné correspond au ratio dE/dl , où dE représente l'énergie moyenne déposée par la particule qui traverse une distance dl dans ce milieu défini. Le TEL est souvent exprimé en keV/ μm . Pour les besoins de ce travail, nous avons classé les rayonnements ionisants en trois classes de TELs : Bas TEL ($< 1 \text{ keV}/\mu\text{m}$), TEL intermédiaire ($\sim 33 \text{ keV}/\mu\text{m}$) et haut TEL ($\sim 70\text{-}80 \text{ keV}/\mu\text{m}$).

Toxicité ou séquelles de la radiothérapie: Les effets secondaires peuvent être variés suivant la localisation de l'irradiation. On distingue la toxicité aiguë (< 6 mois post-traitement) qui touche les tissus à renouvellement rapide (peau, muqueuses, moelle osseuse) et la toxicité tardive (> 6 mois post-traitement) qui regroupe les effets secondaires irréversibles et touche essentiellement les tissus de soutien, avec le développement d'une fibrose. De manière générale les toxicités de grade > 3 sont considérées comme sévères.

AVANT-PROPOS :

L'hadronthérapie est une technique de radiothérapie (RT) externe, apparue durant la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, qui utilise des particules accélérées appelées « hadrons ». Ces derniers possèdent des propriétés physiques avantageuses parmi lesquelles un dépôt d'énergie maximal en fin de parcours sous forme d'un fin pic appelé « pic de Bragg ». Cette propriété permet de délivrer le maximum d'énergie au niveau du volume tumoral et minimiser la dose dans les tissus sains environnants (Durante, 2014). De ce fait, à la différence des photons (rayonnement électromagnétique), les hadrons ont une meilleure balistique. Par ailleurs, les ions lourds, type d'hadron, ont un Transfert d'Énergie Linéique (TEL) plus élevé. Les rayonnements de haut TEL ont une capacité d'ionisation locale plus élevée ce qui augmente la toxicité cellulaire. Ainsi, la RT utilisant des ions lourds représente une modalité de traitement alternative très attractive qui pourrait réduire la fréquence et la sévérité des effets secondaires de la RT et augmenter l'efficacité thérapeutique dans le cas des cancers radorésistants. Le principe d'utilisation du dépôt d'énergie spécifique des hadrons dans le traitement du cancer fut initialement décrit par Sir Robert Wilson (Wilson, 1946). Les premiers patients furent traités par cette technique en 1954 aux Etats-Unis (*Radiation Laboratory, Berkeley*). Pendant plusieurs décennies, l'hadronthérapie fut limitée à l'adaptation de salles de traitement dans des centres de recherche en physique nucléaire. Les développements technologiques des années 80 autorisèrent la conception d'accélérateurs plus compacts compatibles avec une utilisation en routine clinique. Si l'hadronthérapie par proton (protonthérapie ou p-RT) connut rapidement un succès mondial en particulier aux Etats-Unis, l'hadronthérapie par ions carbone resta longtemps limitée géographiquement au Japon avant de connaître une timide et récente diffusion en Europe.

Les chondrosarcomes (CHSs), tumeurs osseuses à différenciation cartilagineuse, ont été placés en première ligne pour le traitement par ions carbone (type d'ion lourd). En contraste avec des résultats cliniques prometteurs, l'hadronbiologie du cartilage sain et des CHS est quasi-inexistante (Saintigny et al., 2015). Ces aspects fondamentaux sont pourtant un préalable incontournable afin de valider l'utilisation clinique des hadrons en passant par la modélisation des effets biologiques, ainsi qu'à la réalisation de logiciels de calcul ou TPS (*Treatment Planing System*) pertinents, afin d'assurer la sécurité des patients. En effet, les concepts des protocoles de RT sont en général basés sur les courbes de survie de chaque tissu comme référence biologique (10% de survie), ce qui permet de calculer une Efficacité Biologique Relative (EBR) d'un type de rayonnement comparé à un rayonnement de référence (rayons X ou RX, rayonnement γ du ^{60}Co). De tels systèmes de calcul restent donc encore trop réducteurs à l'aune des effets biologiques radio-induits et conduisent parfois à l'émergence d'importantes séquelles tardives chez le patient. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux modèles pertinents d'exposition des tissus sains et des tumeurs durant un protocole d'hadronthérapie afin de proposer de nouvelles méthodes de calcul d'EBR (Loeffler and Durante, 2013). En France, le GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) est la seule structure proposant l'utilisation d'ions accélérés pour la biologie. Cependant, il n'est pas possible d'y effectuer des expérimentations animales.

Les modèles cellulaires en culture en 3 dimensions (3D), utilisés en radiobiologie depuis une dizaine d'années, sont une alternative pertinente pour pallier ce manque. En effet, la culture en 3D permet de recréer le microenvironnement naturel des cellules (interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, transport de nutriments,...etc). Le cartilage et le CHS présentent des caractéristiques attrayantes pour l'ingénierie tissulaire en 3D, à savoir, la faible vascularisation, la présence d'un seul type cellulaire en faible proportion par opposition à une dense Matrice ExtraCellulaire (MEC).

Le but de ce projet de thèse (détaillé en page 57) a été de développer de nouvelles stratégies expérimentales en culture 3D afin d'étudier la dépendance des réponses biologiques au TEL dans un contexte d'hadronthérapie par ions carbone en choisissant comme modèle d'étude les CHSs et leur tissu sain de référence, le cartilage.

INTRODUCTION :

1) Généralités :

La radiobiologie est une science interdisciplinaire qui étudie les effets (physiques et biologiques) des rayonnements sur le vivant. Les rayonnements ionisants peuvent être classés en fonction de leur nature (Figure 1) en particules chargées (α , β , proton, ions) ou particules neutres (neutrons, pions) ou encore en ondes électromagnétiques formées de paquets d'énergies appelés photons (RX ou rayons γ) (Tubiana et al., 2008).

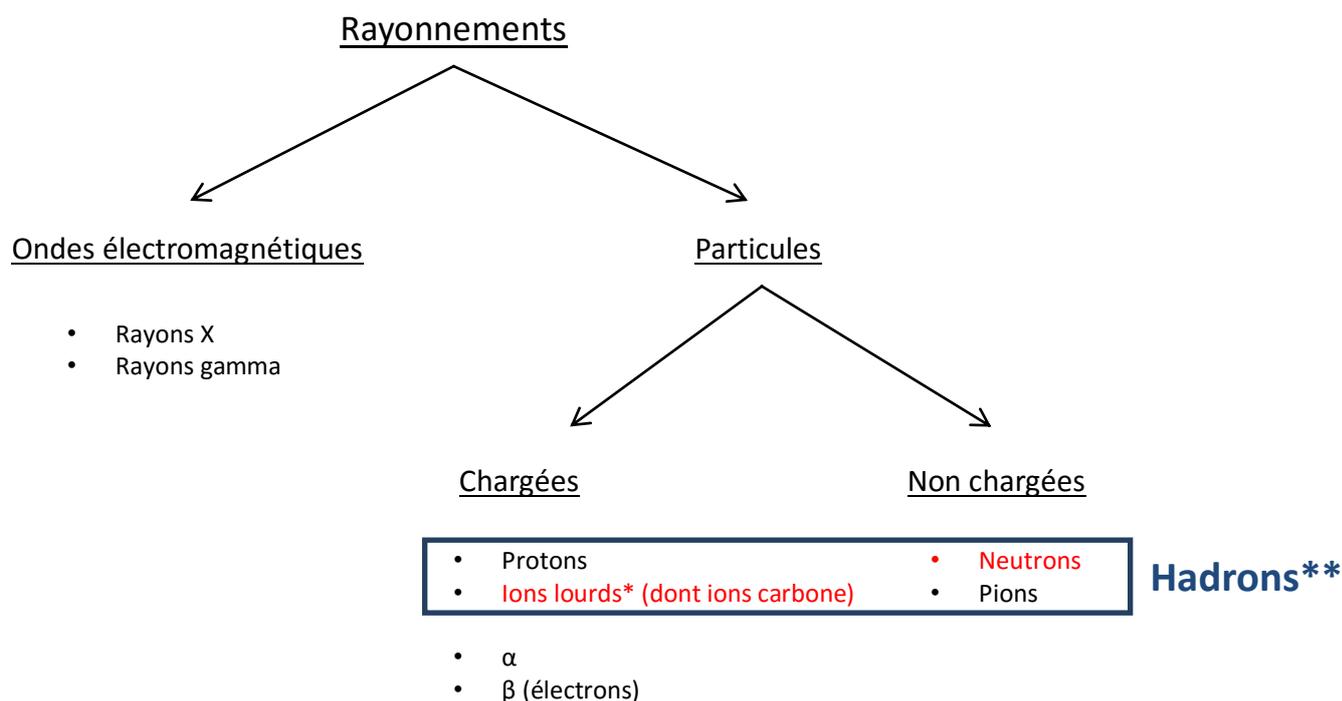


Figure 1: Classification des rayonnements ionisants

* Ions plus lourds que l'hélium ^4He . En médecine, les ions carbone ^{12}C sont considérés comme lourds comparés à des photons, électrons ou protons. Par contre, du point de la physique qui étudie les noyaux atomiques de l'ensemble du tableau périodique, l'ion carbone ^{12}C est considéré comme un ion léger.

**En principe, l'hadronthérapie comprend l'utilisation de protons, ions lourds (plus lourds que l'hélium), mais aussi celle de neutrons et de pions. Cependant, dans ce manuscrit, nous avons choisi d'utiliser le terme hadron pour désigner les protons et les ions lourds (dont les ions carbone).

Comparés à d'autres types de rayonnements comme les ultraviolets, les rayonnements ionisants (RIs) déposent relativement une grande quantité d'énergie dans un petit volume de matière. Leurs interactions avec la matière induisent une perte progressive d'énergie par le biais de deux processus ; l'excitation et l'ionisation. Sur la base de cette propriété, les RIs peuvent être classés en :

- Rayonnements directement ionisants : particules chargées capables d'arracher des électrons des atomes et donc induire leur ionisation.
- Rayonnements indirectement ionisants : non chargés (photons, neutrons) capables de libérer une énergie suffisante pour exciter un électron. Ce dernier passe à une orbite électronique supérieure (sans être expulsé de l'atome) et peut ioniser la matière.

Le dépôt d'énergie des RIs dans la matière induit une série d'altérations au niveau de la cible cellulaire, sur les plans physiques et chimiques. Ces événements se déroulent de manière séquentielle dans le temps :

- Étape physique (~ fs-ps) : interaction rayonnement/matière et dépôt d'énergie qui induit une excitation ou une ionisation.
- Étape physico-chimique (~ ps- μ s) : l'énergie est déposée au niveau des molécules autres que l'ADN (Acide Désoxy-riboNucléique), principalement l'eau, qui vont libérer à leur tour l'énergie (sous forme d'énergie électromagnétique) ou se dissocier et produire des radicaux libres (radical OH ou radical H)
- Étape chimique ou biochimique (~ μ s-ms) : caractérisée par la diffusion et l'interaction des espèces radicalaires produites plus tôt ce qui induit des dommages cellulaires.
- Étape biologique : débute quelques secondes après l'irradiation et dont les conséquences peuvent apparaître plusieurs années plus tard. Elle comprend les dommages à l'ADN, les aberrations chromosomiques qui peuvent aboutir à la mort cellulaire ou des mutations génétiques. A l'échelle de l'individu, ces modifications cellulaires peuvent aboutir à un processus néoplasique ou des mutations transmissibles à la génération suivante.

Parmi les composants cellulaires, l'ADN est considéré comme la cible moléculaire principale des RIs. Des dommages permanents à l'ADN peuvent avoir des conséquences cellulaires létales. Les RIs peuvent exciter ou ioniser la molécule d'ADN de manière directe ou indirecte, par le biais d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) produits durant l'étape physico-chimique. Ces ROS peuvent se recombinaison pour former des composants toxiques (comme le peroxyde d'hydrogène) et/ou interagir avec l'ADN (ou tout autre molécule, organelle, membrane cellulaire à proximité). La formation et réparation des dommages à l'ADN est détaillée en page 19.

Les effets biologiques des RIs dépendent de la nature du rayonnement ainsi que de la cible moléculaire touchée.

1.1) Qualité des RIs : TEL et EBR :

En fonction de la nature du rayonnement, différentes particules peuvent être produites. Ces dernières pourront exciter ou ioniser de nouvelles particules le long du trajet. La distribution spatiale de ces phénomènes d'excitation/ionisation détermine la réponse de la cible moléculaire. La notion de transfert d'énergie linéique

(TEL) est très importante en hadronthérapie car elle permet d'expliquer la meilleure efficacité biologique des ions lourds accélérés et sert à l'établissement des protocoles de RT.

1.1.1) Transfert d'énergie linéique (TEL) :

Le transfert d'énergie linéique d'une particule chargée dans un milieu donné correspond au ratio dE/dl , où dE représente l'énergie moyenne déposée par la particule qui traverse une distance dl dans ce milieu défini (Tubiana et al., 2008). Le TEL est souvent exprimé en $keV/\mu m$, l'eV étant l'énergie acquise par un électron accéléré depuis le repos par une différence de potentiel d'un volt ($1 eV = 1,60217653 \times 10^{-19}$ joule).

Cette valeur du TEL est une quantité moyennée car à l'échelle microscopique, le dépôt d'énergie peut varier le long du trajet d'une particule. Le TEL reflète et permet de quantifier la densité d'ionisation d'une particule donnée d'énergie connue, et de ce fait, la capacité à produire des dommages biologiques. En radiobiologie, les RIs sont classés en rayonnement de bas TEL (quelques $keV/\mu m$) à faible densité d'ionisation et rayonnement de haut TEL (vingtaine jusqu'à plusieurs centaines de $keV/\mu m$) dont la densité d'ionisation est élevée le long du trajet. Cette valeur est **proportionnelle au carré de la charge** de la particule incidente et **inversement proportionnelle au carré de sa vitesse**.

A titre d'exemple, la Figure 2 représente la structure microscopique du trajet d'une particule de proton ou d'ions carbone à différentes énergies. Plus l'énergie est faible, plus le trajet devient de plus en plus compact et dense impliquant un plus grand dépôt d'énergie par unité de distance. Ainsi, l'efficacité d'induction de dommages à l'ADN dits en « cluster » difficiles à réparer est élevée. Les protons et les ions carbone de haute énergie sont des rayonnements de bas TEL. Par contre, les ions carbone de basse énergie sont des rayonnements de haut TEL (forte densité d'ionisation).

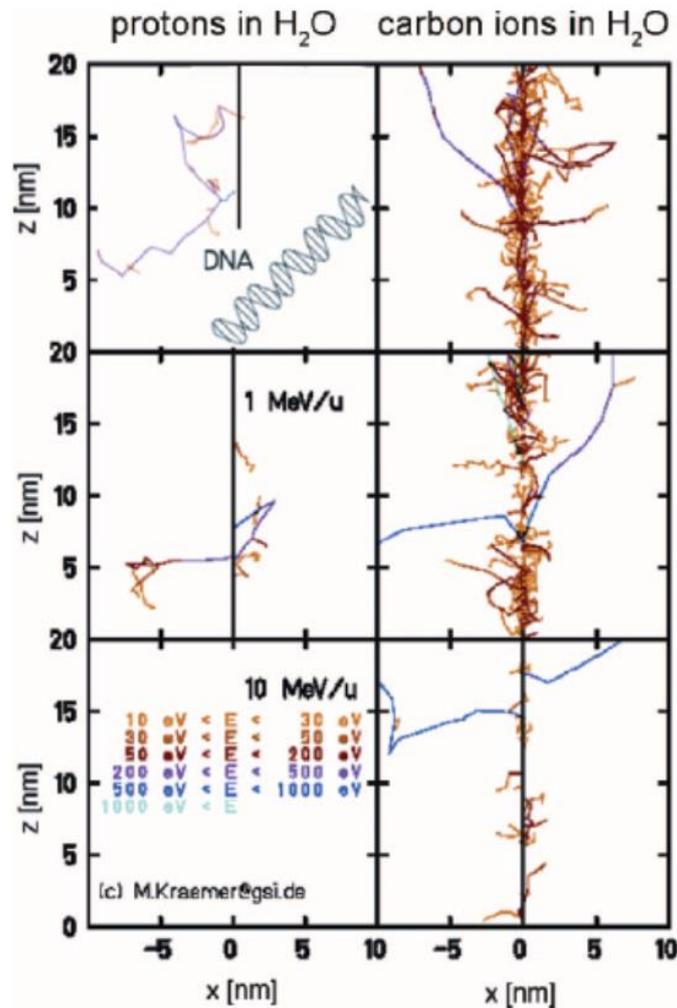


Figure 2: Structure microscopique du trajet d'un faisceau de proton *versus* ions carbone de différentes énergies
(Weber and Kraft, 2009)

La notion de TEL et la densité d'ionisation de l'ADN qui en découle permet d'introduire le concept d'efficacité biologique relative (EBR) très utilisée en hadronthérapie.

1.1.2) Efficacité biologique relative (EBR) :

La Dose absorbée (D) en un point du milieu traversé par le RI est le ratio dE/dm où dE est la quantité d'énergie que le rayonnement traversant le milieu dépose au voisinage de ce point et dm la masse de ce milieu ($dm = \rho \cdot dV$ où ρ est la densité de milieu et dV le volume). La dose absorbée est exprimée en joule/Kg ou Gy ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg} = 60 \cdot 10^{17} \text{ eV/Kg}$) et correspond à une dose dite « physique ».

Une même dose physique peut induire différents degrés d'efficacité biologique en fonction du TEL de la particule : plus le TEL augmente, plus la dose nécessaire à produire un même effet biologique est faible. Cette particularité est reflétée par les courbes de survie (clonogénicité ou capacité d'une cellule unique à former un

clone dont la taille est supérieure à une valeur n) dont un exemple est présenté en Figure 3. La méthodologie pour obtenir ces courbes de survie est détaillée en page 73.

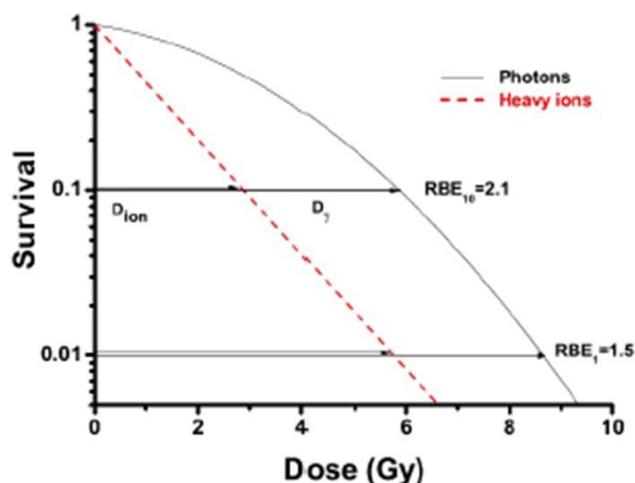


Figure 3: Courbes de survie pour des photons (bas TEL) et des ions lourds (haut TEL) et détermination de l'EBR

Détermination de l'EBR correspondant à 10% et 1% de survie à partir de courbes de survie suite à une irradiation en bas TEL (photons) ou haut TEL (ions lourds) (Schardt et al., 2010).

Les courbes de survie des photons sont caractérisées par un épaulement initial suivi par une courbure et une réduction croissante de la survie dose-dépendante (ce qui est vrai pour des doses allant de 1 à 6 Gy). Quand le TEL augmente, les RIs induisent plus de dommages à l'ADN, l'épaulement initial tend à disparaître jusqu'à ce que la courbe de survie se transforme en droite. Dans le but d'expliquer le comportement cellulaire suite à une irradiation, de nombreux modèles ont été proposés parmi lesquels le modèle linéaire quadratique. Ce dernier est basé sur le postulat que la mort cellulaire radio-induite est régie par deux composants : le premier composant désigné α est proportionnel à la dose et permet d'expliquer l'efficacité à faibles doses. Le deuxième composant β est proportionnel au carré de la dose et représente la contribution croissante des dommages qui résultent de l'interaction d'au moins deux lésions induites par des RIs différents. Ce modèle est décrit par l'équation :

$$-\ln(S) = \alpha D + \beta D^2$$

La valeur S correspond à la fraction de cellules survivantes, D à la dose physique (Gy), α et β à des paramètres dépendant de la nature du RI (Gy^{-1} et Gy^{-2} , respectivement). La forme et l'épaulement de la courbe est déterminé par le ratio α/β qui correspond à la dose à laquelle la contribution linéaire aux dommages équivaut à la contribution quadratique. Ce ratio α/β est utilisé afin d'estimer les effets des rayonnements sur différents tissus et comparer différentes doses et types de fractionnement (Franken et al., 2006). Par ailleurs, pour des rayonnements de haut TEL, le terme βD^2 peut être négligé.

Pour tenir compte de la supériorité biologique des ions, les radiobiologistes ont ainsi introduit une nouvelle quantité appelée EBR (Tubiana et al., 2008). L'EBR de n'importe quel RI « r » est définie comme le ratio de la dose de RX (ou de rayons γ de ^{60}Co) nécessaire à induire un effet biologique sur la dose de « r » nécessaire à produire le même effet.

$$EBRr = Dx/Dr$$

Sur cet exemple (Figure 3), une dose physique de 6 Gy en photons (bas TEL) est nécessaire à réduire la survie de 90%. Par contre, une dose physique d'environ 3 Gy en ions lourds (haut TEL) est suffisante à atteindre le même effet biologique. L'EBR à 10% de survie est donc évaluée à ~ 2 .

L'EBR est un des paramètres les plus importants en hadronbiologie car il sert à calculer la dose délivrée au patient lors d'un traitement d'hadronthérapie. Cependant, l'évaluation de cet EBR est discutable car elle dépend de nombreux paramètres, tels la dose, le débit de dose, la lignée cellulaire, le critère biologique sélectionné et le TEL. La Figure 4 représente une compilation de données d'EBR en fonction du TEL sur la base de courbes de survie en culture en 2 dimensions (2D ou monocouche) : plus le TEL augmente, plus l'EBR augmente jusqu'à atteindre un maximum autour de 100 keV/ μm . Cette valeur est considérée comme le TEL optimal pour induire des effets biologiques car la distance moyenne entre deux ionisations est estimée à ~ 2 nm, ce qui correspond exactement à la distance entre les deux brins d'ADN. Ceci maximise les chances d'induction de Cassures Double Brin de l'ADN ou CDBs (voir plus loin en page 19). Par ailleurs, les RIs de bas TEL sont moins efficaces biologiquement car plus de particules doivent traverser l'ADN afin de déposer l'énergie nécessaire à induire le même nombre de CDBs. Pour des RIs de TEL supérieur à 100 keV/ μm , l'EBR décroît progressivement en raison d'un phénomène appelé « overkill ». Une énergie excessive est délivrée à la cellule sans pour autant augmenter l'effet sur la double hélice d'ADN.

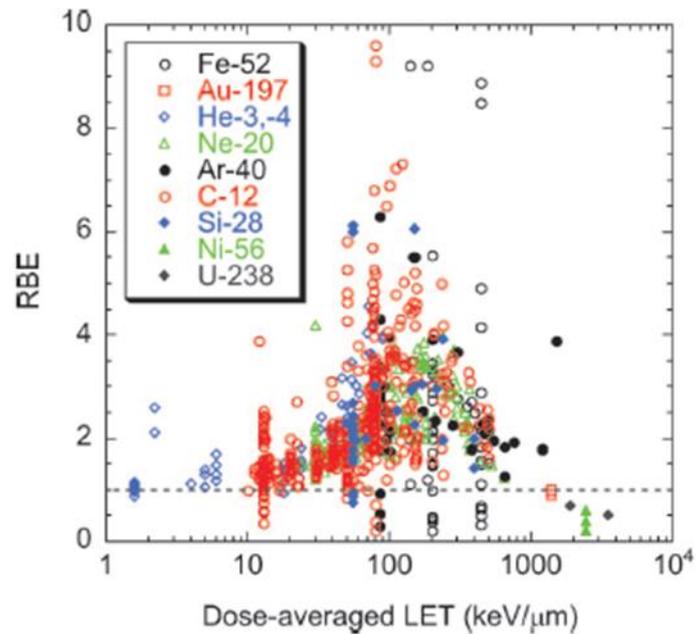


Figure 4: Compilation de données d'EBR en fonction du TEL et de la particule utilisée

(Ando and Kase, 2009)

L'EBR permet de comparer l'effet différentiel de plusieurs types de RIs ou plusieurs énergies en sélectionnant un critère biologique (clonogénicité ou autre phénomène comme la mort cellulaire).

1.2) Cibles cellulaires des RIs :

Les rayonnements ionisants induisent, de façon dose-dépendante, jusqu'à un certain seuil, la mort cellulaire, des dommages à l'ADN, des perturbations de la physiologie et de la différenciation cellulaires, et peuvent provoquer la sénescence ou initier une préneoplasie. En fonction de la dose, le rayonnement induit des aberrations chromosomiques et une altération de la synthèse d'ADN (Belli et al., 2002). La réponse cellulaire immédiate est la stimulation de la machinerie de réparation de l'ADN et l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire (*checkpoint*). Ceci bloque de façon temporaire le cycle cellulaire lors des transitions entre les phases G1, S et/ou G2/M afin de permettre la réparation des dommages. En fonction de l'efficacité de réparation, la cellule reprend son fonctionnement normal ou enclenchera des processus d'apoptose, de différenciation ou de sénescence.

Les hadrons induisent des dommages à l'ADN qui sont plus denses et plus difficiles à réparer que des rayonnements de bas TEL. Ceci aboutit à une plus grande toxicité cellulaire (Ando and Kase, 2009) et possiblement des mécanismes différentiels de mort et de modification du métabolisme.

Formation et réparation des lésions de l'ADN :

Le métabolisme cellulaire même à l'état basal produit une quantité significative de ROS qui induisent des modifications des bases de l'ADN et des cassures simple brin de la double hélice d'ADN (CSBs). Les CDBs consistent en deux ou plusieurs CSBs localisées face à face sur les deux brins d'ADN ou séparés par moins de 10 bases. Les CDBs produites lors du métabolisme basal d'une cellule sont distribuées de manière uniforme le long de la molécule d'ADN à la différence des dommages produits par les RIs. En effet, même à faibles doses, les RIs déposent de l'énergie de manière aléatoire et inhomogène ce qui induit la formation de CDBs complexes et localisées. On parle alors de « cluster » de dommages (Thompson, 2012).

Différents types de dommages peuvent être induits par les RIs au niveau de la molécule d'ADN :

- Modification de base ou mésappariement
- Pontage entre deux bases d'ADN (intra-brin ou inter-brin)
- Modification de nucléotide ou de nucléoside
- CSBs
- CDBs

Le DDR ou *DNA damage response* est un système complexe et coordonné formé de plusieurs voies de signalisation qui permettent de détecter et réparer les dommages à l'ADN. Le devenir cellulaire (vie ou mort) dépend de l'efficacité de ce système (Thompson, 2012).

Les CDBs peuvent être réparées par principalement par deux voies : la recombinaison homologue (HR pour *Homologous Recombination*) ou la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour *Non Homologous End Joining*). Ces deux voies diffèrent à plusieurs niveaux : les protéines impliquées, la phase du cycle cellulaire où elles agissent de façon prédominante ainsi que leur vitesse et leur fidélité. En effet, la voie HR utilise un brin d'ADN homologue (de la chromatide sœur par exemple) non endommagé comme modèle ce qui rend la réparation fidèle. Cette voie de réparation est présente uniquement durant les phases S et G₂ et M. Elle est surtout efficace pendant les phases post-répliquatives. De plus, la voie NHEJ passe par la ligature de deux extrémités doubles brin de l'ADN sans utiliser de substrat. Elle peut être retrouvée dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire. Elle est plus rapide mais ne permet pas de maintenir la fidélité de l'information génétique. Bien qu'elle induise des mutations génétiques (petites insertions ou délétions au niveau du site de cassure), la voie NHEJ permet de maintenir la survie cellulaire car une faible fraction de l'ADN génomique est codante.

La majorité des CDBs induites par RX est réparée par la voie NHEJ qui est le mode de prédilection de la réparation en phase G₀/G₁. Lorsque des cellules sont irradiées en phases S ou G₂, de longs segments d'ADN simple brin sont formés et recouverts de RPA (*Replication Protein A*) qui pourrait représenter un unique

« scaffold » pour le recrutement de facteurs comme Rad51 et BRCA1 (*Breast Cancer*) également impliqués dans les processus de réparation. La radiosensibilité dépend de l'intégrité des systèmes de détection et de réparation des lésions de l'ADN impliquant notamment ATR (*ATM and Rad3-related kinase*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated kinase*) et DNA-PK. La réponse ATR dépendante est généralement associée aux lésions de l'ADN induites par des stress répliatifs (stress oxydatif). ATM est généralement impliquée dans l'induction des systèmes de réparation, l'arrêt du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose radio-induite, alors que DNA-PK joue un rôle important dans le processus de réparation des CDBs par NHEJ (Thompson, 2012).

Quand les mécanismes de réparation de l'ADN sont efficaces, les fonctions cellulaires sont maintenues. Cependant, quand les dommages ne sont pas réparés correctement, des mutations génétiques ou la mort cellulaire se produisent. L'efficacité de ce système dépend de nombreux facteurs comme la dose, le débit de dose ou la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation. A titre d'exemple, si le système est dépassé par de fortes doses d'irradiation, la cellule active des voies induisant la mort cellulaire. L'utilisation des RIs en RT se base sur cette propriété qu'ont ces rayonnements à induire un ou plusieurs types de morts cellulaires au niveau des cellules tumorales qui ont un plus fort pouvoir prolifératif que les cellules normales.

Morts cellulaires radio-induites :

La Figure 5 résume les principales voies de morts cellulaires potentiellement induites par les RIs. En fonction de la dose et de la radiosensibilité des cellules exposées, les RIs peuvent induire la mort cellulaire (à travers l'apoptose ou la nécrose) ou accélérer la sénescence cellulaire (Panganiban et al., 2013).

La surexpression de p53, couplée à diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou acétylation), est une étape critique dans la régulation de la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN radio-induites. La sénescence accélérée peut résulter de l'activation p53-dépendante de la voie p21/WAF1 ou d'autres protéines inhibitrices du cycle cellulaire comme p16^{INK4a} (Rodier and Campisi, 2011).

L'activation de p53 peut également induire la synthèse de molécules pro-apoptotiques qui régulent la voie intrinsèque (par exemple Bax ou Puma) ou extrinsèque (par exemple Fas) de l'apoptose. La voie intrinsèque est régie par des protéines de la famille Bcl-2 qui régulent la perméabilisation des membranes mitochondriales externe (MOMP), alors que l'apoptose extrinsèque est médiée par les récepteurs de mort dédiés tels que Fas. Les deux voies d'apoptose passent par l'assemblage de plateformes multi-protéiques comme l'apoptosome et le DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) qui facilitent l'activation des caspases par leur recrutement, leur dimérisation et leur clivage auto-catalytique. Par ailleurs, l'apoptose peut également être déclenchée par une augmentation des niveaux de céramide suite à l'activation de sphingomyélinases (SMases) de la membrane plasmique par les RIs.

De plus, d'autres types de complexes protéiques, comme RIP-1 et/ou RIP-3 (nécrosome) peuvent déclencher la nécrose sous certaines conditions (inhibition de la caspase-8). Enfin, les RIs peuvent également induire l'autophagie suite à l'accumulation de protéines oxydées ou mal repliées dans le réticulum endoplasmique, ce qui peut à son tour induire l'apoptose (Panganiban et al., 2013).

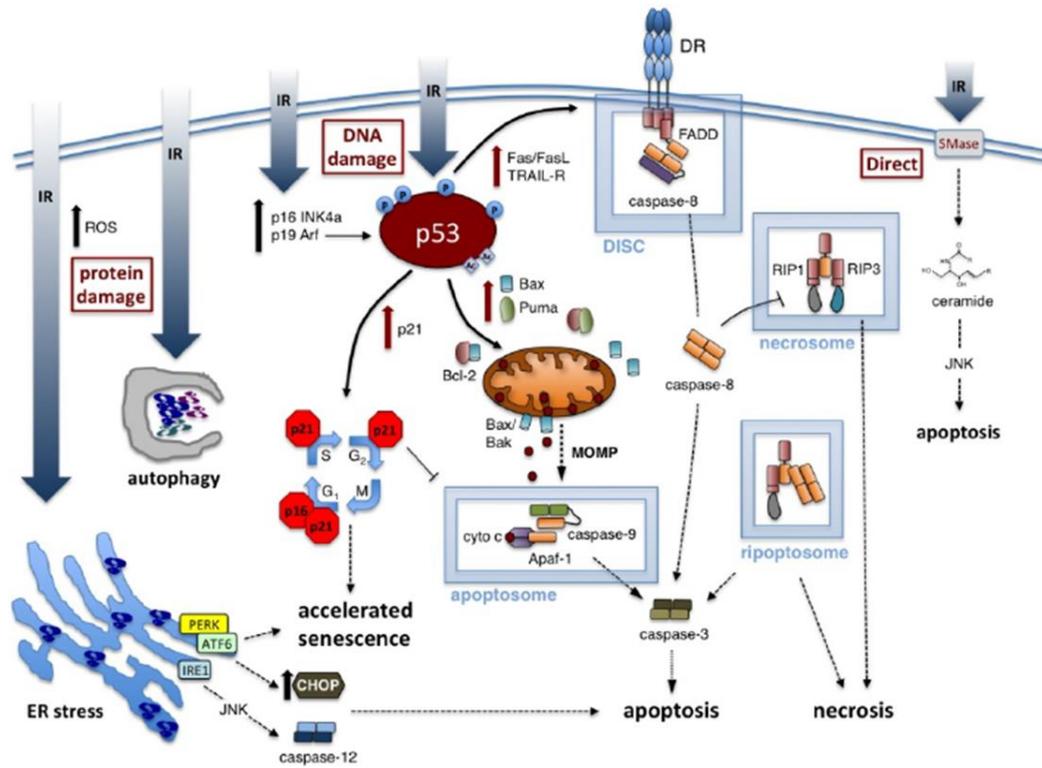


Figure 5: Morts cellulaires radio-induites

(Panganiban et al., 2013)

2) Hadronthérapie: focus sur les ions carbone

2.1) Généralités :

La RT est apparue au début du 20^{ème} siècle et n'a cessé de se développer jusqu'à ce jour. Elle est utilisée comme méthode curative ou de contrôle tumoral dans plus de la moitié des cancers, seule ou en association avec une chimiothérapie ou une chirurgie. La photonthérapie (ph-RT) se base sur le principe de dépôt d'énergie lors de l'interaction de photons (RX, rayons γ) avec les composants cellulaires au moment de traverser les tissus : les photons de faible énergie (kilovoltage) déposent le maximum d'énergie immédiatement dans la matière avec laquelle ils interagissent. Cependant, l'utilisation de photons de haute énergie (mégavoltage), permet de décaler ce pic de dépôt de quelques centimètres (Figure 6), du fait d'interactions Compton, minimisant la dose délivrée à la peau (Tubiana et al., 2008). Plusieurs critères permettent de définir les protocoles de RT : type, localisation et taille de la tumeur, ainsi que son extension et son grade. En plus de la dose totale nécessaire à éradiquer une tumeur, il est nécessaire de définir la dose par fraction, le nombre total de fractions et le nombre de fractions par jour ou par semaine. Les potentielles séquelles radio-induites dans les tissus sains limitent l'utilisation des RIs en RT. Ces séquelles peuvent aller de la simple réaction cutanée à des cancers secondaires (Stone et al., 2003). La RT a beaucoup évolué ces dernières décennies afin d'augmenter et focaliser la dose dans le volume tumoral et épargner au maximum les tissus sains. C'est le cas de la RT conformationnelle avec modulation d'intensité par tomothérapie, la RT stéréotaxique corps entier (Cyberknife©) et l'hadronthérapie.

L'hadronthérapie, initiée par Sir R. R. Wilson en 1946, utilise les composants du noyau ; protons et neutrons ou le noyau lui-même dans le cas des ions lourds. La neutronthérapie étant quasi-abandonnée, seule l'utilisation des protons et ions lourds (plus lourds que l'hélium), notamment les ions carbone sera abordée. L'intérêt de ces particules par rapport aux photons et électrons utilisés en routine réside dans leurs propriétés physiques et biologiques.

2.2) Aspects physiques et techniques de l'hadronthérapie :

La balistique (propriété physique) d'un rayonnement ionisant (RI) correspond à la manière dont il dépose sa dose dans un milieu homogène (équivalent eau). Celle-ci dépendra de sa nature et de son énergie. La Figure 6 représente les courbes de rendement en profondeur des photons *versus* hadrons. Les photons (courbe bleue) déposent le maximum de leur énergie en début de parcours (peau dans le cas d'une RT) puis la dose décroît en profondeur. Cette balistique peu précise ne permet pas de protéger les tissus sains en amont et en aval du volume tumoral. Le développement de la RT utilisant les photons a permis de multiplier les incidences pour réduire l'irradiation à forte dose de tissus sains entourant le volume tumoral et éviter ainsi le risque de complications aiguës et tardives. Cependant, ces technologies innovantes (tomothérapie, Cyberknife©) induisent une irradiation à faible dose d'un plus grand volume de tissus sains et peuvent potentiellement induire un effet Bystander.

Les protons et ions carbone déposent leur maximum d'énergie de manière extrêmement focalisée, en fin de parcours (Figure 6). La profondeur de ce pic de dépôt d'énergie appelé « pic de Bragg » dépend de la nature de la particule, de son énergie et du milieu traversé (densité et charge). Cette vision est très schématique car en réalité les protons et les ions carbone perdent leur énergie progressivement à travers des interactions atomiques et nucléaires ce qui réduit l'énergie de ces particules et augmente ainsi les interactions électroniques. Le maximum d'interaction se produit en fin de parcours causant un maximum de transfert d'énergie (TEL) et donc un maximum de dépôt d'énergie dans le volume cible. Le rationnel de l'utilisation de ce genre de particules découle principalement de cette balistique caractéristique.

Par ailleurs, le ratio entre le pic de Bragg et la dose en entrée du faisceau est plus élevé pour les ions lourds en comparaison aux protons. Ceci permet, en théorie, un meilleur dépôt de dose dans la tumeur tout en protégeant mieux les tissus sains environnants. En faisant varier l'énergie des ions, leur masse ou leur charge, il est possible de décaler ce pic de Bragg en profondeur ce qui peut être utile pour atteindre une cible à une position donnée.

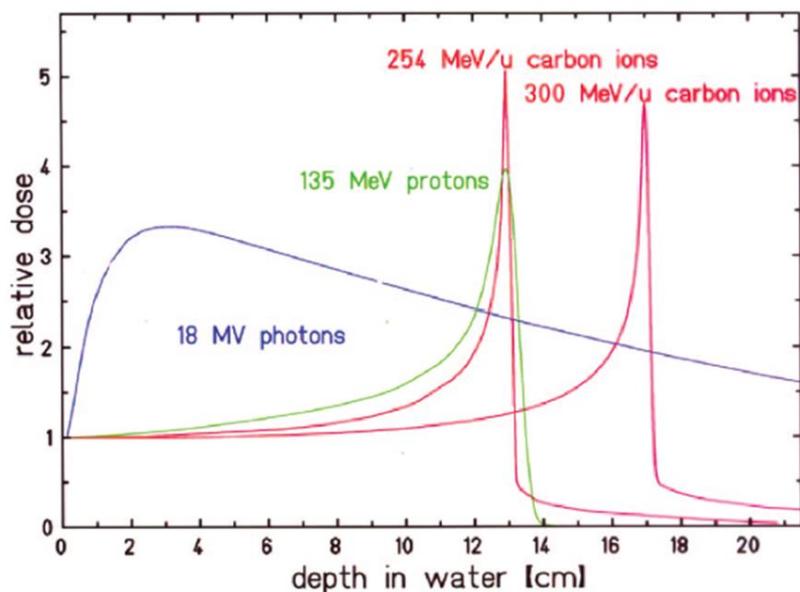


Figure 6: Courbes de rendement en profondeur: photons, protons et ions carbone

(Weber and Kraft, 2009)

Un seul pic d'énergie ne suffit pas à irradier un volume tumoral. Pour ce faire, il est nécessaire d'ajouter des pics de Bragg de différentes énergies afin d'obtenir un pic de Bragg dégradé ou SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*) (Figure 7). Dans ce cas de figure, les tissus sains en amont de la tumeur reçoivent 50 à 70% de la dose mais les tissus en aval sont protégés (si on exclue la queue de fragmentation des faisceaux). En plus d'une

meilleure conformation du volume cible irradié, l'utilisation de ces particules permet de réduire le volume de tissus sains irradiés à faible doses (à la différence de la tomographie et du Cyberknife©) ce qui, en théorie permet de réduire le risque de cancers radio-induits surtout chez l'enfant (Miralbell et al., 2002).

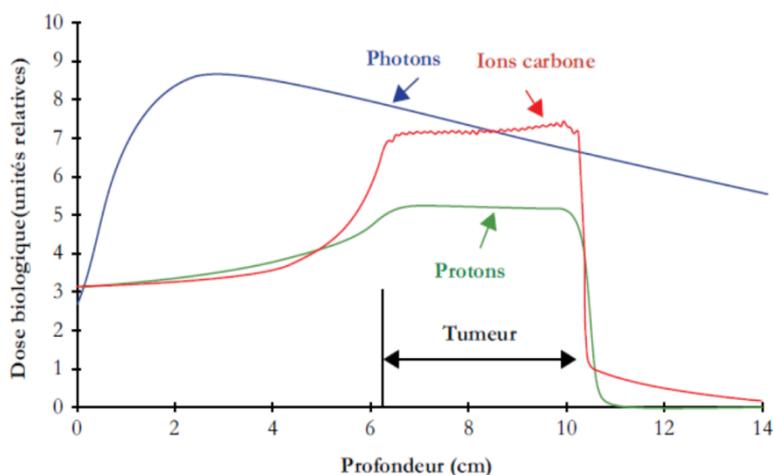


Figure 7: Effet biologique relatif: photons, protons et ions carbone

(Pommier et al., 2010)

Il existe principalement deux types d'accélérateurs de particules : les cyclotrons et les synchrotrons, ainsi que plusieurs méthodes de modulation de faisceau pour couvrir tout le volume tumoral.

2.2.1) Production des faisceaux : cyclotrons *versus* synchrotrons

L'énergie nécessaire à traiter une tumeur dépend de la profondeur de cette dernière. Pour les protons, une énergie comprise entre 80 et 250 MeV est nécessaire. Dans la majorité des centres de p-RT, les cyclotrons sont utilisés pour produire des faisceaux de protons avec suffisamment d'énergie et d'intensité. Un cyclotron permet de produire en continu un faisceau d'énergie fixe (radiofréquence fixe) ce qui rend sa conception assez facile. Pour ce qui est des ions carbone, afin d'obtenir une profondeur de pénétration identique à un faisceau de proton de 150 MeV (pic de Bragg à 16 cm de profondeur), il est indispensable d'accélérer un faisceau d'ions carbone de 250 MeV/A (Schulz-Ertner et al., 2006). Dans ce cas précis, les synchrotrons sont mieux adaptés que les cyclotrons. Les synchrotrons produisent, en effet, des faisceaux pulsés dont l'énergie peut varier de quelques MeV d'un cycle à un autre. Ceci permet de moduler le pic de Bragg sans utiliser d'absorbants et en évitant la dégradation et la diffusion latérale dans l'énergie (voir plus bas). Cependant, le coût de cette technologie est beaucoup plus élevé que celle des cyclotrons.

2.2.2) Systèmes de modulation de faisceaux :

Afin d'obtenir un pic de Bragg dégradé (SOBP) correspondant au volume tumoral, il est nécessaire d'accumuler plusieurs pics de Bragg de différentes énergies. Pour ce faire, il existe deux méthodes : passive ou active.

Système passif :

C'est la première méthode à avoir été développée et elle reste, à ce jour, la plus utilisée en hadronthérapie. La dose en profondeur est tout d'abord modulée à l'aide d'un dégradeur ou ralentisseur multicouches conçu pour obtenir un profil profondeur-dose prédéfini. Afin d'obtenir une irradiation latérale homogène, un système d'oscillation magnétique permet de déplacer le faisceau sur une zone définie (Figure 8.A). De plus, un collimateur et un compensateur sont positionnés sur le trajet du faisceau dans le but d'adapter le dépôt de dose à chaque tumeur (largeur et inhomogénéité tissulaire de la tumeur ainsi que la courbure de la surface du patient). Cette technique possède plusieurs inconvénients majeurs. Tout d'abord, la dose en profondeur ne peut être adaptée qu'à l'extrémité distale de la cible mais pas à l'extrémité proximale. Ceci est dû au fait que le compensateur décale le pic de Bragg vers la région d'entrée. Ainsi, une quantité considérable de la région à haute dose (et haut TEL) est située dans le tissu normal en amont de la cible, en particulier aux frontières latérales. Deuxièmement, la quantité de matière dans le trajet du faisceau est considérable, ce qui conduit à une augmentation de fragments nucléaires (dont les neutrons) produits par des interactions nucléaires avec le dégradeur. Ces fragments nucléaires ont des énergies inférieures au faisceau d'hadron et donc un TEL plus élevé responsable d'une augmentation de l'efficacité biologique relative en amont de la cible.

Système actif :

Ce système tire profit de la charge électrique des particules pour produire un faisceau balayé très ciblé qui est ensuite dévié latéralement par 2 dipôles magnétiques pour permettre de couvrir toute la zone tumorale. Lorsque le faisceau est produit avec un synchrotron, l'énergie peut être modifiée de quelques MeV d'un cycle à un autre. De cette façon, un volume cible peut être balayé en 3 dimensions et la répartition de la dose peut être adaptée à n'importe quel forme tumorale irrégulière sans l'utilisation de dégradeurs, compensateurs ou collimateurs (Figure 8.B). De ce fait, la dose intégrale ainsi que la zone proximale recevant des rayonnements de haut TEL sont minimisés.

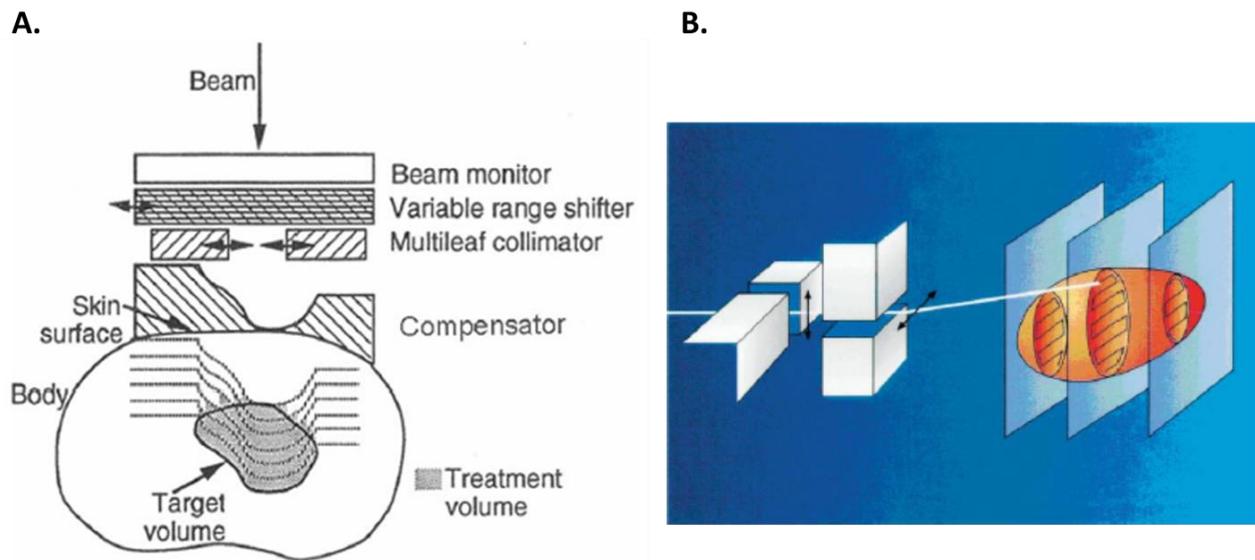


Figure 8: Principe d'un système passif (A) et actif (B) de modulation de faisceau d'hadron

(Schulz-Ertner et al., 2006)

Positionnement du patient:

Une fois que le faisceau est produit, il peut être délivré au patient à l'aide d'un bras rotatoire isocentrique (*gantry*). Cette technologie est très avantageuse car elle permet d'appliquer le faisceau au niveau du volume tumoral mais en multipliant les entrées autour du patient. Ce système de gantry est déjà très utilisé en ph-RT mais il est très délicat à mettre en place pour l'hadronthérapie en raison de la taille et le poids nécessaires à supporter le faisceau (entre 100 et 600 tonnes, de 10 à 13 mètres de diamètre). Le centre HIT (*Heidelberg Ion Therapy Centre*) en Allemagne héberge la première gantry proton/ions carbone au monde (Figure 10). En l'absence de gantry, le faisceau est délivré à l'aide d'une ligne fixe, horizontale, verticale ou inclinée à 45°, comme c'est le cas dans les centres d'hadronthérapie au Japon (Tableau 1).

Le positionnement du patient est réalisé à l'aide de masques ou de moules du corps entier spécifiques à chaque patient. Avant chaque fraction, la position est contrôlée par radiographie comparée aux images précédemment obtenues numériquement par tomographie assistée par ordinateur (CT scan). Des chaises sont également disponibles afin de traiter les patients en position assise. Dans cette configuration, il est très important de minimiser le temps de traitement car les patients ont tendance à se détendre et ainsi la position relative des organes est modifiée.

2.3) Aspects biologiques de l'hadronthérapie :

Lors de la mise en place d'un protocole de RT, il est nécessaire d'établir un système efficace de planification de traitement ou TPS (*Treatment Planing System*) qui permettra de déterminer les paramètres de l'irradiation. Ce TPS prend en compte les caractéristiques des faisceaux (nature, fluence, débit, énergie, géométrie...), l'anatomie du patient, la localisation de la tumeur ainsi que son volume et sa radiosensibilité. Il est donc spécifique à chaque patient et doit être validé sur le plan médical et physique avant la première fraction de RT. La valeur de l'efficacité biologique relative est indispensable à la mise en place de ces TPS.

TPS :

Dans le cas de figure des systèmes passifs de modulation de faisceau, le profil dose-profondeur est fixé dès le début de la séance. Les algorithmes pour calculer la dose absorbée en hadronthérapie sont similaires à ceux utilisés en ph-RT. La modélisation du transport de particules est relativement simple car la diffusion latérale des ions carbone est très faible. La contribution des différents fragments des multiples faisceaux utilisés dans la dose finale est réalisée dans l'eau et est intégrée dans le logiciel. De plus, les différents composants spécifiques à chaque patient (compensateur, collimateur) sont inclus dans ce calcul. La dose est exprimée en valeur relative de la dose absorbée.

En ce qui concerne les systèmes actifs, la forme du SOBP doit être calculée pour chaque point de balayage dans le champ d'irradiation. Ce calcul est proche de ce qui se fait pour les faisceaux fins balayés utilisés en RT conventionnelle. En effet, chaque énergie de faisceau doit être modélisée. Le volume cible est tout d'abord divisé en coupes d'épaisseurs variable. Chaque coupe correspond à un intervalle d'ions à une certaine énergie d'accélération. Le nombre de particules à chaque point de balayage est optimisée par itérations jusqu'à une dose prédéfinie à chaque point.

Modélisation biologique:

Pour la même dose physique, deux RIs de TEL différents réagissent de manière différente avec la matière traversée, ce qui entraîne des effets biologiques spécifiques dépendant de la densité d'ionisation de la matière. Une forte densité d'ionisation caractéristique des rayonnements de haut TEL va induire une proportion élevée de CDBs de l'ADN non réparables, responsable d'une meilleure efficacité biologique que les rayonnements de bas TEL. Cependant, l'efficacité biologique d'un RI dépend de ses caractéristiques physiques (TEL) mais également du tissu irradié (sain *versus* tumeur) et de son oxygénation.

Les ions carbone possèdent des avantages physiques et biologiques par rapport aux protons. La diffusion latérale et longitudinale du faisceau carbone est en effet inférieure à celle des protons (Suit et al., 2010). De plus, l'EBR maximale des ions carbone coïncide avec la position du pic de Bragg. Ainsi, dans les premiers centimètres du parcours des ions carbone dans la matière (en amont du pic), l'énergie est maximale et elle correspond donc à de faibles valeurs d'EBR. Par contre, dans les 2-3 derniers centimètres du parcours,

l'énergie baisse du fait des interactions atomiques avec la matière ce qui augmente l'EBR à des valeurs comprises entre 2 et 5, en fonction du type de tumeur (Durante, 2014). Cette supériorité biologique n'est pas retrouvée en utilisant des faisceaux de protons dont l'efficacité maximale est limitée à quelques micromètres en fin du parcours. Pour toutes ces raisons, les ions carbone ont été choisis, parmi d'autres ions lourds, au début des années 1990 comme traitement optimal pour des tumeurs profondes, à croissance lente et radiorésistantes aux photons. Cependant, l'interaction du faisceau de carbone avec la matière produit une queue de fragmentation au-delà du pic de Bragg, ce qui implique une dose absorbée équivalente à 10-20% de la valeur dans le plateau du SOBP, dans les tissus en aval de la tumeur. Cette caractéristique n'est pas retrouvée en utilisant des protons faisant de la p-RT le traitement de choix des tumeurs à proximité d'organes à risque et en onco-pédiatrie. De plus, cette dernière technique est moins onéreuse qu'une installation utilisant des ions carbone.

En routine clinique, la dose biologique équivalente [GyE ou Gy(RBE)] est utilisée. Pour les faisceaux de protons, une EBR de 1.1 est utilisée (Figure 9). Par contre, la forte variation de l'EBR relative au TEL des ions lourds rend la situation plus complexe. Dans le but d'obtenir une dose biologique uniforme à l'intérieur de la tumeur, il est nécessaire d'avoir une distribution non uniforme de la dose physique comme le montre la Figure 9. Les valeurs d'EBR pour les ions carbone qui sont intégrées dans les TPS sont de 2 à 3 pour les principales tumeurs (et les tissus sains) (Schulz-Ertner et al., 2006).

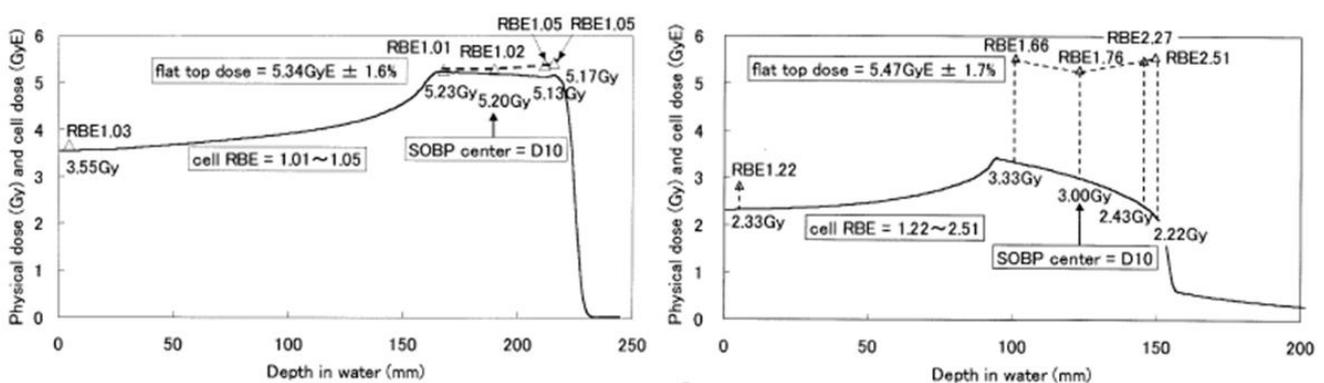


Figure 9: Uniformité de la dose biologique dans le SOBP d'un faisceau de proton (gauche) et d'ions carbone (droite)

(Kagawa et al., 2002)

Les TPS actuellement utilisés lors d'un traitement par ions carbone ne prennent pas en compte de façon satisfaisante les multiples effets biologiques des ions carbone (^{12}C) ainsi que les différentes particules produites par ces faisceaux traversant le corps humain et ce malgré des simulations multiparamétriques satisfaisantes. Ces TPS intègrent des EBRs obtenues par le rapport des doses d'irradiation induisant une

clonogénicité de 10% pour des cultures cellulaires en monocouche irradiées in vitro en RX *versus* ^{12}C . Les paramètres α et β extraits des courbes de survies (voir page 16) ne peuvent pas suffire à expliquer tous les effets biologiques radio-induits. De plus, l'évolution rapide des machines de RT et l'utilisation de plus en plus grande de faisceaux balayés pose le problème du fractionnement de la dose (et du débit de dose) et les variations de TEL qui ne sont pas assez pris en compte dans les TPS actuels. D'autre part, le choix de critères biologiques à intégrer dans le calcul d'EBR reste très réduit. Tout ceci peut potentiellement induire des séquelles radio-induites chez les patients.

2.4) Centres d'hadronthérapie dans le monde

Alors que beaucoup de centres de p-RT sont opérationnels dans le monde, les centres d'hadronthérapie par ions carbone sont beaucoup moins nombreux. A ce jour, il existe 9 centres opérationnels et 4 centres en cours de construction (Tableau 1). A titre de comparaison, il existe une quarantaine de centres dédiés à la p-RT dont deux en France : le centre de p-RT d'Orsay (CPO) et le centre Antoine Lacassagne à Nice (CAL). De plus, une trentaine de centres de p-RT sont en cours de construction dans le monde et une quinzaine en cours de planification (fin 2015).

Historiquement, le premier centre de recherche à traiter des patients par ions accélérés (ions carbone, néon, silice, argon) a été le HILAC (*Berkeley's Heavy Ion Linear Accelerator Center*) en Californie. Les traitements ont commencé en 1970 et se sont prolongés jusqu'en 1993, date de la fermeture du centre. La première structure entièrement dédiée à l'hadronthérapie clinique a vu le jour au Japon en 1994 ; l'accélérateur HIMAC (*Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba*) permet de délivrer un faisceau fixe horizontal avec un système passif de modulation d'énergie. Depuis, deux autres centres ont été construits au Japon, un à Hyogo et un autre à Gunma (Tableau 1).

En Europe, le centre de recherche en physique nucléaire GSI (*Gesellschaft für Schwerionenforschung*) à Darmstadt (Allemagne) a été le premier à traiter des patients par ions carbone, à partir de 1997, grâce à un système actif de modulation du faisceau (430 MeV/A). Suite au succès de ce projet pilote (600 patients traités jusqu'en février 2008), le centre HIT a été approuvé en 2001 et le premier patient traité en 2007 (Figure 10).

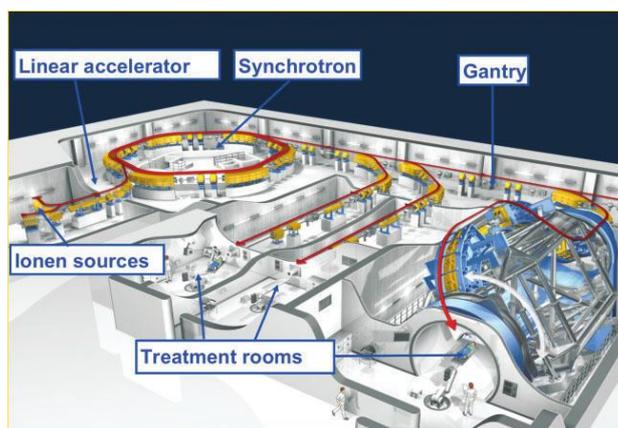


Figure 10: Exemple de centre dédié entièrement à l'hadronthérapie (HIT)

(Jensen et al., 2011)

En France, le premier centre d'hadronthérapie par ions carbone verra le jour en 2018 à Caen (ARCHADE, *Advanced Resource Centre for Hadrontherapy in Europe*).

Etat d'avancement	Pays	Ville	Caractéristiques techniques S/C* Max d'énergie (MeV/A) Orientation du faisceau	Début du traitement	Nombre de patients traités (fin décembre 2014)
Centre opérationnels	Allemagne	Heidelberg (HIT)	S 430 2 horiz, 1 gantry	2009, 2012	1723
	Allemagne	Marburg (MIT)	S 430 3 horiz, 1 à 45° **	2015 (oct)	0
	Chine	Lanzhou (IMP-CAS)	S 400 1 horiz	2006	213
	Chine	Shanghai (SPHIC)	S 430 3 horiz	2014	22
	Italie	Pavie (CNAO)	S 480 3 horiz, 1 vertical	2012	318
	Japon	Chiba (HIMAC)	S 800 Horiz***, vertical***	1994	8841
	Japon	Hyogo (HIBMC)	S 320 Horiz, vertical	2002	2146
	Japon	Gunma (GHMC)	S 400 3 horiz, 1 vertical	2010	1486
	Japon	Tosu (SAGA, HIMAT)	S 400 3 horiz, vertical, 45°	2013	547
Centres en cours de construction	Autriche	Wiener Neustadt (Med-Austron)	S 430 1 gantry (proton), 1 horiz, 1 0+90°	2016	-
	Chine	Lanzhou (HITFiL)	S 400 4 horiz, vertical, oblique, fixe	2015	-
	Chine	Kanagawa (i-ROCK)	S 430 4 horiz, 2 vertical	2015 (dec)	-
	France	Caen (ARCHADE)	C 400 (prototype)	2018	-

Tableau 1: Liste des centres d'hadronthérapie par ions carbone dans le monde

* Synchrotron (S) ou Cyclotron (C), ** faisceau balayé, *** faisceau balayé et diffus. La « gantry » est une tête rotative isocentrique des appareils de RT. Source : <http://www.ptcog.ch> (Mise à jour en novembre 2015).

2.5) Indications thérapeutiques :

La RT par ions carbone représente une modalité de traitement alternative très attractive alliant une meilleure balistique et une efficacité biologique plus élevée que la RT conventionnelle (photons). Ceci pourrait réduire la fréquence et la sévérité des effets secondaires de la RT et augmenter l'efficacité thérapeutique dans le cas des cancers inopérables ou incomplètement résécables, radiorésistants aux photons et situés près d'organes à risque (radiosensibles). En se basant sur les données de l'expérience clinique en hadronthérapie (principalement aux USA et au Japon), la haute autorité de santé (HAS) a précisé les principales indications pour l'hadronthérapie par ions carbone (2010http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/201003/hadrontherapie_rapport_preliminaire_vf_pdf.pdf):

- Chordomes (CHs) et chondrosarcomes (CHSs) de la base du crâne
- Sarcomes du squelette axial et des tissus mous, non résécables ou en résection incomplète
- Carcinomes adénoïdes cystiques
- Tumeurs des sinus de la face et des glandes salivaires
- Mélanome muqueux
- Récidives locales non résécables des cancers du rectum
- Hépato-carcinomes de grande taille (diamètre supérieur à 4-5cm)
- Mélanomes choroïdes et tumeurs oculaires
- Tumeurs de la prostate
- Tumeurs du col de l'utérus
- Tumeurs pulmonaires non à petites cellules de stade I

Nous noterons que les pathologies suscitées forment un groupe hétérogène pour lequel de nombreuses approches thérapeutiques sont possibles (chirurgie et/ou RT et/ou chimiothérapie). L'absence de protocole standardisé rend assez difficile la comparaison des résultats cliniques entre différentes institutions. De plus, des réponses variables sont observées en fonction du tissu concerné, des critères biologiques et cliniques et du type de fractionnement.

Par ailleurs, le nombre de patients bénéficiant d'un traitement de RT par ions carbone (~15000 à la fin 2015), l'utilisation croissante de faisceaux de type faisceau fin balayé et la tendance à l'hypo-fractionnement au Japon (13 séances d'ions carbone au lieu d'une trentaine pour la RT par photons), posent le problème des potentielles séquelles radio-induites qui, malgré les propriétés biologiques et physiques des ions carbone, ne sont pas nulles. Récemment, le premier cas de cancer radio-induit par les ions carbone a été décrit : homme de 33 ans traité pour un cancer de l'oreille interne, 64 Gy(RBE)/16 fractions, qui a développé un hémangiome caverneux radio-induit (Adachi et al., 2015). Pour ces raisons, les programmes de recherche en physique et biologie sont indispensables afin d'améliorer la sécurité et la prise en charge des patients.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement au cas des CHSs et leur tissu sain de référence ; le cartilage.

3) Évolution des modèles 3D en radiobiologie :

La culture de cellules en monocouche (2D) a été longtemps considérée comme incontournable et suffisante en toxicologie générale et plus particulièrement dans les études de radiobiologie. Cependant, depuis une dizaine d'années, des modèles de culture cellulaire en 3D dans des matrices de macromolécules (\pm cytokines \pm facteurs de croissance) sont de plus en plus utilisés afin d'étudier les effets directs ou indirects des rayonnements ionisants. Ces différents modèles ont ainsi permis des comparaisons d'irradiations à bas *versus* haut TEL, mais surtout de dévoiler des marqueurs biologiques à faibles doses d'irradiation. Ainsi, un effet « bystander » par diffusion dans de l'épiderme humain en 3D a été démontré jusqu'à 1 mm d'une cellule irradiée par un microfaisceau d'ion ^{56}Fe (Belyakov et al., 2005), puis dans un équivalent peau (Sedelnikova et al., 2007) et après irradiation en protons (Schettino et al., 2010). La cinétique des cassures/réparation de l'ADN, l'analyse globale de modulation radio-induite de l'expression de gènes et l'expression de marqueurs de l'inflammation cellulaire ont été étudiées après irradiations en RX ou en protons dans de l'équivalent épiderme (Mezentsev and Amundson, 2011; Schmid et al., 2010; Su et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Varnum et al., 2012; Waters et al., 2013; Yunis et al., 2012).

Il a également été montré que la culture cellulaire en 3D conférait une relative radiorésistance en comparaison à la culture en 2D. En effet, Sowa et collaborateurs ont développé un modèle 3D d'épithélium mammaire organisé en acini. Ce dernier a été décrit comme 2 à 4 fois plus résistant aux RX (2-5 Gy) par rapport à la culture 2D, avec une diminution significative de l'apoptose radio-induite (Sowa et al., 2010). Par ailleurs, la double comparaison des irradiations bas *versus* haut TEL en situation de cellules confluentes ou en croissance en monocouche *versus* 3D a permis d'explorer la cinétique de réparation des CDBs de l'ADN (Groesser et al., 2011). Storch et collaborateurs ont expliqué cette radiorésistance par la modification de la densité de la chromatine en 3D (Storch et al., 2010).

De plus, Grabhan et collaborateurs ont utilisé un modèle 3D de cellules endothéliales qui s'organisent spontanément en microvaisseaux afin de comparer l'effet différentiel de RIs de bas TEL (protons et photons) *versus* haut TEL (^{56}Fe) à différents stades de maturation du modèle. Les résultats de cette étude ont montré que les RIs de haut TEL (^{56}Fe) avaient un effet délétère sur la structure des microvaisseaux matures et en développement, à la différence des protons et des photons qui n'endommagent que les modèles immatures, à degrés variables (Grabham et al., 2011). De même, des cellules microvasculaires mises en culture en gel dopé au β -FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) à partir de biopsies de carcinomes mammaires et de glandes mammaires normales, montraient la plus grande radiosensibilité des cellules endothéliales issues de tumeurs (Park et al., 2012).

Les différents modèles cités ci-dessus offrent un grand éventail de possibilités qui peuvent être adaptés à chaque type cellulaire et la problématique mise en jeu. Ces données démontrent la supériorité des modèles de culture 3D reconstituant partiellement le microenvironnement cellulaire en comparaison aux cultures

monocouches (Yoshida et al., 2008), notamment pour explorer les modulations radio-induites des différentes familles de gènes ou de classes de marqueurs cellulaires (Schaue et al., 2012). D'un autre côté, l'évolution de ces modèles remet en question la pertinence de la culture cellulaire en normoxie (20% d'O₂) utilisée dans la grande majorité des laboratoires.

4) Chondrosarcomes :

Le sarcome est un type de cancer qui prend origine dans les os, le cartilage, le tissu adipeux, les muscles, les vaisseaux sanguins ou d'autres tissus conjonctifs ou de soutien. Les sarcomes sont rares et représentent moins de 1 % de tous les nouveaux cas de cancer par an. Ils peuvent avoir différentes origines embryonnaires et affectent les personnes de tous les âges mais certains types sont plus communs pour des groupes d'âge spécifiques. Par exemple, les sarcomes des tissus mous représentent environ 7 % de tous les cancers chez l'enfant. On distingue principalement deux types de sarcomes (selon la classification de l'OMS, 2012) :

- **Sarcomes osseux** : se développent au niveau de l'os dont :
 - Tumeurs ostéogéniques (ostéosarcome)
 - Tumeurs hématopoïétiques (myélome)
 - Tumeurs chondrogéniques* (CHS)
 - Tumeurs fibrogéniques (fibrosarcome osseux)
 - Tumeurs notochordales (CH)
 - Tumeurs vasculaires (angiosarcome)
 - Tumeurs myogéniques (leiomyosarcome osseux)
 - Tumeurs lipogéniques (liposarcome osseux)
 - Autres : sarcome d'Ewing,...etc

*Les tumeurs chondrogéniques peuvent être bénignes, intermédiaires (CHSs de grade I) ou malignes (CHS de grade II ou III, CHS dédifférencié, mésenchymateux ou à cellules claires). Voir page 36 pour les détails.

- **Sarcomes des tissus mous** : se développent sur le tissu conjonctif dont :
 - Tumeurs adipocytaires (liposarcomes)
 - Tumeurs fibroblastiques (fibrosarcome des tissus mous)
 - Tumeurs musculaires (rhabdomyosarcome)
 - Tumeurs vasculaires (angiosarcome)
 - Tumeurs chondro-osseuses (CHS des tissus mous ou CHS mésenchymateux)
 - Tumeurs stromales gastrointestinales

4.1) Classification et localisation des chondrosarcomes :

Les CHSs sont des tumeurs naturellement hypoxiques à différenciation cartilagineuse, apparaissant le plus souvent vers 40 ans. En termes de fréquence, ils sont classés en troisième position des tumeurs osseuses après les ostéosarcomes et les myélomes (représentent une centaine de nouveaux cas en France). C'est un groupe très hétérogène de néoplasmes qui ont en commun la production de matrice cartilagineuse par les cellules tumorales (Gelderblom et al., 2008). Ils sont classés en plusieurs types :

- **CHS conventionnels** : représentent 85% de tous les cas de CHSs. Ils sont classés en fonction de leur localisation en :
 - CHS conventionnels primitifs (75%) : se développent dans la cavité centrale de l'os après transformation maligne d'une lésion bénigne (enchondrome).
 - CHS conventionnels secondaires (10%) : se développent en périphérie de l'os après transformation maligne d'une lésion bénigne (ostéochondrome).
 - CHS périostal (<1%)
- **CHS dédifférencié (10%)** : tumeur maligne de haut grade, non cartilagineuse, localisée près d'une tumeur cartilagineuse maligne de bas grade.
- **CHS méenchymateux (~ 2%)** : tumeur maligne de haut grade, retrouvée au niveau des os ou des tissus mous, composé d'une fraction de cartilage différencié et une partie de cellules rondes indifférenciées.
- **CHS à petites cellules (~ 2%)** : tumeur maligne de bas grade caractérisée par des cellules tumorales à cytoplasme clair. Il est rarement métastatique.

Les CHSs conventionnels sont similaires d'un point de vue histologique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ils sont classés en 3 grades (I, II ou III) sur la base de caractéristiques génétiques et histologiques. Le grade I correspond à des tumeurs de faible cellularité, composées principalement de matrice hyaline cartilagineuse et qui induisent très rarement des métastases. Le grade III correspond à des tumeurs agressives, de haute cellularité et qui sont composées d'une matrice muco-myxoïde. Ces tumeurs de grade III induisent la formation de métastases chez 70% des patients. Le grade II, quant à lui, est intermédiaire entre ces deux types. En cas de récurrence, dans plus de 13% des cas, le grade de la nouvelle tumeur est supérieur à la lésion primaire. La Figure 11, adaptée de (Bovée et al., 2010), représente, entre autres, deux exemples type de CHS de bas grade et de haut grade.

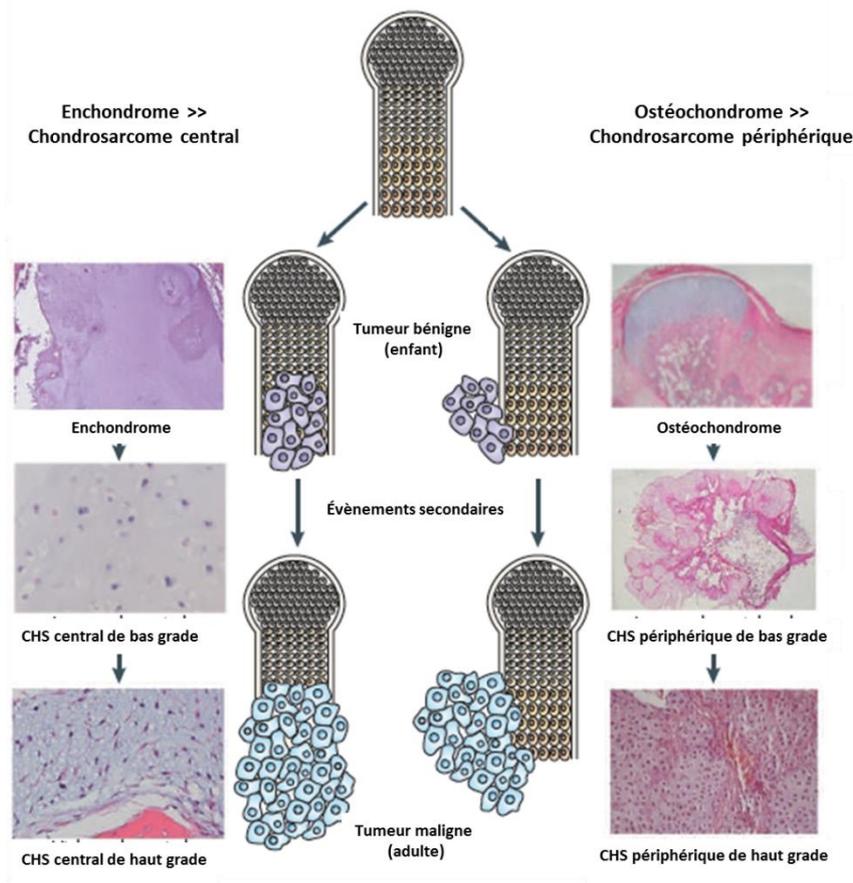


Figure 11: Développement de tumeurs cartilagineuses bénignes et leur évolution en chondrosarcome

Les enchondromes se développent suite à une dérégulation de la différenciation de la plaque de croissance qui est due à une activation constitutive de la voie Hedgehog. Ces lésions peuvent progresser en CHS central de bas grade suite à des mutations génétiques supplémentaires. L'addition d'aberrations chromosomiques aboutit à la transformation en CHS central de haut grade. D'un autre côté, l'inactivation de deux copies des gènes exostosin 1 ou 2 (EXT1 ou EXT2) dans une plaque de croissance (près de l'os), aboutit à la formation d'ostéochondrome, probablement suite à une mauvaise diffusion du facteur Hedgehog freinant la formation d'os périphérique près de la plaque de croissance et une perte de polarité des chondrocytes. Des modifications génétiques non identifiées aboutissent à la formation de CHS périphérique de bas grade. Adapté de (Bovéé et al., 2010).

La classification histologique est très importante pour poser le diagnostic de CHS mais la variabilité interindividuelle inhérente à cette technique rend parfois le diagnostic difficile. De plus, il est parfois laborieux de distinguer entre des lésions bénignes (enchondrome et ostéochondrome) et certaines lésions malignes (CHS de grade II), d'un point de vue radiologique et histologique.

Le Tableau 2 récapitule les principales caractéristiques cliniques et thérapeutiques des différents types de CHSs (Gelderblom et al., 2008).

	Conventionnel, primitif, central	Conventionnel, secondaire périphérique	Dédifférencié	Mésenchymateux	A cellules claires
% de tous les cas de CHS	~75%	~10%	~10%	<2%	<2%
Lésion primitive	Enchondrome (>40%)	Osteochondrome (100%)	CHS conventionnel	-	-
Age	>50 ans	Plus jeune que CHS central	~59 ans	Pic à la 2 ^{ème} et 3 ^{ème} décade	Pic de la 3 ^{ème} à la 5 ^{ème} décade
Localisation préférentielle	Pelvis, fémur proximal et distal, humérus proximal, côtes	Pelvis, scapula et clavicule	Fémur et pelvis	65-86% osseux (mâchoire, côtes, vertèbres)	Epiphyse de l'humérus ou de la tête fémorale
Grade histologique	Grade I ou II ou III		Haut grade	14-43% extra-osseux (méninges) Haut grade	Bas grade
Survie	Grade I, 83% : Grade II, 64% : Grade III, 29% à 10 ans		24% à 5 ans	28% à 10 ans	89% à 10 ans
Sensibilité à la chimiothérapie	Non	Non	Incertaine	Possible	Non
Sensibilité à la RT	Faible	Faible	Faible	Eventuellement élevée	Faible

Tableau 2: Caractéristiques cliniques et thérapeutiques des chondrosarcomes

Le diagnostic et le typage des CHSs est essentiel car il détermine le stade de développement de la tumeur ainsi que la stratégie thérapeutique à adopter.

4.2) Approches thérapeutiques dans le traitement des chondrosarcomes :

L'approche thérapeutique du traitement des sarcomes en général dépend du type histologique (CHS, liposarcome, ostéosarcome) et du site primaire de la tumeur. Elle repose principalement sur la chirurgie en association à une RT et/ou chimiothérapie pour minimiser le risque de récurrence locale ou métastatique. Cependant, dans certains cas de cancer avancés ou de localisation anatomique proche d'organes sensibles, l'exérèse large est contre-indiquée. C'est en effet le cas des sarcomes développés au niveau de la base du crâne, de la sphère ORL, de l'axe spinal et paraspinal et du pelvis, localisations de prédilection des CHSs (Pommier et al., 2010). C'est dans ces cas de figure que la RT joue un rôle majeur afin d'obtenir le Contrôle Local (CL) de la tumeur.

Les CHSs sont des tumeurs à évolution lente mais qui ont un fort potentiel métastatique ou de récurrence locale dans le cas des grades II et III (Gelderblom et al., 2008). Pour cette raison, la chirurgie est souvent associée à un traitement adjuvant, comme la chimiothérapie et/ou la RT. Ces derniers peuvent être, parfois, la seule alternative thérapeutique dans les cas de CHSs non opérables (localisés dans des régions sensibles comme le pelvis ou le rachis). Malheureusement, les CHSs sont très peu sensibles à la chimiothérapie et la RT. La chimiorésistance des CHS serait liée à l'expression de gènes de multi-résistance (Moussavi-Harami et al., 2006) mais aussi la présence de matrice extracellulaire, la faible vascularisation de ces tumeurs qui limitent l'accès des agents anti-cancéreux, ainsi que la présence de cellules à très faible taux de division. Ces deux derniers facteurs sont également responsables de la relative radiorésistance des CHSs. En effet, l'hypoxie (faible taux d'O₂) qui résulte de la faible vascularisation limite les effets directs des RTs par l'intermédiaire de

la production de ROS. De plus, les CHSs semblent résister à l'apoptose par la surexpression de gènes anti-apoptotiques ainsi que la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs tels p53 et p16 (Kim et al., 2007).

Malgré ces limitations, et surtout en raison du caractère inopérable de certains types de CHSs, la RT reste très utilisée dans le traitement de ces tumeurs. En pratique, une dose totale supérieure à 65 Gy en photons est nécessaire afin d'obtenir le CL de la tumeur (Le et al., 1997). Cependant, cette escalade de dose n'est pas possible si la tumeur est localisée près de structures neurologiques radiosensibles (voies optiques, tronc cérébral). Dans ces cas de figure, l'hadronthérapie a donné des résultats très prometteurs. (Tsuji and Kamada, 2012).

4.3) Expérience clinique de l'utilisation des hadrons dans le traitement des chondrosarcomes :

Une revue systématique des données cliniques de l'utilisation des hadrons (protons, ions carbone et autres ions lourds) a été réalisée sur PubMed avec les mots clés suivants : [(carbon OR proton OR « charged particle ») AND chondrosarcoma], à la fin décembre 2015. Seules les cohortes contenant plus d'un cas de CHS (toutes localisations confondues) ont été sélectionnées. Dans le cas de multiples publications de la même cohorte, seule la publication la plus récente a été citée. Le Tableau 3 résume les résultats de cette recherche. Etant donné la rareté de ce type de tumeur, les données cliniques sont souvent fusionnées avec d'autres histologies telles les chordomes (origine embryologique différente des CHSs). Quand l'information était disponible, nous avons noté les données spécifiques aux CHSs.

Institut	Auteur Années/Étude	Effectif	Localisation et grade de la tumeur	Protocole Dose totale Fractions	Contrôle local (CL) Survie globale (SG)	Toxicités
LBL	(Nowakowski et al., 1992) [1976-1987] R	Tot : 52 CHS : 12	Tumeurs du (ou à proximité du) rachis cervical, dorsal ou lombaire	(He ou Ne) + chirurgie ± ph-RT 29-80 CGE 4 f/s	<u>36 : traitement primaire</u> CL : 58 % SG 3 ans 61% <u>16 : suite à une récidive</u> CL : 44 % SG 3 ans 51%	11% des patients
	(Castro et al., 1994) [1977-1992] R	Tot : 126 CHS : 27	Tumeurs primaires de la base du crâne	(He ou Ne) + chirurgie ± ph-RT 60-80 CGE 2,0 CGE/f 4 f/s	<u>108 : traitement primaire</u> CL 5 ans 75% SG 5 ans 80% <u>18 : suite à une récidive</u> CL 5 ans 39% SG 5 ans 57%	[1977-1986] : 12/29 [1987-1992] : 11/55 des patients rescapés ont eu des complications de grade 3 à 5
	(Kamada et al., 2002) [1996,1999] I/II P	Tot : 57 CHS : 7	Sarcomes osseux et sarcomes des tissus mous <u>inopérables</u> (extrémités, rachis, pelvis)	C-ion 52,8 à 73,6 CGE 3,3-4,6 CGE/f 16 f en 4 s	CL 3 ans 73% (dont 5/7 CHS) SG 3 ans 46%	73,6 CGE : 7/17 patients (aigüe) et 4/17 patients (chronique) ont subi une toxicité cutanée de grade 3
	(Imai et al., 2011) [2000-2011] II P	Tot : 495 CHS : 81	Sarcomes osseux et sarcomes des tissus mous <u>inopérables</u> (extrémités, rachis, pelvis)	C-ion 64,0 à 73,6 CGE 4,0-4,6 CGE/f 16f en 4s	CL 5 ans 69% SG 5 ans 59%	Chronique: Réactions cutanées grade 3/4 (n=7) Mise à jour en 2013 : n=9
	(Imai et al., 2011) [1996-2009] I/II P	CHS : 71	CHS inopérables du tronc (rachis, bassin, cage thoracique)	?	CL 5 ans 60% SG 5 ans 60%	Chronique: Réactions cutanées grade 3/4 (n=4)
NIRS	(Jingu et al., 2012) [2001-2008] I/II P	Tot : 27 CHS : 2	Sarcomes osseux et sarcomes des tissus mous de la tête et du cou <u>inopérables</u>	C-ion 70,4 CGE 16 f en 4 s	CL 3 ans 91,8% SG 3 ans 74,1%	Aigüe: Grade 3 (n=1) Chronique: Grade 3 (n=5)
	(Hasegawa et al., 2011) [2001-2008] I/II [2008-2011] II P	Tot : 39 CHS : 3	Sarcomes osseux et sarcomes des tissus mous de la tête et du cou <u>inopérables</u>	C-ion 70,4 CGE 16 f en 4 s	CL 5 ans 73% SG 5 ans 48%	Aigüe: Mucosite de grade 3 (n=5)
	(Koto et al., 2011) [1997-2004] I/II [2004-2011] II P	Tot : 28 Tot : 48 CHS : 12	Tumeurs <u>résiduelles</u> ou <u>inopérables</u> de la base du crâne et du rachis en C1-C2	C-ion ± chirurgie I/II : 48,0 à 60,8 CGE II : 60,8 CGE 16 f en 4 s	CL 5 ans 88% (86% CHS) SG 5 ans 82% (63% CHS)	Aigüe: Réactions cutanées et mucosite de grade 3 (n=5) Chronique: Pas de toxicité > grade 3
GSI	(Schulz-Ertner et al., 2007) (Uhl et al., 2014) [1998-2008] I/II P	CHS : 79	CHS de la base du crâne (grades I et II) <u>résiduel après chirurgie</u>	C-ion + chirurgie 60 CGE (57-70 CGE) 3 CGE/f 7 f/s	CL 10 ans 88% SG 10 ans 78,9%	Aigüe : Mucosite grade 3 (n=1) Chronique : Grade 3 (n=1)
	(Rieken et al., 2011) [2009-2010] I/II P	Tot : 118 CHS : 18	Localisations variées. CHS de la base du crâne (n=17) ou du sacrum (n=1)	48 : C-ion 4 : p-RT 66 : ph-RT + C-ion boost ± chirurgie	ND	CHS : Pas de toxicité > grade 3
MGH	(Hug et al., 1995) [1980-1992] R	Tot : 47 CHS : 6	Tumeurs ostéogéniques et chondrogéniques du rachis	p-RT + ph-RT ± chirurgie 73,9 (55,3-82) CGE 1,8-2,0 CGE/f	CHS : CL 5 ans 100% CHS : SG 5 ans 100%	Chronique: Haut grade (n=4)
	(Wagner et al., 2009) [1982-2006]	Tot : 48 CHS : 15	Tumeurs du rachis (pelvique et sacré) et des extrémités	RT1 (20 Gy) + chirurgie + RT2 (50,4 Gy) p-RT et/ou ph-RT 1,8 Gy/f	CHS : CL 5 ans 67% CHS : SG 5 ans 58%	20% Retard de cicatrisation
	(DeLaney et al., 2014)	Tot : 50 CHS : 14	Sarcomes du (ou à proximité du) rachis	Chirurgie + p-RT ou ph-RT	CL 8 ans 74% SG 8 ans 52%	Chronique : 13% grade 3/4

	[1997-2005] II P		thoracique, lombaire ou sacré	72-77,4 CGE		
	(Munzenrider and Liebsch, 1999) [1975-1998]	CHS : 246	CHS de la base du crâne (n=229) et des vertèbres cervicales (n=17) de grade I	p-RT (4/5) + ph-RT (1/5) ± chirurgie 66-83 CGE 1,8 Gy ou 1,92 CGE/f 5 f/s	CL 10 ans 54% (cervical) 94% (base du crâne) SG 10 ans 48% (cervical), 88% (base du crâne)	5 ans post-trt : Squelette axial: 8% Nécrose lobe temporal: 13% Neuropathie optique : 4,4%
LLUMC	(Hug et al., 1999) [1992-1998] R	Tot : 58 CHS : 25	CHS de la base du crâne	Chirurgie + p-RT 70,7 CGE (64,8-79,2 CGE)	CHS : CL 92% CHS : SG 5 ans 100%	Chronique : 7% grade 3/4
MGH et LLUMC	(Hug et al., 2002) [1992-1999] R	Tot : 29 CHS : 3	Tumeurs pédiatriques de la base du crâne (dont CHS grade I ou II)	(p-RT + ph-RT) ou p-RT seule ± chirurgie 50,4-78,6 CGE 1,8-2,0 CGE/f	CHS : CL 5 ans: 100%	CHS : 0%
CPO	(Noël et al., 2004) [1995-2000] P	Tot : 90 CHS : 26	CH et CHS de la base du crâne et des vertèbres cervicales	Chirurgie + p-RT (1/3) + ph-RT (2/3) 67 CGE (22-70 CGE)	CHS : CL 3ans 91% CHS : SG 4 ans 86,3%	6% de toxicité de haut grade
	(Weber et al., 2015) R	CHS : 77	CHS de la base du crâne de grade I	p-RT 70 (64-76) CGE	CL 8ans 89,7% SG 8 ans 93,5%	Chronique : 7,8% de grade >3
PSI	(Rombi et al., 2013) [2000-2010] R	Tot : 26 CHS : 7	CH et CHS pédiatriques de la base du crâne et du rachis	p-RT + chirurgie 66 CGE (CHS) 4f/s (1,8-2,0 CGE)	CL 5 ans 80% SG 5 ans 75%	Chronique : 0% haut grade
SCC	(Fuji et al., 2011) [2003-2008] R	Tot : 16 CHS : 8	CH et CHS de la base du crâne	p-RT ± chirurgie 63 CGE (50-70 CGE) 1,8 CGE/f	CHS : CL 3 ans 86% CHS : SG 3 ans 100%	Pas de toxicité sévère
	(Holliday et al., 2015) [2006-2012] R	Tot : 19 CHS : 6	CH et CHS du rachis (cervical, thoracique, lombaire ou sacré)	Chirurgie + p-RT 70 (56-78) CGE	CL 2 ans : 58% SG 2 ans : 93,3%	?
MDA	(Grosshans et al., 2014) [2010-2011] P	Tot : 15 CHS : 5	CH et CHS de la base du crâne	p-RT CHS : 68,4 (66-77) CGE	CL : 90% CG : 100%	0% grade > 3
CNAO	(Tuan et al., 2013) [2011-2012] II P	Tot : 21 CHS : 5	CH et CHS <u>primaire</u> ou <u>en récurrence</u> de la base du crâne ou du rachis	p-RT 70-74 CGE 2 CGE/f 5 f/s en 35-37f	CL (2014) : 100%	Pas de toxicité > grade 2

Tableau 3: Récapitulatif de l'expérience clinique en hadronthérapie : focus sur les chondrosarcomes

CGE: Cobalt Gray Equivalent, CH: chordome, CHS: chondrosarcome, C-ion : radiothérapie par ions carbone, CL: contrôle local, CPO: Centre de protonthérapie d'Orsay (France), GSI : Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH (Allemagne), HIT: Heidelberg Ion Therapy Centre (Allemagne), LBL: Lawrence Berkeley Laboratory (USA), LLUMC: Loma Linda University Medical Center (USA), MDA: Monroe Dunway Anderson Texas (USA), MGH: Massachusetts General Hospital Boston (USA), ND : non déterminé, NIRS: National Institute of Radiological Sciences (Japon), P : étude prospective, p-RT : radiothérapie par protons, ph-RT : radiothérapie par photons, PSI: Paul Scherrer Institute (Suisse), R : étude rétrospective, SCC : Shizuoka Cancer Center (Japon), SG: survie globale.

Ces données démontrent une grande hétérogénéité dans la prise en charge thérapeutique [chirurgie ± hadronthérapie (protons, ions carbone, hélium ou néon) en association ou pas à de la ph-RT, parfois même associée à de la chimiothérapie] ainsi que la sélection des patients (tumeur primaire ou métastatique, âge, volume tumoral) inclus dans l'étude. Une autre critique peut également être faite quant à l'exclusion de patients de grade III des cohortes, alors que ce sont les patients qui ont le moins de chances de survie (29% à 10 ans). De plus, il apparaît une grande variabilité quant au type de fractionnement, les centres japonais préférant l'hypo-fractionnement (13 séances) et les centres européens plutôt des protocoles classiques en vue d'une éventuelle comparaison à des techniques de RT conventionnelle dans des essais cliniques randomisés. De plus, les valeurs d'EBR en ions carbone ne sont pas identiques d'un centre à un autre ce qui rend difficile la comparaison des différentes modalités et ne permet pas de trancher quant à la supériorité d'un protocole par rapport à un autre.

Cependant, les données recueillies sont encourageantes plus spécialement dans les cas de tumeurs inopérables ou en résection incomplète de la base du crâne de grade I ou II. En effet, des taux de CL allant de 73% à 100% et de SG de 48% à 100% ont été rapportés entre 2 et 10 ans. Des faibles taux de toxicité tardive de haut grade (3/4) ont été rapportés. Le rapport de la HAS (2010) estime que l'hadronthérapie par ions carbone serait potentiellement équivalente à d'autres techniques de RT de très haute technicité dans le cas précis des tumeurs de la base du crâne, en attendant une étude comparative afin de trancher définitivement. En ce qui concerne les sarcomes des tissus mous et du rachis, les taux de CL rapportés sont plus faibles, allant de 58% à 100% et une SG allant de 46% à 93,3% selon la nature de la tumeur (de 2 à 8 ans). Des toxicités tardives de haut grade ont été rapportées. Les doses le plus souvent utilisées sont comprises entre 60 et 70 CGE.

A notre connaissance un seul essai clinique comparant deux modalités d'hadronthérapie : protons *versus* ions carbone dans le traitement des CHSs de la base du crâne, est en cours de réalisation au centre HIT en Allemagne (identifiant : NCT01182753). Il s'agit d'un essai clinique de phase III randomisé monocentrique recrutant des patients souffrant de CHSs de la base du crâne de grade I ou II (Nikoghosyan et al., 2010). Ces patients seront traités par ions carbone (60 CGE \pm 5%) ou par protons (70 CGE \pm 5%). Les résultats de cette étude permettront de montrer la supériorité ou pas des ions carbone par rapport aux protons dans le traitement de ce type de tumeur.

5) Cartilage :

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés à l'effet des RIs sur le cartilage et plus particulièrement sur le cartilage articulaire. Les complications liées à l'irradiation des os et du cartilage en croissance suscitent un regain d'intérêt dans les domaines de la médecine et de la radiobiologie (Delanian and Lefaix, 2007). En effet, la RT (par photons ou hadrons) est un traitement adjuvant indispensable dans les cas de sarcomes inopérables (dont les CHSs) et un traitement alternatif dans le cas des sarcomes d'Ewing chez les enfants. Cependant, l'irradiation à hautes doses en photons d'un cartilage sain entourant les tumeurs peut induire des séquelles irrémédiables comme la soudure prématurée du cartilage de croissance et la déformation osseuse chez le petit enfant. De plus, les effets des hadrons sur le cartilage sont extrêmement peu documentés. Le nombre de patients traités par hadronthérapie ne cessera d'augmenter lors des prochaines années et cela justifie qu'on s'intéresse à l'impact de ce type de rayonnement sur un tissu sain aussi représenté que le cartilage dans le corps humain.

Le cartilage est un tissu conjonctif qui ne contient ni vaisseaux sanguins ni ramifications nerveuses. Il est composé très majoritairement d'un seul type cellulaire : les chondrocytes qui secrètent de la matrice extracellulaire (MEC). Ces cellules proviennent de la différenciation chondrocytaire de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs) retrouvées dans la moelle osseuse. En fonction de la composition de la MEC, on distingue trois types de cartilage chez l'homme adulte :

- Cartilage hyalin : retrouvé principalement au niveau du nez, des côtes, de la trachée, des bronches et des articulations. Le cartilage articulaire se trouve à la surface de l'os et est constitué d'une MEC riche en collagènes II, VI, IX, X et XI et en protéoglycanes. Il assure le glissement des pièces osseuses entre elles avec un faible coefficient de frottement.
- Cartilage élastique : retrouvé principalement dans l'oreille externe et l'épiglotte. Il est caractérisé, comme son nom l'indique, par la présence de fibres élastiques qui procurent une flexibilité au cartilage.
- Fibrocartilage : retrouvé au niveau des disques intervertébraux, à la symphyse pubienne et sur les ménisques des genoux. Il est très riche en fibres de collagène qui lui confèrent une grande résistance à la traction.

La Figure 12 récapitule les principales localisations des trois types de cartilage dans le corps humain (<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html>).

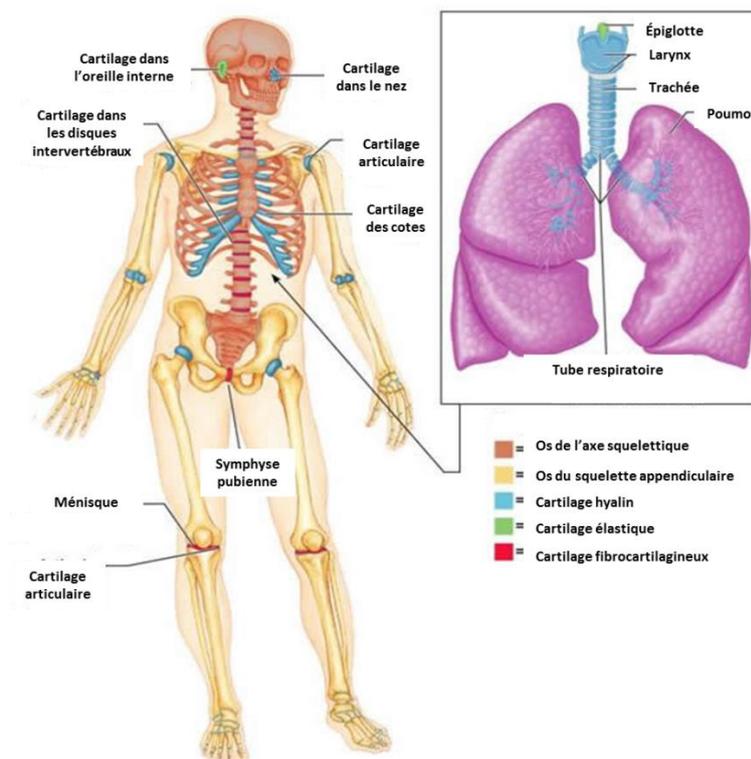


Figure 12: Localisation des différents types de cartilage dans le corps humain

Le cartilage hyalin est le plus étudié en médecine du fait de son abondance dans le corps humain et son importance dans le développement osseux. C'est également le premier tissu touché lors de l'arthrose, phénomène très répandu chez le sujet âgé. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes ainsi intéressés au cartilage hyalin et plus particulièrement au cartilage articulaire chez l'adulte.

5.1) Chondrogenèse et homéostasie du cartilage :

Le cartilage de croissance se localise aux deux extrémités des os longs en croissance à deux niveaux : la plaque de croissance (à la jonction entre la diaphyse et l'épiphyse) et le cartilage de croissance épiphysaire (où se situera le cartilage articulaire mature). La chondrogenèse est intimement liée au phénomène d'ossification endochondrale qui est à l'origine de la croissance en longueur des os. Le cartilage hyalin joue un rôle primordial dans la formation des os car il sert de matrice ou support initial et sera ensuite dégradé et remplacé par les ostéoblastes qui formeront l'os. La Figure 13 reprend les principales étapes de l'ossification endochondrale.

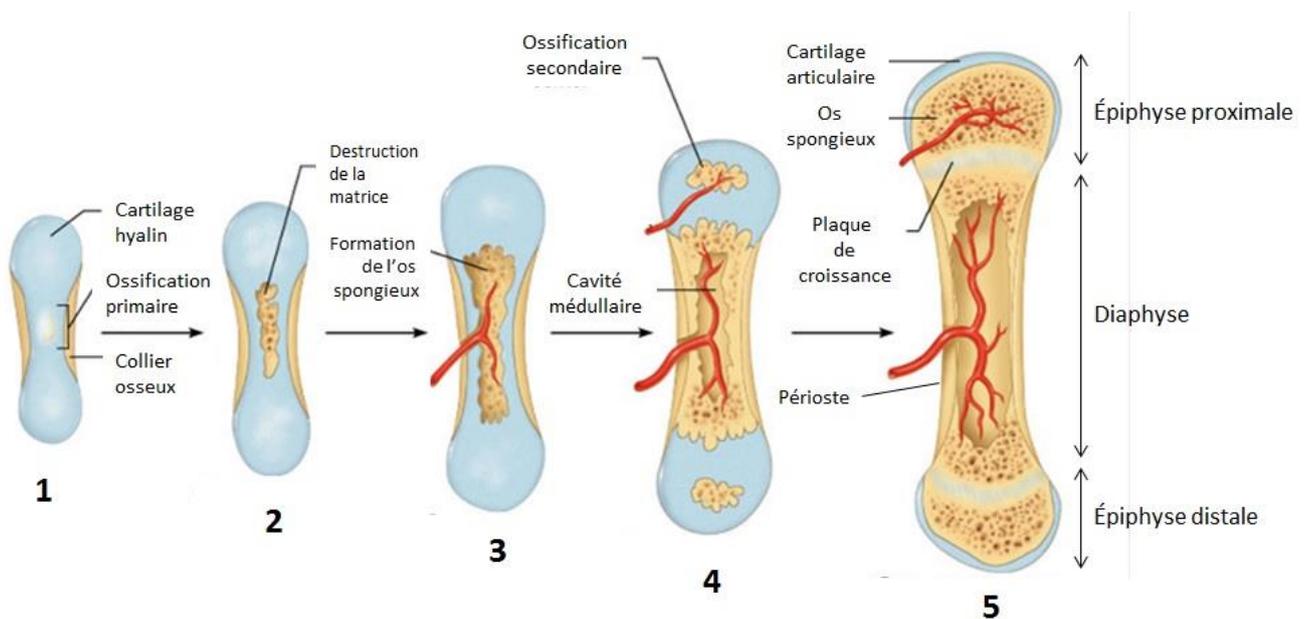


Figure 13: Ossification endochondrale

1. Formation du collier osseux autour de la matrice de cartilage hyalin. 2. Formation d'une cavité dans la partie moyenne de la matrice cartilagineuse, ce qui induit l'hypertrophie et la dégénérescence des chondrocytes. 3. Invasion des cavités internes par le bourgeon de périoste (périchondre) suite à la calcification du cartilage et formation d'os spongieux. 4. Formation de la cavité médullaire par les chondroclastes dans le cartilage calcifié. Apparition d'un site d'ossification secondaire au niveau de l'épiphyse. 5. Ossification de l'épiphyse. A la fin du processus d'ossification endochondrale, le cartilage hyalin persiste uniquement au niveau de la plaque de croissance et à l'extrémité de l'épiphyse (cartilage articulaire). La plaque de croissance disparaît à l'âge de la vingtaine. (<https://scoehealth.wikispaces.com/Bone+Formation>)

Dans un premier temps, nous allons décrire les composants chondrogéniques lors de l'ossification endochondrale (schématisées dans la Figure 14). Ensuite, nous nous focaliserons sur le cartilage épiphysaire qui formera le cartilage articulaire mature.

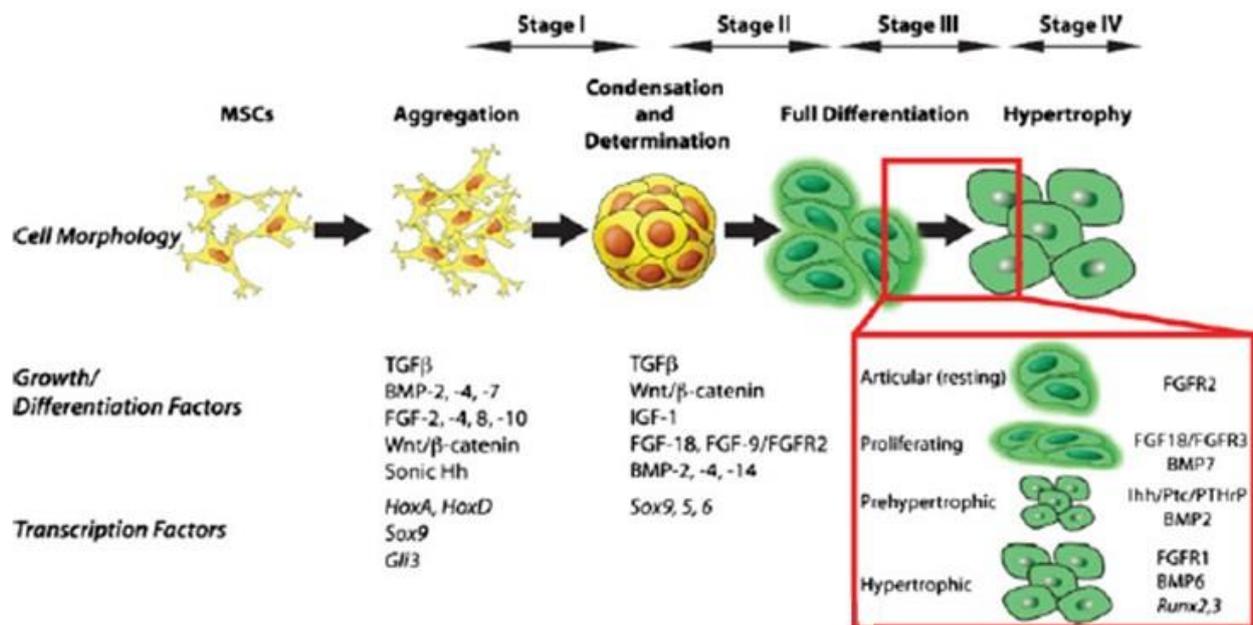


Figure 14: Différentes étapes de la chondrogenèse

Schéma temporel de la croissance, de la différenciation et des changements morphologiques qui aboutissent à la formation de chondrocytes différenciés. Adapté de (Gadjanski et al., 2012).

La différenciation des CSMs en chondrocytes matures et hypertrophiques implique des changements dans le microenvironnement local afin de guider les cellules (Figure 14), (Gadjanski et al., 2012) :

Etape 1. Condensation du pré-cartilage : Les CSMs secrètent une MEC riche en acide hyaluronique et collagène de type I. Ces cellules commencent à s'agréger ce qui induit leur arrêt de prolifération. Les CSMs remplacent l'expression de collagène de type I par des molécules d'adhésion type N-cadherin et N-CAM qui leur permettent de s'agréger. Cette étape est initiée par le facteur TGF-β1 (*Transforming Growth Factor*). C'est le début de la condensation du pré-cartilage qui est marquée par la baisse de synthèse d'acide hyaluronique aboutissant à la réduction de mouvements cellulaires et l'augmentation des interactions intercellulaires. Ces interactions induisent des signaux de transduction qui initient la différenciation chondrogénique. La condensation des CSMs est considérée comme l'évènement majeur dans l'engagement de ces cellules dans la lignée chondrogénique. Par ailleurs, Sox-9 est le facteur de transcription essentiel à la différenciation chondrocytaire et la formation de cartilage.

Etape 2. Détermination (en chondro-progénéiteur) et différenciation précoce : Les cellules au cœur du pré-cartilage arrêtent d'exprimer les molécules d'adhésion, prolifèrent de nouveau et initient la production de MEC et le processus de différenciation chondrogénique précoce (qui se déroule de manière centrifuge). En parallèle, les CSMs périphériques forment le périchondre (qui produit de nouveaux chondrocytes). A cette étape interviennent également de nombreux facteurs : FGF, Sox, BMP (*Bone Morphogenic Protein*) et TGF qui coordonnent de manière spatiotemporelle le destin de chaque type cellulaire.

Étape 3. Différenciation proprement dite : Durant cette étape, la production de fibronectine baisse et celle des collagènes de type II, IX et XI augmente. Les voies de signalisation Wnt, FGF, Shh (*Sonic HedgeHog*) et BMP agissent de manière séquentielle pour coordonner la différenciation de manière spatiotemporelle. En effet, durant la chondrogenèse, la balance entre les voies de signalisation BMP et FGF détermine le taux de prolifération ce qui ajuste la vitesse de différenciation. Les facteurs BMPs jouent un rôle très important car ils permettent d'initier la détermination en cellule chondro-progénitrice mais également la différenciation et les étapes plus tardives comme la maturation des chondrocytes et la différenciation terminale en chondrocyte hypertrophique.

Les hormones jouent également un rôle très important dans la prolifération des chondrocytes dans la plaque de croissance. L'hormone de croissance ou GH (*Growth Hormone*) induit la sécrétion d'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) par les chondrocytes de la plaque de croissance ce qui augmente la prolifération des chondrocytes mais est également responsable de l'augmentation de la taille cellulaire des chondrocytes hypertrophiques. L'IGF-1 est produit par les chondrocytes puis stocké au niveau de la MEC. En plus de la GH, l'hormone PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Peptide*) joue un rôle primordial lors de la chondrogenèse à l'étape embryonnaire. Cette hormone agit sur les mêmes récepteurs que l'hormone parathyroïdienne (PTH). Les cellules du péri-chondre et les chondrocytes en prolifération sécrètent la PTHrP qui a pour rôle principal de retarder la transformation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes pré-hypertrophiques et chondrocytes hypertrophique.

A la fin de l'étape 3, la matrice de cartilage s'allonge. La signalisation entre le péri-chondre et les chondrocytes différenciés au centre permet d'initier la maturation chondrocytaire et de préparer le premier site d'ossification (voir Figure 13). Ces chondrocytes passent par plusieurs phases de prolifération rapide puis arrêtent leur cycle cellulaire (chondrocytes post-mitotiques).

Étape 4. Hypertrophie : Les chondrocytes post-mitotiques changent leur morphologie, l'expression de leurs gènes et remodelent leur MEC afin de se transformer en chondrocytes hypertrophiques. Les cellules qui sont en passe de devenir hypertrophiques augmentent en taille et synthétisent une matrice calcifiée riche en collagène de type X et phosphatase alcaline (AP), à la différence des chondrocytes articulaire et des chondrocytes en prolifération qui synthétisent principalement du collagène de type II. Les chondrocytes hypertrophiques expriment des gènes spécifiques incluant MMP-13 (*Matrix Metalloproteinase-13*) et Runx2/3 qui influencent la minéralisation et répriment d'autres gènes tels que Sox9. La voie de signalisation PTHrP/Ihh (*Indian HedgeHog*) est responsable de la transformation des chondrocytes prolifératifs en hypertrophiques. Sa régulation spatiotemporelle fine lors du développement prénatal et postnatal permet d'atteindre un niveau significatif de chondrocytes en prolifération avant la phase d'hypertrophie. Les chondrocytes en phase d'hypertrophie terminale entrent enfin en apoptose. Les mécanismes de régulation épigénétiques sont également impliqués dans la chondrogenèse. A titre d'exemple, l'histone désacétylase

HDAC-4 empêche l'hypertrophie prématurée des chondrocytes par l'inhibition de l'activité des facteurs Runx2/3 suggérant que la modification d'histone peut influencer le processus d'ossification endochondrale.

Tout comme la chondrogenèse qui se déroule lors du processus d'ossification endochondrale, la formation de chondrocytes articulaires matures (au niveau de l'épiphyse) se déroule en plusieurs étapes et nécessite l'expression coordonnée de voies de signalisation qui permettent de guider la différenciation cellulaire. L'articulation synoviale ou diarthrose se développe de manière concomitante aux éléments qu'elle articule. La première étape appelée « détermination » comprend la transformation de cellules mésenchymateuses (même pool de cellules que les chondrocytes de la plaque de croissance et les ostéoblastes) en progéniteurs articulaires. La voie de signalisation TGF- β 2 (récepteur)/Wnt/GDF-5 (*Growth Differentiation Factor-5*) est nécessaire et suffisante pour diriger de manière définitive les progéniteurs articulaires vers cette voie de différenciation. La deuxième étape appelée « morphogenèse » comprend la différenciation des cellules de l'articulation et le développement de structures spécifiques.

Quelle que soit l'étape du développement, les chondrocytes du cartilage de croissance (plaque de croissance ou cartilage épiphysaire) sont organisés en zones distinctes avec une stratification particulière qui reflète les différentes phases de différenciation chondrocytaire. Une description plus détaillée de ces zones dans le cartilage articulaire mature se trouve plus loin (Figure 15).

En résumé, les facteurs TGF- β , FGF et IGF sont considérés comme les facteurs clé qui régulent la prolifération chondrocytaire, tandis que d'autres facteurs comme la BMP et la GH régulent la différenciation terminale. L'hormone PTHrP contrôle la transition de chondrocytes prolifératif à chondrocyte hypertrophique. Le déséquilibre de ces voies de signalisation pourrait perturber le développement et la croissance osseuse.

5.2) Composition du cartilage articulaire mature :

Le cartilage articulaire joue un rôle très important car c'est une surface lubrificatrice qui absorbe et transmet les forces mécaniques ce qui permet d'amortir les chocs. Le cartilage articulaire mature est organisé en 4 zones : une zone superficielle, une zone intermédiaire, une zone radiale et une zone calcifiée (Figure 15). C'est cette organisation particulière qui confère au cartilage articulaire ses propriétés mécaniques. Le composant principal du cartilage articulaire est son composant hyalin caractérisé par une apparence vitreuse quand il est observé microscope.

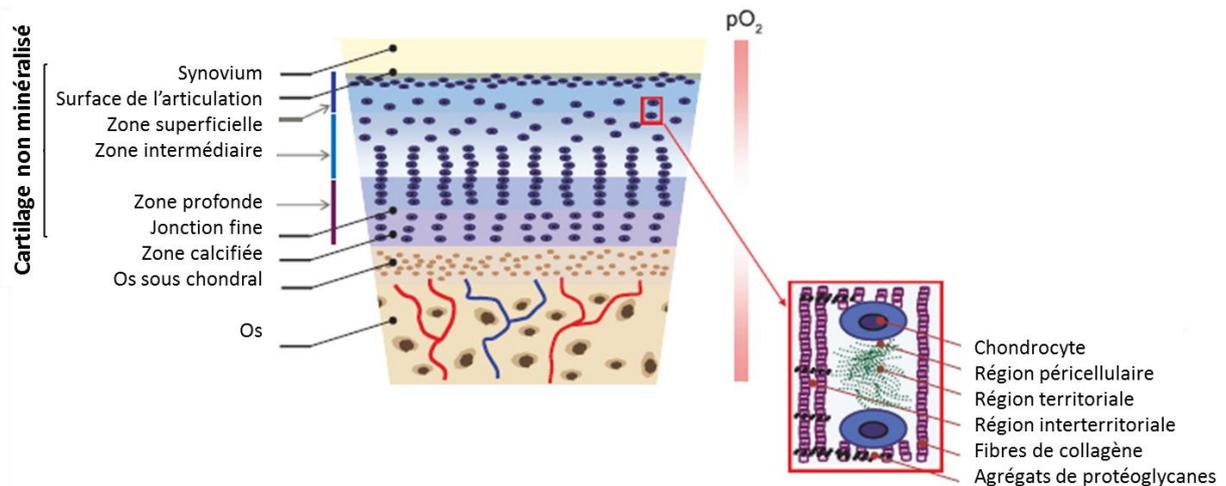


Figure 15: Composition du cartilage articulaire mature.

De la surface à l'os, la zone superficielle (10% du volume) contient de fines fibres de collagène orientées de manière tangentielle, une faible proportion de protéoglycanes et des chondrocytes petits et plats. La zone intermédiaire (60% du volume) est formée de protéoglycanes et de fibres de collagène plus épaisses organisées en couches parallèles et une faible proportion de cellules (rondes). La zone profonde est caractérisée par la plus grande proportion de fibres de collagène et d'aggrécane ainsi que la plus faible tension d'oxygène. La zone calcifiée du cartilage et l'os sous chondral sont des couches relativement fines qui ont un rôle de soutien du cartilage articulaire hyalin (Saintigny et al., 2015).

Dans un cartilage articulaire mature, les chondrocytes représentent seulement 1-2% du volume. Ce sont des cellules larges, rondes, différenciées et qui possèdent un métabolisme relativement hypoxique. Ceci est dû à l'absence de vascularisation et la faible tension d'oxygène qui en résulte (gradient de 10% à 1% d'oxygène de la partie superficielle aux zones les plus profondes, respectivement). Les nutriments sont apportés par diffusion du liquide synovial et de l'os sous-chondral à travers la MEC. Les chondrocytes élaborent et remplacent les composants de la MEC à un très faible taux de renouvellement (équilibre synthèse/dégradation), ce qui limite leurs capacités d'auto-renouvellement. Ces cellules peuvent également synthétiser des cytokines, chimiokines, alarmines et exprimer de nombreux récepteurs de surface pour cytokines et chimiokines et des récepteurs impliqués dans l'inflammation et la réponse au stress (Saintigny et al., 2015).

La MEC est un réseau complexe très hydraté de macromolécules. Elle est composée de :

- Collagène (60% du poids sec) : le composant majoritaire est le **collagène de type II** (80% des collagènes), mais également collagène de type IX et XI (15%) et d'autres types (III, XII, VI, etc.)
- Protéoglycanes ou PGs (5-10% du poids sec) : le composant majoritaire est l'**aggrécane** (90% des PGs) mais également fibromodulin, lumican, biglycan et perlecan.
- Glycoprotéines ou GPs
- Glycosaminoglycanes ou GAGs

Cette matrice est très hydratée, l'eau représentant 65-80% du poids total de la MEC (Demoor et al., 2014). Bien qu'elle soit très dense, la MEC possède des propriétés élastiques. Sa capacité à se déformer permet d'éviter les frictions entre les os. La composition de cette MEC dans le cartilage articulaire mature est variable en fonction de la zone : les chondrocytes sont entourés de matrice péricellulaire formée principalement de protéines non collagéniques. La matrice péricellulaire est couverte de matrice territoriale composée de quelques fibres de collagène. Cette organisation permet l'ancrage des chondrocytes à la matrice interterritoriale, à l'aide des protéoglycanes (syndecan, glypican), entre autres, qui occupent la majorité de l'espace (Figure 15). La matrice permet également de stocker et libérer des facteurs solubles.

Les mécanismes qui régulent la différenciation chondrogénique comprennent des composants intrinsèques (cellulaires) et extrinsèques (microenvironnement) (Djouad et al., 2007). Les communications intercellulaires directes n'existent pas dans le cartilage articulaire mature. A défaut, les chondrocytes sont liés à la MEC par des récepteurs de surface tels les intégrines. Ces interactions dépendent du type d'intégrine exprimé à la surface cellulaire et la composition de la MEC entourant la cellule (Djouad et al., 2007). De plus, les activités anaboliques et cataboliques du chondrocyte sont affectées par le microenvironnement de différentes manières :

- Facteurs solubles : vitamines, hormones, cytokines, facteurs de croissance, inflammatoires et de différenciation
- Tension d'oxygène (pour plus de détails, voir page 55)
- Ancrage à la matrice
- Stress mécanique

L'altération du microenvironnement modifie les activités métaboliques des chondrocytes (déséquilibre entre la dégradation et la synthèse de MEC), pouvant aboutir à la destruction du cartilage, la perte de ses propriétés mécaniques et au phénomène d'ostéoarthrose. En effet, des études ont montré que la modification de la rigidité de la MEC pouvait modifier le phénotype chondrocytaire (Maldonado and Nam, 2013) via la régulation de la signalisation TGF- β (Allen et al., 2012). Par ailleurs, la sensibilité des chondrocyte au stress mécanique pourrait expliquer la dé-différenciation (perte du phénotype chondrocytaire) classiquement observée en culture 2D (Das et al., 2008).

Il est intéressant de noter que de récentes études ont montré que le cartilage articulaire mature contenait des cellules CD90⁺ et CD166⁺ (marqueurs de cellules souches) qui ont la capacité de se différencier en chondrocytes articulaires matures dans les zones superficielles et profondes du cartilage (Figure 15). Ces études suggèrent que les CSMs persistent dans le cartilage mature (3,5% des constituants cellulaires) et contribuent à la réparation locale des microlésions (Demoor et al., 2014).

En conclusion, en dépit d'une structure assez simple, le cartilage articulaire est un tissu complexe dont la composition de la matrice et l'organisation cellulaire permettent de maintenir l'homéostasie de ce tissu. Cette

dernière est définie comme l'état dans lequel la composition de la MEC permet de répondre au stress mécanique sans induire de dommages structurels ou cellulaires. L'exposition de ce tissu aux RIs peut perturber un tel équilibre et aboutir à des retards de croissance ou à une dégénérescence accélérée du cartilage (ostéoarthrose).

5.3) Impact des rayonnements ionisants sur le cartilage articulaire mature :

L'effet des RIs de bas TEL (photons) sur le cartilage et plus particulièrement sur la production de MEC a été longuement étudié. Cependant, les modèles d'étude sont difficiles à comparer du fait de :

1. L'hétérogénéité des critères biologiques et/ou de la sensibilité des méthodes utilisées
2. L'irradiation en RX de faible kilovoltage par opposition à des RX de mégavoltage
3. L'utilisation de chondrocytes articulaires *versus* chondrocytes de la plaque de croissance
4. L'hétérogénéité des protocoles d'irradiation et de la cinétique post-irradiation (irradiation à haute dose et mesure à court terme *versus* irradiation fractionnée à faible dose et mesure plusieurs semaines post-irradiation)
5. Le très faible nombre d'études basées sur l'humain en comparaison aux études *in vitro* et *in vivo*

Les premières études de radiobiologie du cartilage se sont intéressées aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt de croissance osseuse liée à l'irradiation, en se focalisant sur la balance synthèse/dégradation qui intervient dans la régulation de la composition de la MEC. Cependant, des résultats contrastés ont été décrits en fonction des modèles d'étude et des temps post-irradiation. En utilisant un modèle de tibia d'embryon de poulet, Cornelissen (Cornelissen et al., 1990) et De Craemer (De Craemer et al., 1989) ont décrit la synthèse de collagène et de PG comme un phénomène radiorésistant (dose flash de photons jusqu'à 150 Gy). La synthèse de GAG semblait être diminuée uniquement à des temps tardifs (4-7 jours post-irradiation). De manière contrastée, la diminution de la synthèse de GAG dans un modèle de cartilage articulaire canin (10-500 Gy en photons) a été décrit comme un phénomène plus précoce (Hugenberg et al., 1989). Il a été suggéré que ces changements pouvaient être dus à un déséquilibre de la balance synthèse/dégradation de la MEC par les chondrocytes.

Des études plus récentes se sont focalisées sur l'altération du phénomène d'ossification endochondrale qui semble être la cause majeure du retard de croissance radio-induit. L'irradiation de la plaque de croissance dans un modèle murin abouti à une désorganisation de la structure en colonne, la disparition de la zone de prolifération et la différenciation terminale prématurée (hypertrophie) des chondrocytes suivie par la mort cellulaire (Amizuka et al., 1994). Ces effets délétères sur la prolifération et la maturation des chondrocytes de la plaque de croissance ont été liés à une perte des signaux de prolifération (voie PTHrP/Ihh) plutôt qu'à une altération de la synthèse de la MEC (Pateder et al., 2001). Les travaux de Damron et associés ont grandement contribué à l'étude du devenir du cartilage de croissance post-irradiation et par extension aux séquelles osseuses radio-induites chez l'enfant (Damron et al., 2009; Horton et al., 2008; Margulies et al., 2006).

Cependant, ces données ne sont pas forcément pertinentes dans la radiobiologie du cartilage articulaire mature étant donné les différences dans la distribution cellulaire et l'état de différenciation (quiescence) des chondrocytes articulaires. Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur le cartilage articulaire mature.

L'exposition aux RIs des chondrocytes articulaires différenciés peut modifier leur métabolisme et aboutir à la dégénérescence tissulaire. En effet, les RIs peuvent perturber l'homéostasie du cartilage articulaire à plusieurs niveaux que nous décrirons brièvement ci-dessous. Pour une revue plus détaillée de l'impact des RIs de bas TEL sur le cartilage articulaire mature, nous avons joint une copie de (Saintigny et al., 2015) à la fin de ce manuscrit.

Maturation du cartilage : Des études ont montré que la sensibilité des chondrocytes de la plaque de croissance aux RIs de bas TEL dépendait de leur niveau de différenciation (prolifération, hypertrophie), alors que les chondrocytes articulaire l'étaient beaucoup moins (Hiranuma et al., 1996; Jikko et al., 1996). Matsumoto et associés ont montré que la synthèse d'ADN était plus radiosensible que la synthèse de MEC (GAG) dans un modèle de cartilage articulaire de lapin (2D en comparaison à des pellets, RX 2-10 Gy) (Matsumoto et al., 1994).

Survie et morts cellulaires : En plus de l'altération de la prolifération (arrêt permanent du cycle cellulaire) et de la différenciation cellulaires, les RIs peuvent accélérer les voies de morts cellulaires. Les RIs peuvent induire un ou plusieurs types de morts en fonction du type cellulaire, du type de rayonnement ainsi que de sa dose et son fractionnement. Plusieurs études ont décrit les chondrocytes articulaires normaux comme résistants à l'apoptose suite à une irradiation en bas TEL : 10 Gy en rayons γ (48h) (Toda et al., 2002), 5 Gy en rayons γ (Moussavi-Harami et al., 2006), 10 Gy en rayons γ (Kim et al., 2007), 30 Gy en RX (Takahashi et al., 2003). Par contre, l'apoptose radio-induite a été observée dans des chondrocytes articulaire ostéoarthritiques (Toda et al., 2002) et des chondrocytes de la plaque de croissance dans un modèle murin (Margulies et al., 2006).

En plus de l'apoptose, les RIs peuvent induire la sénescence caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire et associée à plusieurs phénotypes, à savoir la surexpression de la β -galactosidase, le raccourcissement des télomères et des modifications métaboliques. Les cellules sénescents secrètent des facteurs spécifiques comme des cytokines pro-inflammatoires ou MMPs (Mirzayans et al., 2013). Une étude récente a montré que l'irradiation en RX (10 Gy) induisait l'accumulation de la protéine p53 et sa forme phosphorylée (Ser-15) et l'activation de p21 dans des chondrocytes articulaires (Hong et al., 2010). Une induction de la sénescence radio-induite accompagnée qu'une activation de la protéine pRb par p16 ont également été observés par ces auteurs, ainsi qu'une perte du phénotype chondrocytaire (baisse de l'expression de collagène type II et sox9). Une activation permanente de l'expression de la protéine pRb régule négativement E2F, facteur de transcription de gènes spécifiques à la phase S. Cette même étude

(Hong et al., 2010) a démontré le rôle de la sirtuine (SIRT1), désacétylase NAD-dépendante impliquée dans le phénomène de vieillissement, dans la sénescence radio-induite des chondrocytes articulaires normaux. L'accumulation de cellules sénescents post-irradiation du cartilage pourrait être responsable d'une accélération du phénomène d'ostéoartrrose.

Stress oxydatif : L'hypoxie est un facteur important qui limite l'efficacité de la RT. Comme nous l'avons précédemment décrit, le cartilage articulaire mature est organisé en plusieurs zones qui définissent un gradient d'oxygène qui va de 10% à 1% de la zone la plus superficielle à la plus profonde (Figure 15). Cette organisation peut influencer la quantité de ROS produite en fonction de la zone concernée par l'irradiation et ainsi modifier l'étendue des dommages faits au cartilage. Le facteur de transcription FoxO a été impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire induite par un stress oxydatif (Akasaki et al., 2014). L'étude de (Hong et al., 2010) précédemment citée a également démontré une augmentation significative de la quantité de ROS post-irradiation probablement responsable de la sénescence radio-induite. Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées en normoxie (20% d'O₂), qui on le sait, ne représente pas la physioxie tissulaire du cartilage articulaire. Enfin, l'augmentation de la production de ROS post-irradiation est potentiellement responsable de la baisse de synthèse de MEC (Henrotin et al., 2005).

Composition de la MEC : L'exposition aux rayonnements ionisants induit une dégradation active du cartilage et globalement une baisse de la production de MEC. En effet, Cornelissen et associés ont démontré qu'une irradiation en RX (20-100 Gy) induisait une baisse de synthèse de GAG et de collagène de type II (Cornelissen et al., 1993a, 1993b). La baisse de la synthèse de collagène de type II a été associée à une augmentation de la production de collagène de type I, surtout dans les espaces péri-cellulaires des chondrocytes ce qui induit une désorganisation de la structure fibrillaire et une perte des propriétés mécaniques du cartilage mature (Muhonen et al., 2006). Une autre étude a montré qu'une irradiation fractionnée à plus faible dose (5 Gy, 1 Gy/f/jour) d'un genou de lapin ne modifiait pas ces propriétés mécaniques à court et moyen terme mais altérait l'organisation des chondrocytes (Öncan et al., 2013). Tous ces phénomènes sont susceptibles d'induire ou d'accélérer l'ostéoartrrose.

Inflammation : L'inflammation est un phénomène complexe et central dans la survenue des effets toxiques immédiats lors d'une irradiation. Les cellules irradiées sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines (IL-6) suite à la persistance des dommages à l'ADN (Rodier et al., 2009). Les chondrocytes sont capables de produire les médiateurs inflammatoires ainsi que leurs récepteurs (Houard et al., 2013) afin de maintenir un parfait équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants matriciels du cartilage grâce aux cytokines. L'environnement inflammatoire du cartilage peut aboutir dans le cas extrême à la dégradation de la MEC (Maldonado and Nam, 2013).

L'hadronthérapie par ions carbone offre de nombreux avantages balistiques et biologiques, comme nous développé plus haut (voir page 23). Cependant, les études de l'effet des ions carbone sur les tissus sains et sur le cartilage en particulier sont négligeables, ce qui pose la question de séquelles potentielles (Durante, 2014; Yanagi et al., 2010). Récemment, un cas de nécrose massive du larynx suite à un traitement par ions carbone [70 Gy(RBE) en 35 fractions] pour un carcinome squameux de la glotte a été décrit (Demizu et al., 2015). L'imagerie a montré l'absence de cartilage aryénoïde (qui entoure le larynx) et une exacerbation de la nécrose du larynx, ce qui a nécessité une reconstruction chirurgicale d'une partie des voies respiratoires (pharynx, larynx). Les auteurs ont conclu que des organes contenant du cartilage et qui se trouvent sur le trajet du faisceau d'ions carbone (comme le larynx dans ce cas) doivent être particulièrement épargnés lors de ce type de protocole.

A ce jour, un seul laboratoire s'est penché sur la question des effets des ions carbone sur le cartilage dans un contexte de traitement de CHS (Sawajiri and Mizoe, 2003; Sawajiri et al., 2003, 2006, 2007). En utilisant un modèle de rat "Wistar", cette équipe a comparé les effets d'une irradiation à forte dose ou irradiation « flash » (15, 22,5 et 30 Gy) en ions carbone *versus* irradiation γ sur le métabolisme osseux et cartilagineux. Les auteurs ont conclu que l'irradiation à forte doses d'ions carbone pouvait affecter le métabolisme des ostéoblastes et des chondrocytes par la réduction de l'expression de MMP-13 ce qui a pour conséquence de supprimer la maturation du cartilage. Etant donné le nombre très limité d'études d'hadronbiologie du cartilage et au regard du nombre croissant de patients traités par ions carbone, il nous semble indispensable de développer des études *in vitro* et précliniques afin d'assurer la sécurité des patients et optimiser, au mieux, l'utilisation de cette technologie.

Comme nous en avons discuté plus haut (page 34), les modèles 3D sont de plus en plus utilisés en radiobiologie afin de mimer au mieux l'environnement le plus proche de l'homéostasie humaine. Ces modèles sont également très utilisés en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire afin de maintenir le phénotype chondrogénique en vue d'une éventuelle greffe chirurgicale (Demoor et al., 2014).

5.4) Ingénierie du cartilage et développement de modèles 3D :

La dégénérescence du cartilage articulaire peut avoir de nombreuses causes dont notamment, le trauma, l'âge et l'exposition à des RIs. De nombreux aspects doivent être pris en compte dans la prise en charge médicale de l'ostéoarthrose : l'architecture particulière de la MEC qui lui confère ses propriétés mécaniques et les capacités limitées de réparation du cartilage articulaire. L'approche thérapeutique dépend de la gravité des dommages. En cas de trauma grave ou de maladie congénitale, les orthopédistes ont recours à des prothèses ou des greffes de cartilage (souvent à partir des côtes). En cas de lésions moins graves, les chirurgiens tentent de favoriser les processus naturels d'autoréparation du cartilage. Cependant, de nombreuses limitations ont été décrites : infections, rejets de greffe, durée de vie limitée des implants et coût élevé de l'opération. Ainsi, il n'existe pas de protocole de référence capable de restituer du cartilage endommagé à l'état d'origine.

Paradoxalement, les facteurs qui limitent l'autoréparation du cartilage mature, à savoir, l'absence de vascularisation, la densité de la MEC et la présence d'un seul type cellulaire, en font une cible pertinente pour l'ingénierie tissulaire.

L'ingénierie tissulaire permet d'obtenir un tissu à partir de cellules spécifiques en leur apportant un environnement artificiel proche du microenvironnement naturel. Les techniques les plus utilisées se basent sur des matrices dopées en facteurs exogènes. Ces matrices doivent permettre l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires. Dans le cas de l'ingénierie du cartilage, l'architecture de la matrice doit permettre de stimuler les chondrocytes afin qu'ils produisent une nouvelle MEC dont les caractéristiques mécaniques sont proches du cartilage natif. La première étape en ingénierie tissulaire du cartilage consiste à extraire les chondrocytes primaires humains par digestion enzymatique de la MEC. Cependant, au fil des passages successifs, les chondrocytes ont tendance à se dé-différencier (perte progressive des marqueurs de différenciation tels que le collagène II). Les matrices 3D servent à restaurer et maintenir le phénotype chondrogénique en vue d'une éventuelle greffe chirurgicale (Demoor et al., 2014).

La taille, la forme, la porosité et la biocompatibilité de ces matériaux sont des critères importants qui doivent être pris en compte. Le biomatériau doit être capable de s'intégrer au site potentiel de la greffe et idéalement se dégrader à la même vitesse que se forme le nouveau cartilage. De nombreux biomatériaux ont été utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage : l'agarose, l'alginate, l'acide hyaluronique, la gélatine, les dérivés du collagène et les matrices acellulaires de cartilage. Leurs inconvénients résident dans leur résistance mécanique, leur potentiel antigénique (rejet de greffe ou dégradation du matériau par le corps) et le risque infectieux suite à la greffe.

Les biomatériaux à base de collagène (I et II) sont de plus en plus utilisés depuis deux décennies en raison de la prédominance du collagène dans la composition de la MEC cartilagineuse (Demoor et al., 2014). Depuis quelques années le collagène ponté est utilisé en raison de sa résistance mécanique augmentée et sa plus faible dégradation.

5.5) Rôle de l'hypoxie dans l'homéostasie du cartilage et l'ingénierie tissulaire :

L'effet de l'hypoxie sur la formation et l'homéostasie du cartilage a été longtemps inexploré bien que les chondrocytes soient exposés de manière chronique à une faible tension d'oxygène. Ces cellules sont capables de « sentir » le niveau d'oxygène grâce à des enzymes, les prolyl-hydroxylases (PHD), dont l'activité dépend de la tension d'oxygène. Ces enzymes hydroxylent la protéine HIF- α (*Hypoxia-Inducible Factor*) qui est alors reconnue par la protéine pVHL (activité E3 ubiquitine ligase) qui adresse la protéine HIF- α au protéasome pour être dégradée (Bühring et al., 2007). En condition hypoxique, l'activité de la PHD baisse ce qui conduit à l'accumulation de HIF- α (-1, -2 et -3) dans le cytosol. Ce dernier se lie au facteur constitutif HIF-1 β pour former un hétéro-dimère qui migre dans le noyau par translocation. Ce complexe se lie alors à des éléments de réponse à l'hypoxie appelés HRE (*Hypoxia-Responsive Elements*) situés au niveau de gènes cibles dont

l'expression permet de switcher à un métabolisme glycolytique. L'expression de HIF-1 α est indispensable tout le long du processus de chondrogenèse. En effet, la faible tension d'oxygène, retrouvée dans la plaque de croissance, induit la sécrétion de VEGF (crucial pour la survie des chondrocytes) *via* HIF-1 α (Schipani et al., 2001). Ce dernier facteur contrôle également la composition de la MEC par la régulation de l'expression de collagène de type II et d'aggrécan (Pfander et al., 2003). De plus, HIF-1 α joue un rôle central dans la maturation du collagène car il induit la *collagen-prolyl-4-hydroxylase*, enzyme responsable du pontage du collagène dans la plaque de croissance (Aro et al., 2012; Bentovim et al., 2012).

L'hypoxie a un rôle anabolique sur les chondrocytes articulaires humains par l'induction de la synthèse de collagène de type II et d'aggrécan. Des études *in vitro* ont démontré l'effet anti-catabolique de l'hypoxie par l'inhibition de la dégradation du cartilage (Thoms et al., 2013). De plus, le facteur HIF-1 α est responsable de la diminution de Col1a1 (gène du collagène de type I), limitant ainsi la dédifférenciation associée à la culture chondrocytaire en monocouche (Duval et al., 2009). Par ailleurs, la combinaison de la culture 3D et d'une faible tension d'oxygène accroît considérablement la synthèse de collagène de type II, d'aggrécan et de Sox9 en comparaison à la culture en monocouche (Legendre et al., 2013; Malladi et al., 2006). L'hypoxie peut également agir sur le métabolisme chondrocytaire, en combinaison avec des facteurs de croissance tels que la BMP-2 qui accentue le dépôt de collagène de type II (Demoor et al., 2014). La combinaison de ces facteurs (hypoxie, culture 3D et facteurs de croissance) semble donc une bonne approche afin de recréer un environnement favorable pour recréer un cartilage articulaire proche de l'homéostasie humaine.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le modèle de cartilage articulaire en éponge de collagène (I/III) développé par l'équipe de P. Galéra au CHU de Caen (Legendre et al., 2013; Ollitrault et al., 2014). Ce modèle prend en compte les propriétés chondrogéniques du collagène de type I/III (Freyria et al., 2009) et la physioxie tissulaire du cartilage. La procédure consiste à cultiver des cellules de cartilage en éponge de collagène (Symatèse Biomatériaux, Chaponost, France) à 2% d'O₂, dans un milieu pauvre en sérum (2% de sérum de veau fœtal) supplémenté d'un facteur de différenciation chondrogénique, la BMP-2. La MEC étant formée principalement de fibres de collagène, ces dernières représentent le microenvironnement naturel des chondrocytes. Comparé à la culture classique en 2D, cette équipe a démontré l'avantage de la culture 3D associée à la physioxie à 2% d'O₂ et à des facteurs chondrogéniques, dans la re-différenciation chondrogénique et la synthèse de MEC de composition proche du cartilage humain. Une telle matrice poreuse procure un environnement 3D idéal pour la stabilité des chondrocytes et permet un transfert de nutriments et des déchets du métabolisme cellulaire.

Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons le terme normoxie pour une tension d'oxygène de 20% et le terme physioxie pour une tension de 2%.

6) Description et objectifs du projet :

Ce projet a pour ambition d'étudier la dépendance des réponses cellulaires à court terme des chondrocytes articulaires sains et pathologiques (CHS) à la nature du faisceau (TEL) dans le contexte d'une hadronthérapie par ions carbone. Ceci dans un modèle expérimental *in vitro* adapté, proche de l'homéostasie humaine. En effet, l'influence du microenvironnement sur la réponse cellulaire aux RIs est documentée dans les modèles *in vivo* mais l'est beaucoup moins *in vitro*, spécialement dans le cas des sarcomes. En l'occurrence, la croissance cellulaire en 3D (Storch et al., 2010) ainsi que le pourcentage d'oxygène (Wilson and Hay, 2011) sont des paramètres majeurs à prendre en compte car ils influencent fortement la radiosensibilité des cellules.

Afin de reproduire les conditions de physioxie cellulaire, les cellules ont été, dans un premier temps, irradiées (à dose unique) en culture 2D à 2% d'O₂ comme références internes, puis en culture 3D dans ces mêmes conditions de physioxie. Concernant le choix des RIs, nous avons sélectionné des RIs de TEL intermédiaire pour mimer l'énergie à l'entrée du faisceau, dans les tissus sains. Nous avons également retenu des RIs de haut TEL qui permettent de mimer l'énergie déposée dans le volume de la tumeur (pic de Bragg). Les RX ont été utilisés comme référence en bas TEL. Dans ce projet, nous nous sommes focalisés sur la recherche d'une réponse cellulaire différentielle liée au TEL en culture 3D *versus* culture 2D. Il est important d'étendre les connaissances sur la radiobiologie du cartilage et du CHS et plus spécialement suite à une irradiation par des hadrons, domaine quasiment inexploré, même en culture classique monocouche. *In fine*, les résultats de cette étude pourraient servir de référence *in vitro* en RX et en hadrons pour l'optimisation de logiciels de planification de traitement et contribuer à l'évaluation des risques de séquelles en RT et en onco-pédiatrie. La sécurité des patients exposés aux radiations ionisantes lors de protocoles de RT est un enjeu sanitaire majeur.

Compte tenu des contraintes expérimentales, les résultats sont présentés selon une progression thématique et non chronologique de réalisation.

MATERIELS ET METHODES :

1) Culture cellulaire :

Dans le cadre de ce projet, deux types cellulaires ont été utilisés : la lignée de CHS SW1353 (#300440, CLS, Eppelheim, Allemagne) et des cellules primaires de Chondrocytes Articulaires Humains ou CAH (#402K-05a, CellSystems, Troisdorf, Allemagne). La lignée SW1353 a été isolée par A. Leibovitz en 1977 à partir d'un CHS primaire de grade II provenant de l'humérus droit d'une femme caucasienne âgée de 72 ans (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-94.aspx?geo_country=fr). La lignée SW1353 est définie comme diploïde, mutante pour p53 et p16 négative. Les cellules primaires, quant à elles, proviennent de deux donneurs sains (sans pathologie connue ou apparente), mâles et caucasiens (39 ans pour le premier donneur et 50 ans pour le deuxième donneur).

La culture cellulaire et l'irradiation ont été effectuées en normoxie ou en physioxie. La culture normoxique s'est faite dans un incubateur classique à 5% CO₂, 95% air et la culture physioxique dans un incubateur tri-gaz Heracell™ 150i (Thermoscientific, Waltham, USA) à 5% CO₂, 2% O₂ et 93% N₂. Les cellules ont d'abord été amplifiées en monocouche pour servir aux irradiations en 2D ou à l'ensemencement dans les éponges de collagène.

1.1) Culture cellulaire en 2D :

Le fournisseur de SW1353 a initialement cultivé cette lignée dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplémenté de L-glutamine (2 mM), de Sérum de Veau Fœtal ou SVF (10%) et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline V et 100 µg/mL de streptomycine). Cependant, afin de maintenir les mêmes conditions expérimentales que les chondrocytes primaires, nous avons adapté graduellement cette lignée à un milieu standardisé **B** (composition détaillée dans le Tableau 4) pour constituer un stock. Durant l'amplification, les SW1353 ont étéensemencées à $1,3 \times 10^4$ cellules/cm² en flasque de 75 cm² et maintenues à 37°C en atmosphère humide normoxique à raison de deux passages par semaine. Au bout de 10 passages, une nouvelle ampoule a été décongelée afin d'éviter une dérive génétique de la lignée.

Les CAH, quant à eux, ont été cultivés directement dans du milieu de culture pour chondrocytes (**B**). Une étape d'adaptation ne fut donc pas nécessaire. La faible capacité de doublement des cellules primaires ont contraint de limiter leur culture à 4 passages au maximum avant leur utilisation pour l'irradiation en 2D ou l'ensemencement dans les éponges de collagène pour les modèles 3D. Au-delà, les chondrocytes atteignent un état de dé-différenciation irréversible. Comme pour les SW1353, l'amplification en 2D a été réalisée en normoxie à 37°C en utilisant le milieu standardisé **B** à raison de 8000 cellules/cm².

L'Accutase™ (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) a été utilisée afin de détacher les cellules des flasques 2D. Elle contient des enzymes protéolytiques synthétiques mais pas de produits d'origine bactérienne

ou de mammifères. A la différence de la trypsine, l'accutase ne nécessite pas une inactivation par du milieu de culture. Cependant, parce qu'elle ne contient pas toutes les enzymes protéolytiques de la trypsine, la quantité utilisée et la durée de traitement varie en fonction du type cellulaire. Dans le cas des SW1353, 1 ml d'accutase/flasque de 75 cm² confluente suivie de 2 min à 37°C (activation des enzymes protéolytiques) suffit à détacher les cellules. Dans le cas des CAH, 2 ml d'accutase/flasque de 75 cm² confluente suivie de 5-10 min à 37°C sont nécessaires pour détacher les cellules.

Le temps de doublement (G) a été déterminé pour les deux types cellulaires comme suit : le premier jour, les cellules sont mises en plaque à 2,5x10⁴ cellules/puits de plaque 6 (duplicat) en culture normoxique ou physioxique (J₀). Les cellules sont cultivées pendant 2, 3, 4 ou 5 jours avec un changement de milieu tous les deux jours pour les CAH. Le temps de doublement spécifique μ est déduit de l'équation suivante :

$$X_t = X_0 * e^{\mu t}$$

X_t : nombre de cellules à l'instant « t » et X_0 : nombre de cellules à l'instant 0.

La valeur μ permet ensuite de calculer le temps nécessaire aux cellules pour doubler de population (valeur G) sachant que :

$$\mu = \frac{\ln(2)}{G}$$

1.2) Culture cellulaire en 3D :

En plus de la culture classique en 2D, les CAH et les SW1353 ont été cultivés en 3D pour former un Modèle 3D de Cartilage (M3DCa) et un Modèle 3D de CHS (M3DC). Pour ce faire, des éponges de collagène (Symatèse Biomatériaux, Chaponost) composées de collagène de type I (90-95%) et de type III (5-10%) d'origine cutanée (veau) ont été sélectionnées comme précédemment décrit pour des chondrocytes articulaires arthrosiques (Claus et al., 2012; Legendre et al., 2013). Le processus de fabrication comprend une étape de stabilisation par traitement à la glutaraldéhyde suivie d'une stérilisation aux rayons γ (Chajra et al., 2008; Claus et al., 2012). Ces éponges ont été ensuite réduites à l'état de disques de 5 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur (ce qui correspond à un volume de 0,04 cm³) avec une porosité de 100 nm (Claus et al., 2012). La Figure 16 représente une image en microscopie électronique de l'éponge de collagène avant (Figure 16.A) et après ensemencement de chondrocytes articulaires (Figure 16.B). Ce modèle a été adapté à notre problématique de radiobiologie.

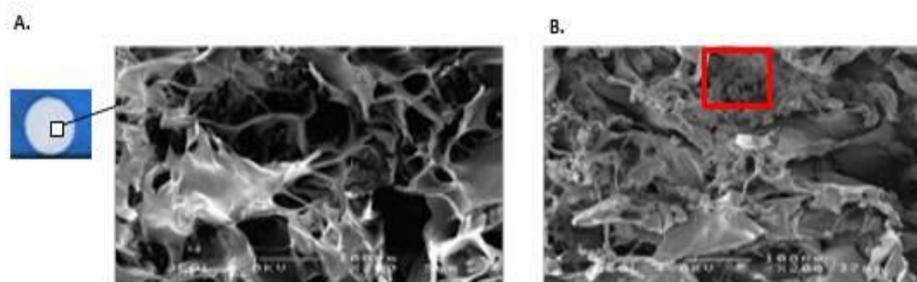


Figure 16: Image en microscopie électronique de l'éponge de collagène vide (A) ou colonisée par des chondrocytes articulaires arthrosiques(B)

(Legendre et al., 2013)

Afin de construire un M3DCa ou un M3DC, une éponge de collagène est déposée dans un puits de plaque 96 à l'aide d'une pince préalablement stérilisée à l'alcool. En parallèle, une suspension cellulaire (CAH ou SW1353, respectivement) est préparée dans du milieu de culture **C** (composition détaillée dans le Tableau 4) afin d'obtenir une densité de 4×10^5 cellules/20 μ l de milieu. A l'aide d'une pipette, la suspension cellulaire (20 μ l) est déposée sur l'éponge de façon à obtenir un dépôt homogène. La plaque est ensuite incubée en normoxie pendant une heure afin que les cellules colonisent entièrement l'épaisseur de l'éponge. Ensuite, le puits contenant l'éponge est recouvert de 100 μ l de milieu **C** et la plaque est incubée en physioxie (2% d'O₂) pendant 7 jours. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine. La combinaison du facteur BMP-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA), de la physioxie et de la matrice de collagène permettent de recréer, en partie, le microenvironnement naturel du cartilage.

Le Tableau 4 récapitule la composition et l'usage spécifique des milieux de culture utilisés dans le cadre de ce projet (CellSystems, Troisdorf, Allemagne). Aucun de ces milieux ne contient d'antibiotique ou d'antifongique.

Milieu commercial	Composition	Supplément (au laboratoire)	Milieu final et usage
Milieu de base pour chondrocytes sans rouge de phénol et sans SVF (#410PR-500)	Acides aminés essentiels et non essentiels, vitamines, sels inorganiques, composés organiques et minéraux	/	A Remplissage des flasques pour irradiations 2D
Milieu de croissance pour chondrocytes sans rouge de phénol (#411PR-500)	Milieu de base additionné de <u>facteurs de croissance chondrocytaire et SVF</u>	/	B Culture en 2D
Milieu de croissance pour chondrocytes sans rouge de phénol et sans SVF (#411FPR-500)	Milieu de base additionné de <u>facteurs de croissance chondrocytaire sans SVF</u>	2% SVF + BMP-2 (50 ng/mL)	C Culture et irradiations en 3D

Tableau 4: Milieux de culture utilisés et leur composition

2) Protocoles d'irradiation :

Dans le cadre de ce travail, deux types de RIs ont été utilisés ; des RX et des ions accélérés. A l'exception des résultats présentés dans le chapitre I de la section résultats, toutes les irradiations et les cultures post-irradiation ont été effectués en physioxie (2D et 3D). Les milieux utilisés pour le remplissage des flasques 2D et des tubes (3D) ont été préalablement traités (bullés) afin de chasser l'oxygène et assurer une irradiation à une faible tension d'O₂. Comme proposé récemment par le comité scientifique de l'HIMAC (NIRS, Chiba, Japon), les unités de dose (Gy) exprimées dans le manuscrit correspondent uniquement aux doses physiques des expositions sans application d'un coefficient (EBR) sauf si cela est spécifié.

2.1) Irradiation en rayons X (bas TEL) :

Les irradiations en bas TEL ont été réalisées à l'aide d'un générateur à RX destiné au petit animal : XRAD 225 Cx (225 kV, 13 mA) construit par PXi (North Branford, USA). Cette machine est localisée au niveau du centre d'imagerie et de recherche en neurosciences (CYCERON) du Campus Jules Horowitz (comme le LARIA, le CIMAP et le GANIL).

2.1.1) Description de l'irradiateur X-RAD 225 :

L'irradiateur X-RAD 225 Cx possède une seule source de rayonnement délivrée par un tube à RX type MXR-225/22 attaché à un bras mécanique (en forme de C) permettant de réaliser des irradiations de type thérapeutique mais aussi une imagerie de type scanner. L'ensemble possède une capacité rotatoire de 360° ce qui permet de réaliser une tomographie complète du petit animal fixe. Il est également possible de bouger le spécimen selon 3 axes : x, y et z (à l'aide d'un lit pour petit animal) afin de contrôler spécifiquement les zones irradiées. A la sortie du tube X, il est possible de placer un collimateur, des filtres ainsi qu'une sonde (Figure 17). La dosimétrie a été réalisée par A-M. Frelin (CEA, ARCHADE, LPC de Caen) en suivant le protocole AAPM TG-61 (Ma et al., 2001) à l'aide d'une chambre d'ionisation et un dosimètre thermo-luminescent (TLD). Les RX émis par cette machine produisent des électrons secondaires de basse énergie avec une dE/dX entre 0,26 et 2,25 keV/ μm . A l'exception des courbes de survie, la dose canonique d'une fraction de RT (2 Gy) a été délivrée avec un débit de dose de 2 Gy/min.

La fiche technique détaillée de l'irradiateur X peut être retrouvée sur le site : www.comexray.com/Resources/Products/X-Ray-Tubes/Documents/mxr_225_22_en.pdf.

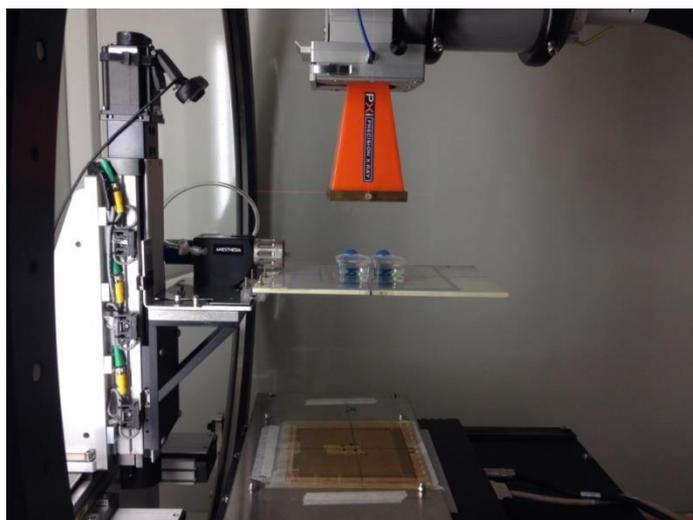


Figure 17: Configuration interne de l'irradiateur X-RAD 225 Cx montrant le plateau d'irradiation en position intermédiaire ainsi que le collimateur

2.1.2) Description du protocole d'irradiation en 2D et 3D :

Les échantillons biologiques ont été préparés de la manière suivante :

Culture 2D : Les cellules sontensemencées en flasque de 12,5 cm² (BD Falcon™) à une densité de 2,4x10⁴ cellules/cm² (SW1353) ou 1,6x10⁴ cellules/cm² (CAH) puis incubées en normoxie, 48h avant l'irradiation. Le lendemain, les flasques sont incubées en physioxie (ou en normoxie) pour une durée de 24h. Le jour de l'irradiation, les cellules ont atteint la confluence. Les flasques sont ensuite entièrement remplies par du milieu de base **A** dont la composition est détaillée dans le Tableau 4 (25 ml sont nécessaires pour une flasque de 12,5 cm²). Cette étape de remplissage des flasques permet d'irradier les échantillons dans les mêmes conditions expérimentales que lors d'irradiation en ions lourds (voir page 68). Les flasques utilisées sont équipées d'un bouchon étanche afin de maintenir la tension d'O₂ requise. Les échantillons sont placés sur un plateau horizontal à l'intérieur de l'irradiateur (Figure 18) et irradiés selon le protocole détaillé ci-dessous. Suite à l'irradiation, les cellules sont ramenées au laboratoire, le milieu de base **A** est remplacé par du milieu de croissance **B** neuf (2 ml pour une flasque de 12,5 cm²). Les flasques sont remises immédiatement en culture physioxique (ou normoxique) à l'exception de l'analyse du cycle cellulaire (voir page 75).

Culture 3D : Les plaques 96 contenant les modèles 3D sont recouvertes d'un parafilm, puis rangées dans une boîte en polystyrène. Les plaques sont ensuite posées sur le plateau horizontal de l'irradiateur X (Figure 18). Suite à l'irradiation, les échantillons sont ramenés au laboratoire suivi d'un changement de milieu de culture (**C**) et remise en culture physioxique pour la suite des expériences.

Dans les deux cas de figure (2D et 3D), les échantillons contrôles sont traités dans les mêmes conditions sans être irradiés. Par convention, dans ce manuscrit, c'est le moment où les échantillons sont remis en culture dans l'incubateur (après irradiation) qui est considéré comme le temps 0 (t₀) de la cinétique post-irradiation.

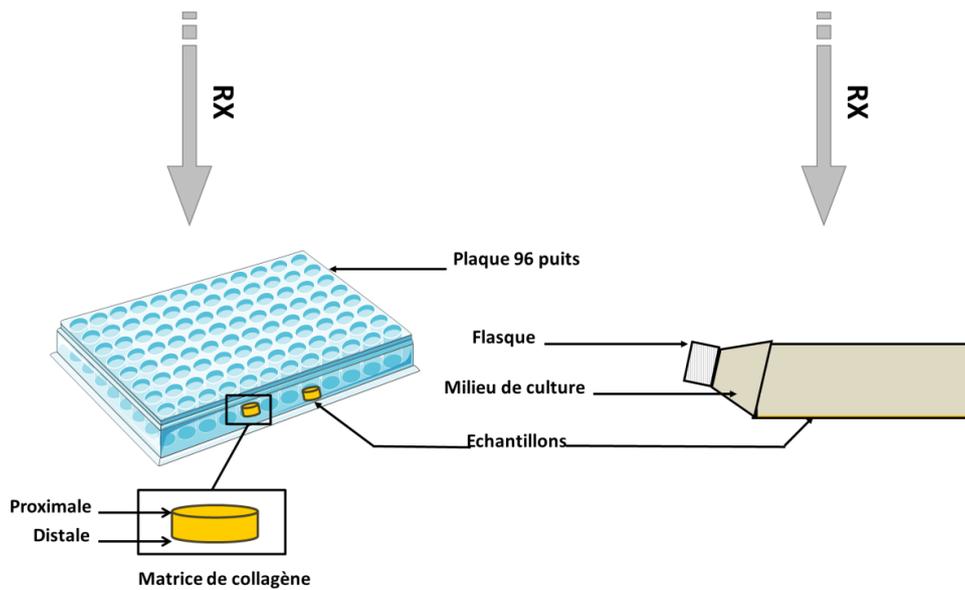


Figure 18: Schéma récapitulatif de la configuration d'irradiation en flasque 2D (droite) et modèles 3D (à gauche) en bas TEL

Le protocole suivant a été suivi lors des irradiations en RX:

- Préchauffage de la machine pendant 5-7 minutes.
- Positionnement du plateau en « intermédiaire » grâce aux coordonnées x, y, z déterminées préalablement. C'est cette position que nous avons sélectionné afin d'obtenir un débit de dose compris entre $2,10 \text{ cGy/min} \leq dD/dt \leq 272,86 \text{ cGy/min}$. la position est vérifiée à l'aide de pointeurs laser.
- Réglage de la température et de la pression à l'intérieur de la chambre d'irradiation. Mise en place du collimateur additionné d'une couche de cuivre de 0,9 mm d'épaisseur (Figure 17). Cette configuration permet d'irradier simultanément deux flasques de $12,5 \text{ cm}^2$ ou une plaque 96 entière.
- Le contrôle interne de la dose délivrée aux échantillons est réalisé grâce à une chambre d'ionisation de détection interne délivrant une valeur arbitraire ou DAP (cGy.min). Afin d'obtenir un débit de dose de 2 Gy/min, une tension de 9,5 mA et un voltage de 225 kV sont appliqués. Avant de mettre en place les échantillons, une irradiation à vide est effectuée afin de vérifier le bon fonctionnement de la machine : tube, détecteur, etc... (valeur DAP de référence : $\sim 320 \text{ cGy.min}$).
- Mise en place des échantillons sur la plaque (dans la région 90% de l'isodose). La durée de l'irradiation dépend de la dose souhaitée pour chaque échantillon. A l'exception des courbes de survie, la dose de 2 Gy a été choisie (1 min d'irradiation).
- Après irradiation, le plateau, le collimateur et la plaque de cuivre sont désinstallés et la machine mise en veille.

2.2) Irradiation en ions accélérés :

Les irradiations en ions accélérés ont été réalisées au Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL, Caen) sur la ligne haute énergie IRABAT (Irradiation Basse Température). Le GANIL est, à ce jour, le seul complexe permettant de réaliser des irradiations avec des ions lourds accélérés en France. Depuis une trentaine d'années, il met à disposition des faisceaux pour des études de radiobiologie, d'astrophysique, de physique atomique et de physique des matériaux. L'installation est capable de produire des ions allant du ^{12}C au ^{238}U .

En début d'expérience, des ions sont produits à la source puis accélérés à l'aide de cyclotrons en tandem et dirigés dans les différentes salles du GANIL (Figure 19). En effet, les ions sont d'abord accélérés par deux petits cyclotrons, C01 et C02, jusqu'à une énergie d'1 MeV/A. Ils passent ensuite dans CSS1 (Cyclotron à Secteur Séparé-1) qui les accélère jusqu'à 13,6 MeV/A. Les ions sont alors séparés en fonction de leur masse et leur charge (éplucheur électronique, brevet GANIL) et sont envoyés vers le deuxième cyclotron, CSS2, qui leur permettra d'atteindre une énergie pouvant aller jusqu'à 95 MeV/A, ou bien vers des lignes de plus basse énergie (SME). Au-delà de CSS2, le faisceau est dirigé dans une des différentes lignes en fonction de la programmation de la machine (Figure 19). Les expériences de radiobiologie nécessitent l'utilisation de la ligne haute énergie IRABAT qui se trouve en salle D1. Une description de cette ligne est détaillée plus bas (page 66). Le vide total est indispensable afin d'optimiser le guidage des ions le long de l'installation (les échantillons, eux, ne sont pas irradiés dans le vide).

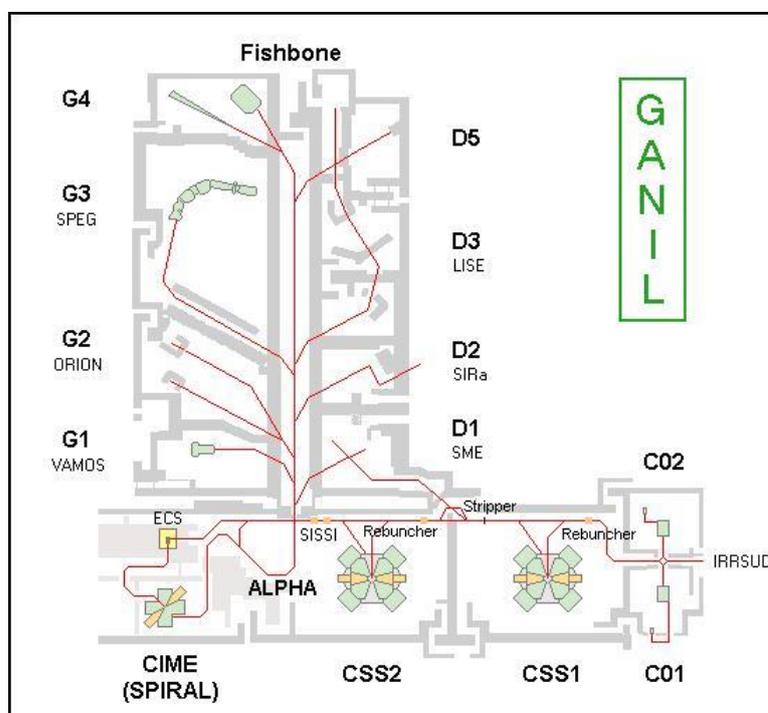


Figure 19: Schéma des différentes composantes du GANIL

http://www.scholarpedia.org/article/The_GANIL_facility

Du fait de son plan d'utilisation, de la complexité de fonctionnement et de maintenance d'un accélérateur de particules, le GANIL ne peut fonctionner que par campagne, uniquement certains mois par an. Après soumission d'une proposition d'expérience au comité interdisciplinaire (iPAC) du GANIL ou au comité France Hadron, un nombre limité d'heures d'irradiation est alloué à chaque équipe de recherche et la programmation effective n'est connue que peu de temps avant l'irradiation. Dans le cadre de ce projet, nous avons classé les rayonnements utilisés en : TELs intermédiaires (~ 33 keV/μm) et hauts TEL (~ 70-80 keV/μm). Le Tableau 5 liste les temps de faisceau qui nous ont été alloués, une UT (unité de temps) correspondant à 8h d'irradiation :

	Date	Nombre d'UT	Ion	Energie (MeV/A)	TEL (keV/μm)
TEL intermédiaire	Novembre 2013	1 UT	¹³ C	75	33
	Avril 2014	2 UT	¹² C	75	33
	Mai 2014	1.5 UT	¹³ C	75	33
	Avril 2015	1 UT	¹² C	95	28
Haut TEL	Novembre 2013	2 UT	²⁰ Ne	95	70
	Mars 2014	1.5 UT	¹⁸ O	50	85

Tableau 5: Liste des temps des faisceaux alloués par les comités iPAC et France Hadron dans le cadre de ce projet

Le TEL est donné au niveau de la monocouche cellulaire en flasque et est calculé grâce au logiciel SRIM v.2008.

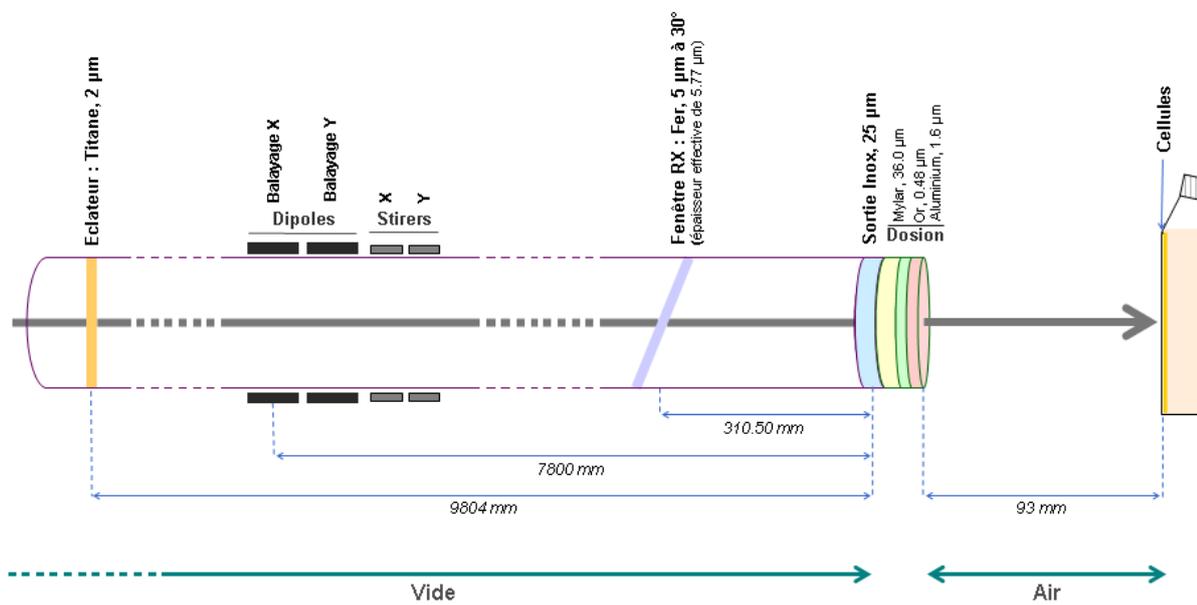
Il faut néanmoins noter que lors de la dernière expérience (Avril 2015), deux couches de PMMA ont été utilisées afin de modifier l'énergie du faisceau en ralentissant les ions. Ainsi, le TEL est augmenté au niveau des échantillons. Ces dispositifs permettent d'irradier les échantillons avec des TEL non disponibles en faisceau natif. Nous avons utilisé une fine couche de 6,9 mm de PMMA afin de dégrader le faisceau de ¹²C 95 MeV/A à 75 MeV/A (TEL de 28 keV/μm à 34 keV/μm). Nous avons également testé une couche plus épaisse de 16,9 mm de PMMA qui a permis d'atteindre une énergie de 35 MeV/A correspondant à un TEL à la cible de 73 keV/μm.

Ces valeurs de TEL ont été calculées par F. Durantel (CIMAP, Caen) en utilisant le logiciel SRIM v.2008 (Ziegler et al., 1984). Elles sont données en entrée dans l'eau. Le calcul se fait par itérations matériaux après matériaux, en tenant compte de leur épaisseur, dans la configuration de la ligne IRABAT (irradiation d'une flasque en culture 2D).

2.1.1) Description de la ligne IRABAT et de sa dosimétrie :

La ligne haute énergie IRABAT est composée de plusieurs éléments (Figure 20). De la partie la plus éloignée à la plus proche de l'échantillon se trouve :

- Un éclateur en titane (2 mm d'épaisseur) qui permet d'augmenter le diamètre du faisceau.
- 4 dipôles qui permettent un balayage en x et y assurant une irradiation homogène de l'échantillon biologique.
- 4 stirers produisant un champ magnétique qui permet de dévier le faisceau de manière horizontale et verticale au moment du réglage. L'intensité du faisceau est contrôlée par des détecteurs.
- Un détecteur de RX qui permet de mesurer les rayons γ produits par l'interaction du faisceau avec une couche de fer ($5 \mu\text{m}$ à 30°) donnant ainsi le nombre d'ions/sec en temps réel.
- DOSION composé d'un empilement de couches de mylar, d'or et d'aluminium, respectivement, représentant une méthode de mesure alternative mise en place par le Laboratoire de Physique Corpusculaire (LPC) de Caen. Elle n'influence aucunement la dosimétrie réalisée par les physiciens du CIMAP. DOSION permet de disposer d'une carte de fluence en temps réel pour chaque échantillon et ainsi d'évaluer l'homogénéité de l'irradiation.
- Il est possible d'installer différents dégradeurs en fin de faisceau (type PMMA) ce qui permet de moduler l'énergie (et donc le TEL) d'un même faisceau natif.
- Le porteur d'échantillon biologique robotisé et piloté à distance.



CiMap



Ligne IRABAT

Y. Saintigny, J.M. Ramillon, F. Durante

Figure 20: Schéma de la ligne haute énergie IRABAT utilisée pour les expériences de radiobiologie

Les différents composants (éclateur, dipôles, stirers, détecteur de RX, DOSION) ainsi que les distances entre eux sont représentés.

La dosimétrie est réalisée au début de chaque campagne d'irradiation (un ion, une énergie) par les physiciens du CIMAP (Centre de Recherche sur les Ions, les MATériaux et la Photonique, Caen) comme décrit dans (Durantel et al., 2016). L'étape de dosimétrie nécessite environ 6h et permet de déterminer une valeur précise de la fluence des particules accélérées. Elle est basée sur la mesure indirecte de l'émission de RX (photons secondaires) suite à l'interaction du faisceau avec une couche de fer insérée sur le trajet du faisceau (Figure 20). Pour des flux inférieurs à 1×10^6 ions.cm⁻².s⁻¹, une constante d'étalonnage entre les photons secondaires et le flux d'ions accélérés doit être déterminée en utilisant un polymère réagissant au passage de particules CR39 [(C₁₂H₁₈O₇)₁₁] fixé au niveau d'une flasque test. Après l'exposition au faisceau d'ions accélérés, le polymère CR39 est révélé à l'aide d'une solution de potasse (KOH, 12 mol/l) chauffée à 80°C pendant 8-12 min. Les points d'impact sont comptés à l'aide d'un microscope Olympus Vanox-S (Tokyo, Japon). La fluence F (ions/cm²) obtenue est convertie en dose D (Gy) grâce à la formule suivante :

$$D = F \times TEL \times 1,6 \times 10^{-9}$$

Les doses obtenues par le détecteur RX sont ensuite corrélées à des doses mesurées par une chambre d'ionisation comme deuxième vérification du ratio dose/fluence. Lorsque la dosimétrie est réalisée, les paramètres de l'irradiation sont récupérés auprès du CIMAP : constante d'étalonnage, flux (p.cm⁻².s⁻¹), fluence (p.cm⁻²), équivalence dose (Gy) et débit de dose (Gy/min). Les fluences varient d'une expérience à une autre mais à titre d'exemple, lors de l'expérience en ¹²C 75 MeV/A (avril 2014), la constante d'étalonnage était de $6,68 \times 10^{-15}$, le débit de dose 1 Gy/min donné à un flux de $3,30 \times 10^5$ p.cm⁻².s⁻¹ et une dose de 2 Gy correspondait à une fluence de $3,96 \times 10^7$ p.cm⁻².

Les débits de dose recommandés pour des expériences de radiobiologie varient entre 1-2 Gy/min. Les fluences varient légèrement tout le long des irradiations ce qui influence le temps total d'irradiation. Cependant, afin d'obtenir une irradiation homogène et uniforme des échantillons, il est important que le temps d'irradiation ne soit pas inférieur à 15 sec. Par ailleurs, la surface effective irradiée est égale à 25 cm² (5 cm x 5cm) correspondant à la géométrie d'une flasque standard de 25 cm² ce qui est largement suffisant pour le format d'irradiation que nous avons choisi (flasque 12,5 cm² et tubes de 2 ml). A l'exception des courbes de survie, la dose canonique de 2 Gy a été choisie pour tous les échantillons.

Enfin, le système alternatif de dosimétrie développé par le LPC de Caen (DOSION) démontre qu'il y a moins de 5% de différence entre la dose prescrite et la dose réellement déposée au niveau de l'échantillon biologique.

2.1.2) Description du protocole d'irradiation en ions accélérés :

Toutes les expériences en ions accélérés ont été réalisées en physioxie. En parallèle de la dosimétrie, les échantillons ont été préparés de la manière suivante :

Culture 2D : Les cellules sont préparées de manière similaire aux échantillons destinés à l'irradiation en bas TEL (page 63). Le balayage du faisceau étant horizontal, les flasques doivent être irradiées en position verticale à température ambiante (Figure 21). Les flasques doivent donc être remplies entièrement de milieu de base **A** avant de les transporter en salle D1. Suite à l'irradiation, les cellules sont ramenées en salle de culture, le milieu de base **A** est éliminé et remplacé par du milieu **B** neuf. Les flasques sont remises immédiatement en culture physioxique à l'exception de l'analyse du cycle cellulaire (voir page 75). Les flasques contrôles sont traitées dans les mêmes conditions sans être irradiées.

Culture 3D : A l'instar des flasques 2D, les modèles 3D sont irradiés en position verticale. Ils sont maintenus en position verticale dans un tube de polypropylène de 2 mL (Eppendorf®) grâce à un cylindre en verre stérile comme schématisé dans la Figure 21. Il est possible de mettre deux à trois modèles 3D par tube de 2 ml. Le tube est ensuite rempli de milieu **C** préalablement équilibré en azote gazeux afin d'éliminer l'oxygène. Suite à l'irradiation, les modèles sont ramenés au laboratoire puis remis en culture physioxique en plaque 96 puits dans du milieu **C** neuf.

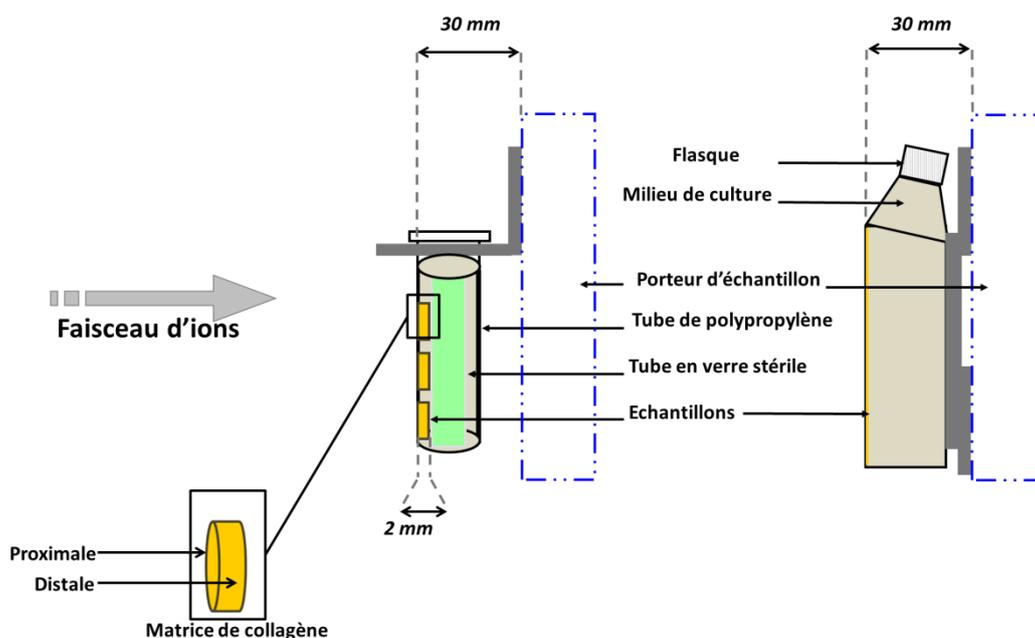


Figure 21: Schéma de la configuration de l'irradiation au GANIL

Du fait de son mode de fonctionnement par campagnes, l'irradiation au GANIL nécessite une organisation particulière avec au moins trois expérimentateurs : une personne en salle de culture, une personne pour commander la machine ainsi qu'un transporteur d'échantillon entre la salle de culture et la salle D1. Un plan d'expérimentation précis et chronométré est indispensable afin d'optimiser au mieux le temps de faisceau alloué à l'expérience. Pour ce faire, il faut tenir compte d'un délai minimal de 20-25 minutes pour une seule entrée en salle D1. Il est possible de monter 4 racks sur le porte-échantillon (Figure 22). Ces racks peuvent

contenir 6 flasques 2D (à l'exception du premier rack où une fenêtre reste vide pour le contrôle de flux). Il est donc possible d'irradier au maximum 23 flasques en une entrée de salle. Nous avons également utilisé des racks spéciaux qui permettent de porter des tubes contenant les modèles 3D. Tous ces paramètres doivent être pris en compte lors de la préparation du plan d'expérimentation.



Figure 22: Photo du porteur d'échantillon robotisé en position d'origine (ligne IRABAT)

Le protocole d'irradiation qui a été suivi pour toutes les campagnes d'irradiation au GANIL est décrit ci-après :

- Préparation des échantillons biologiques en salle de culture et transport en boîte de polystyrène jusqu'à la salle D1.
- Programmation initiale en salle de contrôle (D1bis). L'expérimentateur doit entrer la constante d'étalonnage déterminée lors de la dosimétrie.
- Demande d'accès en salle au poste de contrôle du faisceau et ouverture de la porte bouchon bétonnée qui permet d'accéder à la salle D1 puis passage du sas de sécurité.
- Installation des flasques et tubes sur les racks de manière à ce que la monocouche cellulaire (flasque 2D) et les modèles 3D soient les premiers sur le trajet du faisceau (Figure 21).

- Programmation effective en salle de contrôle (D1bis). L'expérimentateur doit demander l'injection du faisceau en salle D1 au poste de contrôle du faisceau puis entre les fluences prescrites et les fenêtres à irradier en fonction du plan d'expérimentation (Figure 23)
- Vérification du flux lors du retour du faisceau en D1 et réglages du flux en direct si nécessaire (afin d'assurer un temps minimum d'irradiation de 15 sec).
- A la fin de l'irradiation (10-20 minutes), demande au poste de contrôle du faisceau d'accéder à nouveau à la salle et récupération des échantillons dans une boîte en polystyrène.
- Retour en salle de mesure. L'heure de remise en culture physioxique représente le t_0 des cinétiques.

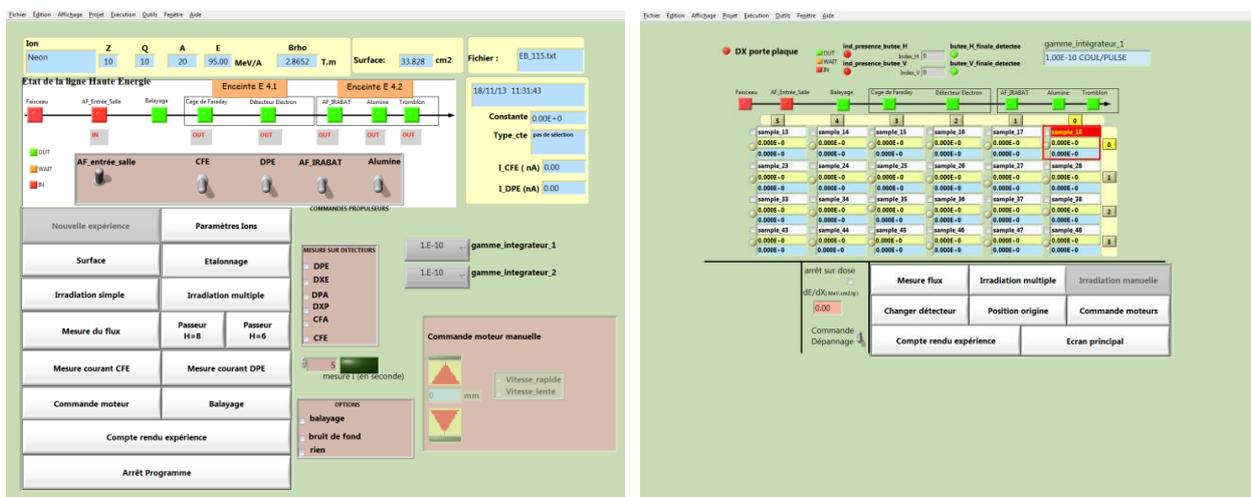


Figure 23: Capture d'écran de poste de contrôle : écran principal (à gauche) et passeur d'échantillon en position H6

2.1.3) Simulation de la distribution de TEL dans le modèle 3D :

Compte tenu de l'épaisseur de l'éponge de collagène (2 mm), il était indispensable d'évaluer la distribution de TEL pour chaque ion (et énergie) utilisé. Ceci a été réalisé en collaboration avec J-E. Groetz (Université de Franche-Comté, Besançon) grâce à deux méthodes de calcul basées sur un code Monte Carlo de simulation du transport de particules et leur interaction avec la matière :

- FLUKA pour *FLUktuierende KAskade* (Battistoni et al., 2007; Ferrari et al.) développé par le CERN (organisation européenne pour la recherche nucléaire, Suisse) et l'INFN (*Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Italie*) version 2011.2b.6, datant du 08/04/2014.
- PHITS pour *Particle and Heavy ion Transport code System* (Sato et al., 2013) développé par JAERI (*Japan Atomic Energy Research Institute*) version 2.64.

La ligne d'irradiation IRABAT a été modélisée dans ses composantes telles que l'éclateur, le détecteur à RX, les différentes couches de mylar, d'or et d'aluminium (Figure 20). La Figure 24 reprend la configuration (tube

de polypropylène, courbure des échantillons imposée par la forme du tube et la position du cylindre en verre) prise en compte pour ces simulations (même géométrie pour les deux méthodes de calcul).

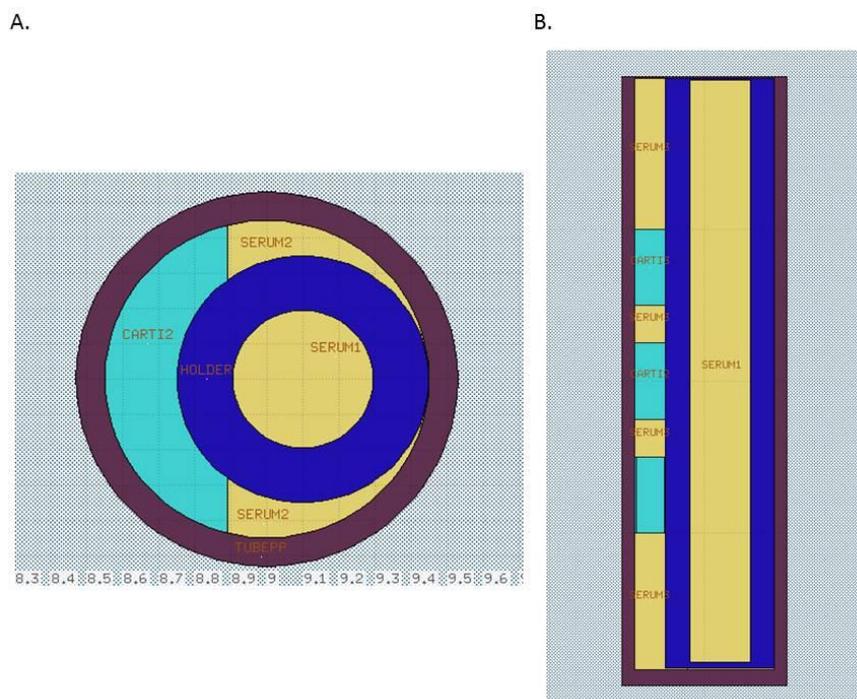


Figure 24: Géométrie du tube en polypropylène et de l'éponge, utilisée pour les simulations sous PHITS et FLUKA

A. Coupe transversale. B. Coupe longitudinale

La composition du cartilage prise en compte provient de la référence « *skeleton-cartilage* » (Woodward and White, 1986). Le minimum d'énergie à laquelle une particule est prise en compte (cut off) a été fixé à 1 keV. Dans le cadre de ce projet, seuls les TELs des particules incidentes ont été pris en compte (les autres particules α , protons, électrons et noyaux de fragmentation ont été négligées). La distribution de TEL a été calculée au niveau des parties proximales et distales et à l'intérieur de l'éponge de collagène. Dans un second temps, la distribution de TEL a été simulée dans une éponge de collagène théorique de plus de 2 mm d'épaisseur afin de déterminer à quelle distance correspond le pic de Bragg (toujours dans la même configuration de la ligne IRABAT). Le TEL moyen est calculé grâce à la formule suivante :

$$\overline{TEL} = \frac{\sum_i n_i \cdot TEL_i}{\sum_i n_i}$$

avec n_i le rendement pour chaque valeur du TEL.

Par ailleurs, une géométrie dite « plate » (non cylindrique) a également été testée afin de déterminer l'effet de la courbure des différents éléments sur la distribution du TEL des ions en entrée et sortie de l'éponge. Dans cette nouvelle configuration, les distances traversées par le faisceau d'ions sont plus homogènes (distribution plus resserrée). L'effet de la géométrie semble ainsi primordial sur la distribution du TEL des ions dans l'éponge.

3) Test de clonogénicité et distribution de taille de colonies :

Les tests de clonogénicité ont été réalisés sur les échantillons 2D comme décrit précédemment (Franken et al., 2006). Cet essai a initialement été développé par T. Puck et P. Marcus (Denver, USA) en 1955 pour des applications diverses (virologie, pharmacologie...etc). A partir de cellules HeLaensemencées à très faible densité sur une lame de verre immergée dans un milieu de culture, ces auteurs ont réussi à cultiver des clones pour la première fois. Ceci a été rendu possible grâce à un tapis cellulaire appelé « feeder layer » irradié à forte dose (arrêt de croissance mais maintien d'une activité métabolique) qui libère des facteurs de croissance diffusibles dans le milieu de culture (Puck and Marcus, 1955). Cette technique a été très utile à la radiobiologie même si elle ne nécessite plus l'usage d'une « feeder layer », grâce aux traitements de surface des flasques de culture.

Ce test est basé sur le comptage de colonies formées de plus de 50 cellules qui proviennent de la multiplication d'une cellule unique après un temps donné de culture cellulaire (12 jours dans notre cas de figure). Cette limite de 50 cellules permet d'exclure celles dont le potentiel de croissance est réduit par des dommages subléthaux et ne représente pas, en théorie, de significativité clinique. Le but de cet essai en radiobiologie est de déterminer le pourcentage de cellules capables de s'attacher à la surface d'un puits et de former des colonies viables après avoir reçu une dose de RI. Les courbes dose-réponse sont utiles pour déterminer plusieurs paramètres (Tableau 6) qui permettront de comparer différents types de rayonnements ou conditions de culture (tension d'oxygène).

Le protocole décrit ci-après a été suivi pour les différentes modalités d'irradiation : après irradiation et changement de milieu, les flasques sont replacées en normoxie ou physioxie pendant 12-16h. Les cellules sont ensuite détachées (AccutaseTM) et comptées (cellule de Malassez) puisensemencées à nouveau à faible densité en plaque 6 (BD FalconTM) à 100 et 1000 cellules/puits en triplicat chacun. Les plaques sont ensuite remises en culture (en physioxie ou normoxie) tout en évitant de trop les secouer afin de ne pas créer un tourbillon qui perturberait la répartition cellulaire dans le puits. Après 12 jours de culture sans changement de milieu, les cellules sont fixées au Crystal Violet (0,3% p/v dans l'éthanol à 20%) après un lavage au PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Seuls les clones de plus de 50 cellules sont comptés à la loupe grossissante. Ces données sont ensuite rapportées au contrôle non irradié (appelé PE pour *Plating Efficiency*) afin de calculer une fraction survivante (S) correspondant à une dose D. La fraction S de chaque puits est rapportée au PE moyen

de la dite expérience. Après plusieurs expériences, toutes les fractions (S) sont entrées dans le logiciel PRISM. La fonction « régression non linéaire » correspondant à l'équation suivante est sélectionnée :

$$-\ln(S) = \alpha D + \beta D^2$$

Cette équation correspondant au modèle linéaire quadratique (décrit en page 16) permet de déduire les paramètres suivants :

Paramètre	Signification	Méthode de calcul
α	Constante (Gy^{-1})	Valeur moyenne (\pm SEM) donnée par PRISM
β	Constante (Gy^{-2})	Valeur moyenne (\pm SEM) donnée par PRISM
D_{10}	Dose physique correspondant à 10% de survie (Gy)	$\frac{\sqrt{\alpha * \alpha - 4\beta * \ln(0,1)} - \alpha}{2\beta}$
D_{37}	Dose physique correspondant à 37% de survie (Gy)	$\frac{\sqrt{\alpha * \alpha - 4\beta * \ln(0,37)} - \alpha}{2\beta}$
FS_2	Fraction de cellules survivantes après une irradiation à 2 Gy	$100 * e^{4\beta - 2\alpha}$
EBR	Efficacité biologique relative d'un RI par rapport aux RX	$\frac{D_{10} \text{ (ou } D_{37}) \text{ RX}}{D_{10} \text{ ou } (D_{37}) \text{ ions accélérés}}$
PE	Nombre de clones formés dans l'échantillon contrôle (%)	$\frac{\text{nombre de colonies formées}}{\text{nombre de cellulesensemencées}} * 100$

Tableau 6: Paramètres déterminés à partir des courbes de survie

A noter également que la série 1000 cellules/puits sert uniquement si le PE n'est pas suffisant pour la condition 100 cellules/puits.

En utilisant les mêmes plaques 6 puits résultant des expériences de clonogénicité, nous avons également évalué la distribution de taille de colonies après irradiation (Saintigny et al., 2002). Pour ce faire, toutes les colonies (pas uniquement celles > 50 cellules) sont comptabilisées. Cependant, les clones de plus de 100 cellules (désignés comme > 100 cellules) ont été comptabilisés dans une seule classe d'évènements, dû à des limitations humaines. Les résultats sont ensuite organisés en classes basées sur le nombre de cellules composant une colonie (formée de n cellules). Dans ce manuscrit, nous avons exprimé cette distribution de deux manières :

- Pourcentage cumulé (ordonnées) de colonies formées au moins de n cellules (abscisse)
- Pourcentage (ordonnée) de colonies formées de n cellules (abscisse), n étant compris entre 1-20 cellules, 20-100 cellules ou plus de 100 cellules

Un minimum de 300 colonies/RI sur l'ensemble des expériences a été compté (jusqu'à 1000 colonies pour le contrôle) afin d'assurer une statistique robuste.

4) Analyse du cycle cellulaire (IP et EdU) :

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été déterminée en 2D par cytométrie en flux. Pour ce faire, deux marquages fluorescents : l'iodure de propidium (IP) et/ou l'EdU, ont été utilisés.

L'IP est un agent intercalant qui se fixe de manière stœchiométrique aux acides nucléiques (ADN et ARN) sans spécificité de séquence. Sa longueur d'onde d'émission (maximum) est de 617 nm. En fonction de leur marquage à l'IP (donc de la quantité d'ADN que contient la cellule), les cellules sont classées en 3 populations : phase G₀/G₁ (2N), phase S (entre 2N et 4N) et phase G₂/M (4N).

L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, #C10424, Invitrogen) est un analogue de la thymidine qui permet une mesure directe de la prolifération cellulaire. Il est incorporé à l'ADN pendant la phase active de la synthèse d'ADN (phase S). La détection de l'EdU est basée sur une réaction d'addition dite « click réaction » : un azide (contenant le fluorochrome Alexa Fluor[®] 647) réagit avec un alcyne (porté par l'EdU) en présence de cuivre (Cu I) pour former un noyau triazole stable (Figure 25). Ce réactif est une bonne alternative au BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) car il ne nécessite pas d'étape de dénaturation de l'ADN (à l'acide chlorhydrique, à la chaleur ou digestion à l'ADNase) indispensable à la détection du BrdU par un anticorps spécifique.

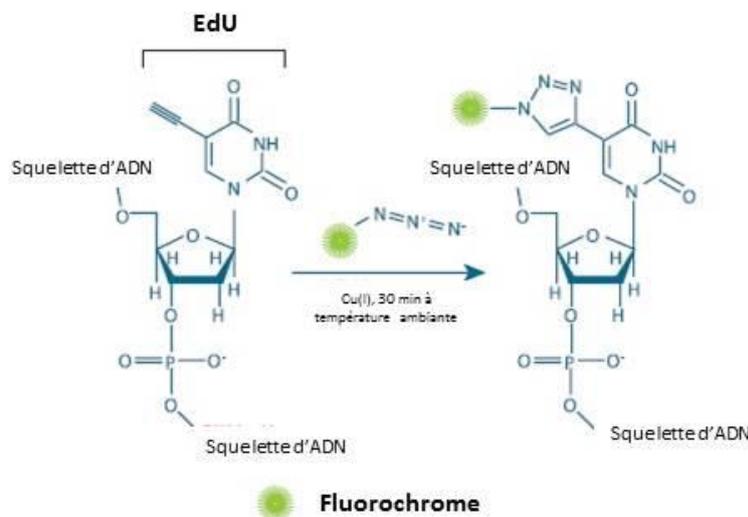


Figure 25: Réaction d'addition (click-it) entre EdU et un azide-fluorochrome

Suite à l'irradiation (RX ou ions lourds), les flasques sont rapportées en salle de culture. Les cellules sont ensuite détachées par traitement à l'acutase et suspendues à nouveau dans du milieu de croissance **B**. L'ensemble des flasques irradiées à la même dose sont mélangées (pool) pour former une suspension cellulaire qui seraensemencée à nouveau dans de nouvelles flasques plus grande. Si l'irradiation est réalisée en flasque de 12,5 cm², la remise en culture se fait en flasque de 25 cm². Cette étape de ré-ensemencement a

permis d'étudier la reprise du cycle cellulaire après irradiation à confluence (CAH) ou sub-confluence (SW1353). Les flasques sont remises en culture physioxique pour le début de la cinétique et retirées de l'incubateur entre 6h et 96h post-traitement. Dans le cas particulier du marquage à l'EdU (solution stock à 10 mM), le réactif est ajouté au milieu de culture avant le point de cinétique afin qu'il soit incorporé pendant la synthèse d'ADN. La concentration nécessaire d'EdU ainsi que le temps de contact avec les cellules a fait l'objet d'une mise au point : 2h de contact d'EdU à 100 μ M (final) ont été nécessaires afin que le marquage soit optimal pour les CAH et SW1353. Les cellules sont ensuite détachées, centrifugées à 800 tpm (tour par minute) pendant 5 min. Le culot cellulaire est lavé une fois au PBS puis fixé à l'éthanol 75° et conservé à 4°C en attendant l'analyse par cytométrie en flux. Le protocole donné par le fournisseur comprenait à l'origine une fixation au PFA (ParaFormaldéhyde) mais ce réactif empêchant un bon marquage à l'IP, nous l'avons remplacé par de l'éthanol 75°.

Après collecte de l'ensemble des échantillons d'une cinétique, l'analyse se déroule comme suit :

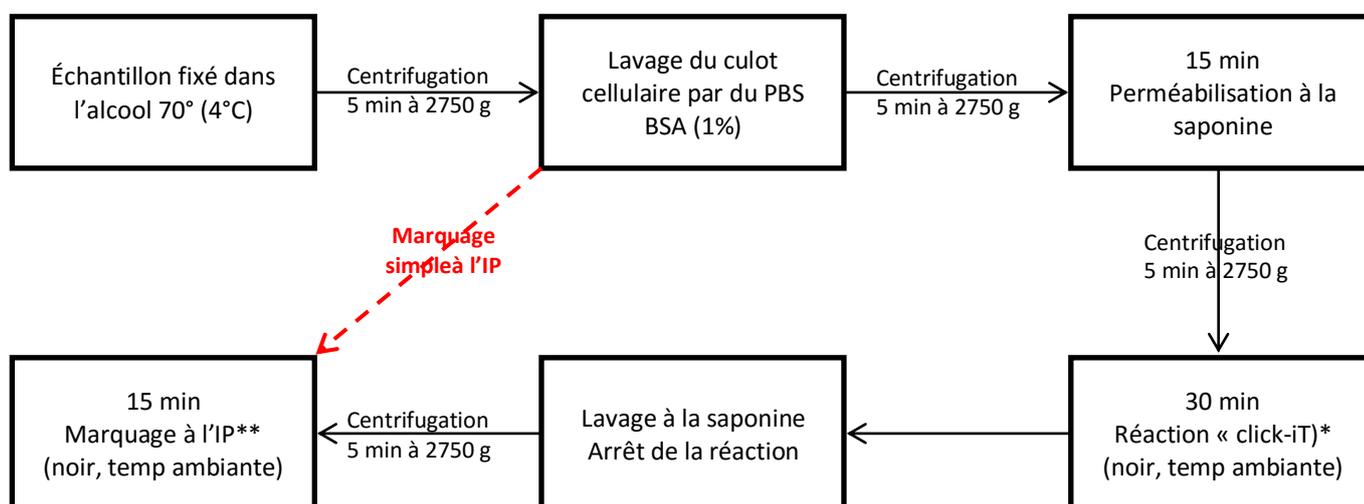


Figure 26: Protocole de marquage à l'EdU et/ou à l'IP pour analyse du cycle cellulaire

* le mix de réaction click-iT préparé extemporanément contient du PBS, CuSO₄, Alexa Fluor 647 azide et un tampon (#C10424, Invitrogen). ** le mix contient 500 μ l de DNA Prep Stain et 50 μ l de DNA Prep LPR (Beckman Coulter).

Suite à la réaction « click-iT » et au marquage à l'IP, les échantillons (minimum 1×10^4 cellules/échantillon) sont analysés à l'aide d'un cytomètre en flux GALLIOS (Figure 27) (Beckman Coulter, Pasadena, USA). La lumière d'excitation est produite par une diode bleue de 22 mW ($\lambda=488$ nm) pour l'IP et une diode rouge de 25mW ($\lambda=638$ nm) pour l'Alexa Fluor 647. Des billes FlowCheck Pro (Beckman Coulter) sont utilisées pour vérifier l'alignement optique et la fluidique de l'appareil. Des billes FlowSet Pro (Beckman Coulter) sont utilisées pour vérifier la sensibilité de l'appareil. Le cytomètre est ainsi calibré et validé avant chaque analyse. Chaque cellule est caractérisée par 2 paramètres de diffraction, nommés, Forward Scatter (FS) et Side Scatter (SS). Pour les analyses immunologiques, la fluorescence de l'IP est collectée sur le canal FL3 à travers un

filtre bandpass 620 nm. La fluorescence de l'Alexa Fluor 647 (EdU) est collectée sur le canal FL6 à travers un filtre bandpass 660 nm.



Figure 27: Cytomètre en flux GALLIOS (BIOTICLA, Caen)

Les résultats collectés sont ensuite analysés grâce au logiciel FlowJo (Ashland, USA). Les doublets sont exclus de l'analyse en utilisant un histogramme aire *versus* maximum du contenu en ADN (voir « gate cycle » dans la Figure 28.A). Les singulets sont analysés sur un histogramme mono-paramétrique en prenant en compte le marquage IP (FL3-A) ce qui permet d'obtenir les différentes fractions du cycle cellulaire (Figure 28.B). Dans les échantillons marqués à l'EdU, il est également possible d'analyser plus en détail la phase S. Le profil du cycle ressemble à un fer à cheval (Figure 28.C), le signal EdU apparaissant en ordonnée (FL6-H) et le signal IP en abscisse (FL3-A). Il est possible de procéder à une analyse manuelle des différentes phases du cycle, ce qui s'est révélé très utile pour les CAH vu la faible proportion de cellules en phase S.

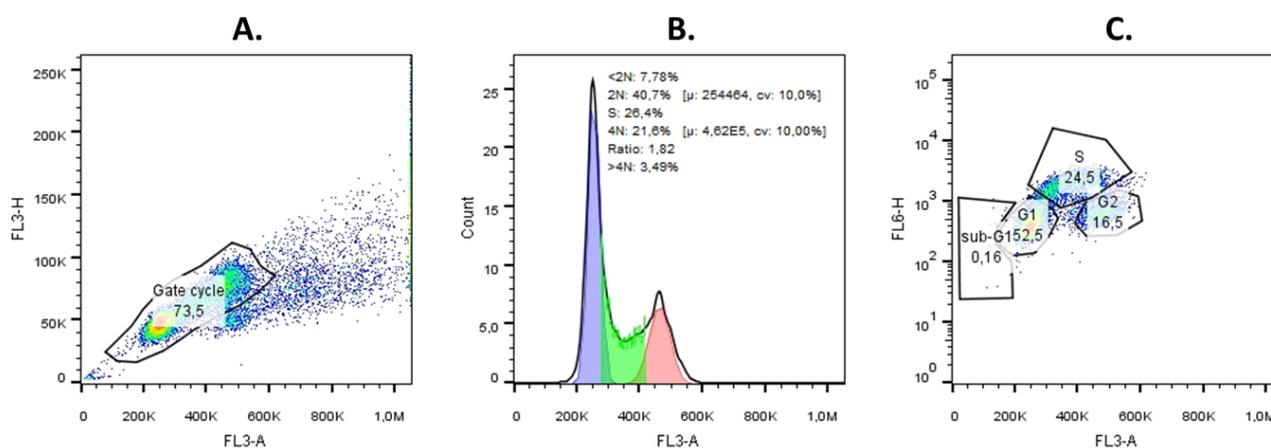


Figure 28: Analyse du cycle cellulaire par FlowJo. Exemple des SW1353 (6h après ré-ensemencement)

A) Sélection de la population à analyser en éliminer les débris et les doublons. **B)** Analyse du cycle grâce au signal IP seul (FL3-A). **C)** Analyse EdU (FL6-H) *versus* IP (FL3-A).

L'analyse de la fraction sub-G1 a ainsi permis d'évaluer l'apoptose radio-induite dans les échantillons 2D.

5) Mesure de l'indice de prolifération cellulaire :

La prolifération cellulaire post-irradiation a également été estimée à l'aide du marqueur de prolifération Ki-67. Cet antigène est exprimé durant toutes les phases du cycle cellulaire à l'exception de la phase G₀ (Scholzen and Gerdes, 2000). La détermination de l'index a été réalisée en 2D par immunocytochimie. Pour ce qui est des modèles 3D, plusieurs techniques ont été testées pour mettre au point un protocole d'immunohistochimie-p.

5.1) Immunocytochimie (2D) :

Suite à l'irradiation, les cellules sont remises en culture physioxique pour 12-16h. Elles sont ensuite détachées, comptées et remises en culture physioxique dans des flasques spéciales (NuncTM slide flasks) afin d'atteindre 50-60% de confluence 48h plus tard. Le protocole d'immunocytochimie comprend une étape de fixation au paraformaldéhyde (solution 4% dans du PBS) pendant 15 min suivie d'un blocage au PBS Tween-20 0,5% (PBT) BSA 1% (*Bovine Serum Albumin*) pendant 30 min (sous agitation). Les cellules sont ensuite incubées à 4°C toute la nuit en présence de l'anticorps anti-Ki-67 (dilué au 1/200^{ème} dans du PBT BSA 0,1%, #9260, Millipore) directement couplé à la peroxydase. Le lendemain, après une étape de lavage au PBT, le signal est révélé à la diaminobenzidine (DAB #10452862, Invitrogen) par une incubation de 10 min à température ambiante suivie d'un lavage à l'eau du robinet et un montage dans un milieu hydrophile (glycérol 50%). Chaque lame est comptée au microscope optique par le même expérimentateur (minimum de 500 cellules/lame). Les photos représentatives de la Figure 29 ont été prises à l'aide d'un scanner Nikon Coolscope (Tokyo, Japon). Seuls les noyaux positifs francs sont comptés pour le calcul de l'index de prolifération.

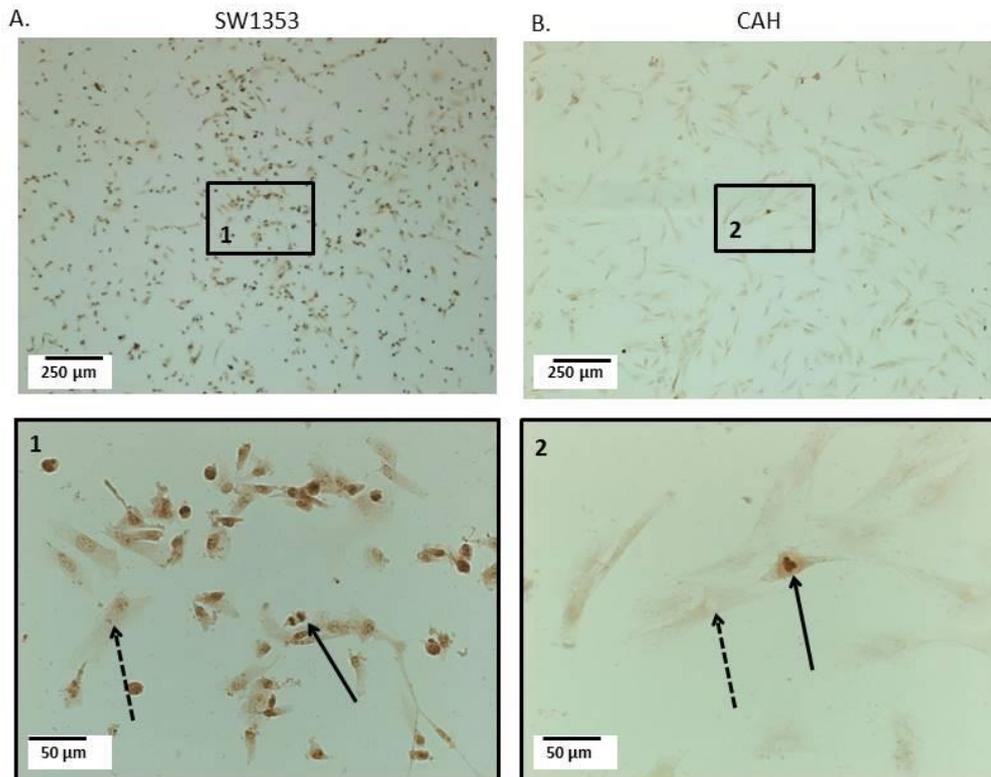


Figure 29: Marquage anti-Ki67 dans les SW1353 (A) et les CAH (B)

La flèche en trait plein indique une cellule positive et la flèche en trait discontinu une cellule négative.

5.2) Développement d'un protocole d'immunohistochimie pour les modèles 3D :

Plusieurs techniques de coupes ont été testées, comme les coupes vibratome, les coupes au cryostat et les coupes au microtome après inclusion en paraffine (ImmunoHistoChimie-paraffine ou IHC-p). C'est cette dernière technique qui a été retenue car, après adaptation aux échantillons de culture tridimensionnelle, elle a permis d'obtenir des coupes d'une épaisseur raisonnable pour la microscopie (~8 µm) tout en maintenant l'intégrité structurale de l'éponge. Cette mise au point a été rendue possible grâce au concours du laboratoire d'anatomie pathologique du CLCC François Baclesse.

Méthode 1 : Coupes au Vibratome après inclusion en agarose

Après 7 jours de culture, les M3DC ont été récupérés et fixés au PFA 4% (dans PBS) à 4°C. Le lendemain les modèles ont été déposés dans l'agar 5% et incubés à 40°C toute la nuit. Ils ont ensuite été coupés à l'aide d'un vibratome (Fréq 80 Htz, Amp 1,2 Vitesse 13) à une épaisseur de 60 à 80 µm au Centre de Microscopie Appliqué à la BIOlogie (CMABIO) à Caen. Les coupes obtenues ont été montées entre lame et lamelle en utilisant un liquide de montage contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) puis observées au microscope confocal (Olympus) avec un objectif 40X à immersion (longueur d'onde d'excitation à 405 nm).

Grâce à cette technique, il a été possible de confirmer la présence de cellules dans le modèle 3D à 7 jours de culture. Cependant, nous nous sommes rendu compte de la forte auto-fluorescence des fibres de collagène en plus de l'impossibilité de produire des coupes de moins de 60 µm d'épaisseur. Pour cette raison, nous avons souhaité tester une autre méthode d'immunohistochimie.

Méthode 2 : Coupes au cryostat après inclusion dans le sucrose

Le M3DC a d'abord été fixé au PFA 4% (dans PBS) sous agitation pendant 24h. Le lendemain, il a été déposé dans une solution de sucrose à 15% (dans PBS 1M) puis dans du sucrose à 30% (dans PBS 1M). L'échantillon a ensuite été porté à une température de -20°C et une tentative de coupes au microtome a été réalisée. Cependant, l'éponge s'est désagrégée immédiatement au moment de revenir à température ambiante. Cette technique a donc été abandonnée au profit de l'inclusion en paraffine.

Méthode 3 : Coupes au microtome après inclusion en paraffine

Un protocole classique d'immunohistochimie sur coupes en paraffine comprend une étape de fixation, de déshydratation et d'imprégnation en paraffine. Les blocs inclus en bloc de paraffine sont ensuite coupés au microtome puis montés sur lames de microscopie. Les lames blanches servent ensuite aux différents marquages.

Dans un premier temps, nous avons testé une technique d'IHC-p en mode automatique au laboratoire d'anatomopathologie du centre François Baclesse (Caen). L'étape d'imprégnation a été réalisée dans un appareil ASP300 (Leica, Wetzlar, Allemagne), le modèle 3D étant préalablement placé dans une cassette en plastique. La préparation des blocs, des coupes et des lames blanches a été réalisée manuellement comme décrit plus loin. Nous avons ensuite réalisé un marquage Ki-67 en automatique sur un appareil Benchmark XT IHC/ISH (Ventana, Tucson, USA) ainsi qu'une coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) classique sur d'autres lames. La coloration HES (Figure 30.A) montre que la première étape du protocole (imprégnation à la paraffine et coupes au microtome) permet de maintenir l'intégrité de l'éponge. Cependant, le marquage Ki-67 en mode automatique induit une très grande perte de matériel probablement due à l'étape de démasquage antigénique (Figure 30.B).

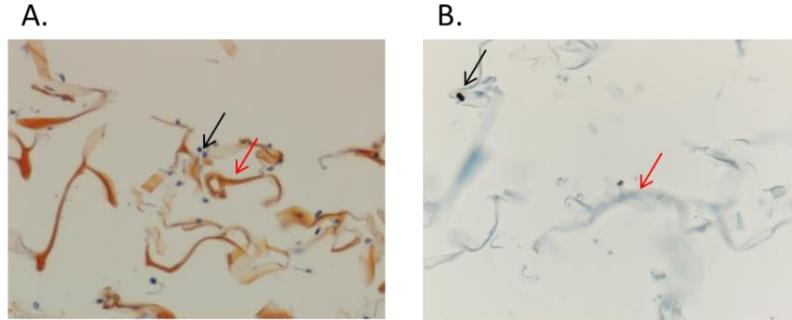


Figure 30: Résultat de l'IHC-p en mode automatique sur une coupe au microtome du M3DC

A) HES. B) Ki-67. Les cellules sont indiquées par une flèche noire et les fibres de collagène par une flèche rouge.

Etant donné la quantité de perte de matériel, nous avons décidé de passer à un protocole entièrement manuel. Les modèles sont d'abord placés dans une cassette en plastique (une éponge par cassette) qui sera déplacée d'un bain à un autre. Le protocole d'imprégnation à la paraffine est détaillé dans la Figure 31. La première partie (J₁) est réalisée au LARIA et la deuxième partie (J₂) au laboratoire d'anatomopathologie du Centre François Baclesse (Caen). La préparation des lames blanches se fait en prenant soin d'omettre une coupe sur deux au montage afin d'éviter de compter les mêmes cellules. Nous n'avons pas souhaité réaliser l'étape d'imprégnation en mode automatique (ASP 300) car les coupes obtenues contenaient beaucoup de débris (et de cellules sanguines) provenant du matériel analysé quotidiennement au laboratoire d'anatomopathologie. Une pré-inclusion dans de la gélose n'a pas amélioré le résultat final.

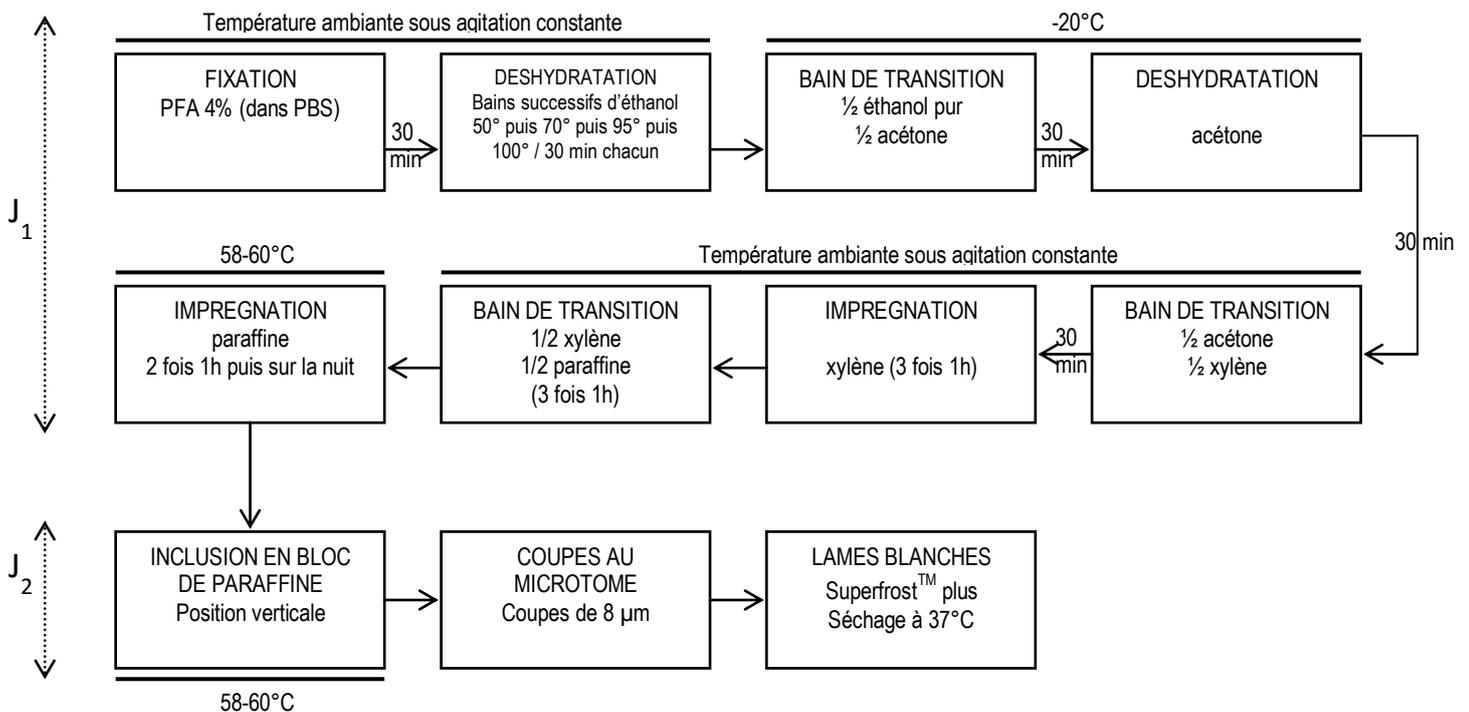


Figure 31: Protocole d'immunohistochimie-p (imprégnation et coupes au microtome)

Les lames blanches sont conservées à température ambiante jusqu'au moment de la coloration. L'anticorps anti-Ki-67 (#AB9260, couplé à une peroxydase) a été utilisé. Plusieurs mises au point ont été nécessaires, notamment concernant la nécessité ou pas d'un démasquage antigénique, le temps d'incubation et la dilution de l'anticorps primaire, l'ajout ou pas d'une étape supplémentaire afin d'accentuer la coloration de la DAB et le choix de la méthode de contre-coloration (hématoxyline non diluée suivie d'une différenciation à l'alcool acide ou hématoxyline diluée suivie d'un traitement au bicarbonate de sodium). Le protocole final retenu et correspondant aux résultats présentés dans ce manuscrit est détaillé dans la Figure 32. A noter que nous avons opté pour une révélation avec un chromogène car l'auto-fluorescence de l'éponge semblait accentuée par l'inclusion en paraffine.

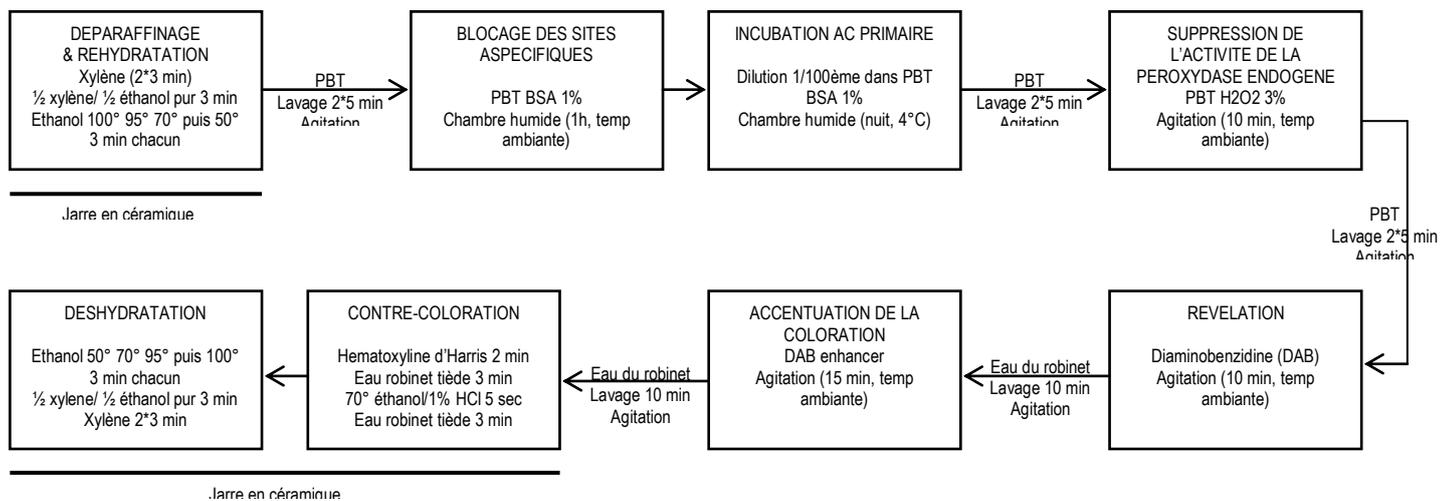


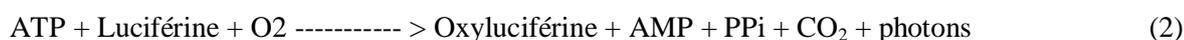
Figure 32: Protocole de coloration Ki-67 sur lames blanches (paraffine)

Une fois la coupe colorée et déshydratée, elle est montée entre lame et lamelle à l'aide d'un liquide de montage hydrophobe (contenant du xylène). Une lame contrôle (PBT au lieu de l'anticorps primaire) est réalisée à chaque coloration afin d'évaluer le bruit de fond de la coloration. Les lames sont lues à l'aide d'un microscope Vanox-S Olympus (Tokyo, Japon) en utilisant un grossissement x40. Pour chaque point de cinétique, au moins 200 noyaux sont comptés par le même expérimentateur en choisissant 2-3 champs par lame (sur un total de 5-10 lames). Seuls les noyaux franchement positifs sont comptés comme DAB positifs.

Des colorations en HES ont également été réalisées afin d'évaluer l'organisation générale du modèle 3D après 7 jours de culture cellulaire. Cette coloration a été réalisée de manière automatique au niveau du laboratoire d'anatomopathologie (Baclesse). L'acquisition d'image a été réalisée grâce à un scanner Nikon Coolscope (Tokyo, Japon) ou scanner Aperio Scanscope CS (Leica biosystems, Nussloch, Allemagne) à la plateforme d'histo-imagerie quantitative (UCBN, Caen).

6) Mesure de la radiotoxicité cellulaire directe (Toxilight™) :

La toxicité post-irradiation a été évaluée en 2D et 3D en utilisant un test métabolique appelé Toxilight™ (Lonza, Bâle, Suisse). C'est un test bioluminescent qui permet de mesurer la quantité d'Adénylate Kinase (AK) libérée dans le surnageant de culture après disruption de l'intégrité cellulaire suite à un stress chimique ou physique (cytolyse). La réaction se déroule en deux étapes ; la première consiste en la transformation d'ADP en ATP par l'AK (1). La deuxième étape fait intervenir l'ATP produit dans la transformation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase contenue dans le réactif (2). La quantité de lumière produite est directement proportionnelle à la quantité d'AK libérée par les cellules.



Le test étant réalisé sur une petite quantité de milieu de culture (20 µl), l'irradiation en 2D a été réalisée en plaque 96 puits avec strictement les mêmes conditions expérimentales (densité cellulaire, physioxie, dose d'irradiation) afin que le milieu de culture soit réduit à 100 µl par puits (tout comme les cultures 3D). Le surnageant de culture 2D ou 3D (100 µl) est collecté 24h, 48h ou 96h post-irradiation et conservé à -80°C le temps de l'analyse. Un contrôle négatif (cellules non irradiées) a été inclus à chaque point de cinétique. La digitonine (Promega, Madison, USA) qui est un détergent a été utilisé à plusieurs concentrations comme contrôle positif.

Pour la réalisation de l'essai, les instructions du fabricant ont été suivies. Brièvement, dans une plaque 96 puits à fond blanc (Greiner bio-one®), 20 µl du surnageant de culture sont mélangés à 100 µl/puits de réactif fraîchement préparé (contenant l'ADP, la luciférase et son substrat, la luciférine). Les plaques sont incubées 5 min à température ambiante (20 min pour le contrôle positif des cultures 3D) avant la mesure au Flexstation 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (Figure 33). La machine est programmée pour une lecture en point final (1 sec en point final). Un blanc contenant le milieu de culture correspondant (2D ou 3D) est inclus à chaque mesure. Les données sont récoltées en RLU (*Relative Light Unit*) qui est une valeur arbitraire.



Figure 33: Lecteur de plaque Flexstation (UCBN, Caen)

Les résultats collectés en RLU sont ensuite exprimés en ratio d'induction de nécrose (ou cytolyse). Pour ce faire, la valeur obtenue avec l'échantillon irradié est rapportée au contrôle non irradié au même point de cinétique (et de la même expérience). Pour ce qui est du contrôle positif, il est réalisé à 24h sur des échantillons non irradiés et la valeur obtenue (RLU) à chaque concentration de digitonine est rapportée au contrôle contenant 0 pM de digitonine. Les résultats sont exprimés en moyenne de ratio \pm erreur sur la moyenne ou SEM.

7) Mesure de la sénescence radio-induite :

La sénescence radio-induite a été évaluée sur les échantillons 2D par le test SA- β -gal (Promega, Madison, USA) comme précédemment décrit (Debaq-Chainiaux et al., 2009). Ce test est basé sur la détection de l'activité de la β -galactosidase à un pH proche de 6. Cette enzyme contenue dans les lysosomes de la majorité des cellules fonctionne normalement à un pH 4. Cependant, lors de sénescence, la quantité de β -galactosidase augmente considérablement due à l'arrêt métabolique et son activité devient donc détectable à un pH 6. La quantité de cellules dont le cytoplasme est bleu est directement proportionnelle à l'étendue de sénescence induite par un stress chimique ou physique.

Les flasques irradiées sont remises en culture physioxique pendant 12-16h. Elles sont ensuite détachées, comptées et remises en culture physioxique dans des flasques spéciales (NuncTM slide flasks) afin d'atteindre 50-60% de confluence 96h plus tard. Le protocole suivant a été réalisé :

- Lavage des cellules au PBS pour éliminer le milieu de culture.
- Fixation des cellules pendant 5 min à l'aide d'une solution formée de 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde.
- Lavage des cellules afin d'éviter la destruction de l'activité SA- β -gal par un contact trop prolongé avec le fixateur.

- Ajout de la solution de coloration préparée extemporanément (Tableau 7) et incubation 12-16h à 37°C (dans un incubateur 100% air afin d'éviter qu'une surcharge de CO₂ modifie le pH de la solution). La coloration bleue due au produit du clivage de l'X-gal apparaît entre 2h et 12h d'incubation.
- Lavage au PBS puis au méthanol et séchage à l'air libre.

Solution de coloration	Concentration finale
40 mM acide citrique/tampon phosphate Na	0,2 M
5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 3H ₂ O	100 mM
5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]	100 mM
150 mM chlorure de sodium	5 M
2 mM chlorure de magnésium	1M
1 mg/ml X-gal dans dH ₂ O	20 mg/ml

Tableau 7: composition de la solution de coloration pour l'essai SA-β-gal

Toutes ces étapes doivent être réalisées sous une hotte chimique à cause de produits hautement toxiques contenus dans cette solution. Les lames colorées peuvent être gardées plusieurs mois à l'abri de la lumière. Un exemple de cette coloration est représenté en Figure 34. Entre 200 et 300 cellules sont comptés par lame.

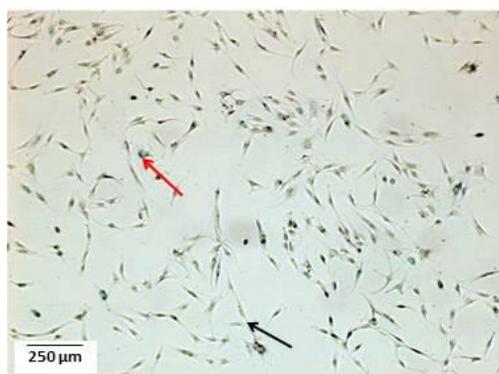


Figure 34: coloration SA-β-gal des CAH non irradiés

La flèche rouge indique une cellule X-gal positive et la flèche noire une cellule X-gal négative.

Concernant les modèles 3D, cet essai réalisable uniquement sur coupes au cryostat. Ces dernières se sont avérées impossible à réaliser sur nos modèles 3D (voir page 79). Nous avons donc utilisé un protocole soluble décrit précédemment (Lee et al., 2006) basé sur la catalyse de l'ONPG (2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) par la β-galactosidase soluble (récupérée après lyse cellulaire) en un produit coloré. L'absorbance de ce produit mesurée à 420 nm est directement proportionnelle à la quantité de β-galactosidase dans le lysat et donc de la sénescence radio-induite. Tous les tests effectués se sont soldés par des échecs et nous n'avons pas réussi

à évaluer la sénescence radio-induite de cette manière. Une autre approche basée sur la mesure par western blot de plusieurs protéines impliquées dans ce phénomène a été utilisée pour les échantillons 3D.

8) Mesure du stress oxydatif :

La mesure du stress oxydatif radio-induit a été réalisée sur les échantillons 2D grâce à la mesure de la quantité de ROS par l'utilisation de la sonde CM-H₂DCFDA ou 5-(and-6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate, acétyl ester (#C6827, Invitrogen). Cette sonde permet l'estimation du niveau global de stress oxydatif (ROS) dans une cellule. Elle diffuse de manière passive à travers la membrane cytoplasmique. Ensuite, les groupements acétate sont clivés par les estérases intracellulaires. Son groupement chlorométhyle réagit avec des groupements thiol (comme la glutathionne) intracellulaires. Des oxydations successives aboutissent à la formation d'un adduit fluorescent qui est détecté par cytométrie en flux (Figure 35). La forme chlorométhyle possède une meilleure rétention cellulaire dans les cellules vivantes que son homologue H₂DCFDA.

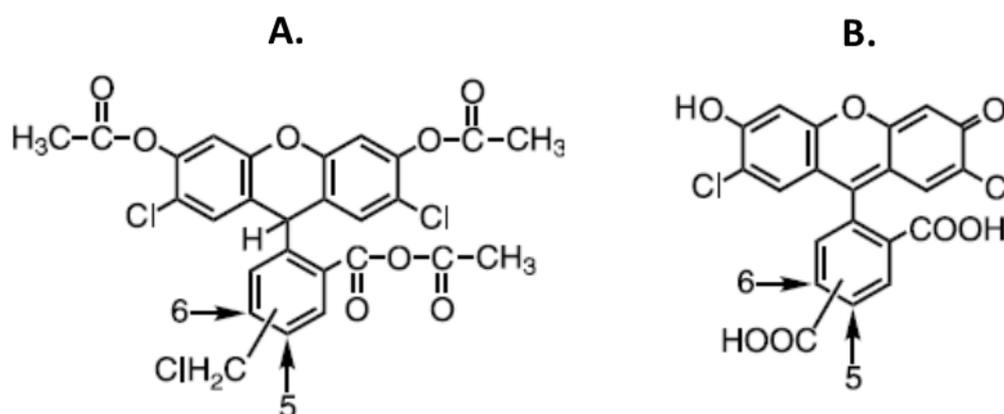


Figure 35: Structure chimique de la sonde CM-H₂DCFDA

A) Forme non fluorescente. B) Forme désacétylée et oxydée fluorescente.

Les flasques irradiées puis remises en culture physioxique ont été prélevées 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation afin de réaliser ce test. Un contrôle négatif (non irradié) a été inclus à chaque point de cinétique. Comme contrôle positif, nous avons utilisé du peroxyde d'hydrogène (100 µM) incubé avec les cellules en début de cinétique pendant 6h. L'auto-fluorescence cellulaire a été systématiquement contrôlée par l'analyse de témoins négatifs. Le protocole décrit ci-après a été réalisé en évitant toute lumière directe sur les échantillons et le réactif afin d'éviter la dégradation de la sonde :

- Préparation de la sonde (lyophilisat) dans du DMSO à 2 mM puis dans du PBS à 5 µM
- Contact des cellules avec la sonde pendant 30 min dans l'incubateur à physioxie (noir)
- Détachement des cellules puis centrifugation 5 min à 2000 tpm
- Reprise du culot dans du PBS

- Fixation de l'échantillon au PFA 3% pendant 15 min puis réduction à 2%

Les échantillons sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à analyse en cytométrie en flux. La fluorescence de la sonde métabolisée est mesurée à l'aide d'une lumière d'excitation produite par une diode bleue de 22 mW (longueur d'onde de 488 nm). La fluorescence émise est collectée sur le canal FL1 à travers un filtre *bandpass* 525 nm. Le résultat obtenu est exprimé en histogramme avec le comptage en ordonnée et la fluorescence en abscisse (Figure 36).

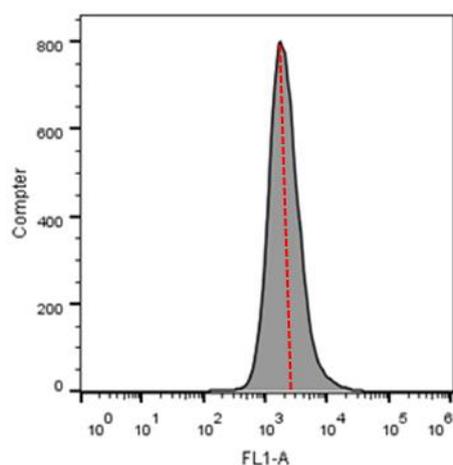


Figure 36: Analyse du stress oxydatif par la sonde CM-H2DCFDA.

Exemple d'un histogramme de fluorescence (FL1-A) obtenu à partir d'un échantillon non irradié de CAH (6h).

La médiane de la fluorescence (trait rouge sur la Figure 36) de l'échantillon irradié (ou traité à l' H_2O_2) est rapportée à la médiane de l'échantillon non irradié (ou non traité à l' H_2O_2) au même point de cinétique ce qui définit un ratio d'induction de ROS. C'est cette représentation en ratio qui a été utilisée dans la section résultats.

Concernant les échantillons 3D, nous avons testé une technique dite OxyBlot (#S7150, Millipore). Quand les protéines cellulaires sont oxydées par les ROS, certains acides aminés sont modifiés générant des groupements carbonyle. Ces derniers peuvent réagir avec la 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) qui à son tour est reconnue par des anticorps anti-2,4 dinitrophenol (DNP) sur des immunoblots comme décrit précédemment (Buonanno et al., 2011). Cependant, malgré plusieurs essais, nous n'avons pas été capables de démontrer la faisabilité de cette technique (le contrôle négatif demeurant supérieur au positif) pour évaluer le stress oxydatif post-irradiation dans nos modèles 3D.

9) Western blot :

9.1) Développement d'un protocole de lyse cellulaire adapté aux modèles 3D :

L'extraction efficace et reproductible de protéines cellulaires au sein d'une éponge de collagène a été un obstacle technique majeur car le ratio d'extraction de protéines cellulaires/collagène était initialement beaucoup trop faible, spécialement pour les protéines intranucléaires comme γ -H2AX. Nous supposons que l'utilisation d'un simple tampon d'extraction permet la destruction de la membrane cytoplasmique mais pas la libération des protéines de la trame de collagène. Plusieurs méthodes ont été testées avant de fixer un protocole utilisé dans la suite des expériences.

Méthode 1 : Lyse à l'aide d'un pilon

Dans un premier temps, nous avons testé le protocole décrit par l'équipe qui a développé le modèle de cartilage articulaire (Legendre et al., 2013). Cette technique consiste à broyer manuellement l'éponge de collagène dans du tampon de lyse (T-PER ou *Tissue Protein Extraction Reagent* 100 μ l, anti-protéases 1X, EDTA ou Acide Ethylène Diamine Tetra-Acétate 1X, anti-phosphatases 1X, NaCl 600 mM final). Cette étape est suivie de 30 min de lyse à 4°C puis une centrifugation à 14000 g pendant 45 min. Le surnageant de lyse est prélevé et un dosage protéique est réalisé. Cette technique, bien que décrite précédemment pour des protéines de la matrice, n'a pas été retenue car elle ne permettait pas une extraction efficace et reproductible des protéines cellulaires.

Méthode 2 : Lyse dans l'azote liquide

Dans un second temps, nous avons testé le protocole décrit par (Claus et al., 2012) qui consiste à congeler l'éponge (contenue dans un tube en plastique) en la plongeant dans de l'azote liquide. L'éponge peut être alors réduite en poudre à l'aide d'un pilon. Cette dernière est ensuite suspendue dans du tampon de lyse (comparable à celui décrit plus haut) et le mélange est incubé 20-30 min dans la glace. S'ensuit une centrifugation de 30 min à 14000 g et le surnageant est récupéré pour dosage. Cette technique s'est révélée peu concluante et n'a pas été retenue.

Méthode 3 : Disruption en utilisant des billes de verre

Dans un troisième temps, nous avons testé une méthode de disruption par des billes de verre en adaptant un protocole d'extraction utilisé chez la levure. Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer le diamètre de billes à utiliser (0,1 mm ou 0,5 mm) ainsi que leur volume, quel tube se prêtait le mieux à la disruption (1,5 ml ou 2 ml) ainsi que le volume de tampon d'extraction. Le gros avantage de cette technique réside dans la reproductibilité de la quantité de billes d'une extraction à une autre, à la différence des pilons qui font perdre une partie des protéines et créent ainsi une variabilité dans la quantité de protéines extraites.

Suite à l'irradiation, les modèles 3D sont récoltés à l'aide d'une pince entre 1h et 96h post-irradiation. Ils sont ensuite étiquetés et conservés à -80°C le temps de l'analyse. Le protocole de lyse optimisé est le suivant :

- Peser **25 mg** de billes de verre (0,1 mm, #079052, Dominique Dutcher) dans un tube Eppendorf de **2 ml** noté x
- Ajouter **40 µl** de tampon de lyse/ependorf (volume V1) contenant les billes de verre (x) à 4°C
- Mettre l'échantillon (stocké à -80°C) dans le tube x qui est ensuite placé dans un appareil Disruptor GENIE (Dutsher #079062) programmé sur 15 min de disruption et placé en chambre froide
- Ajouter **10 µl** (volume V2) de tampon de Laemmli 5X/ependorf x puis programmer 5' de disruption
- Chauffer l'échantillon à 100 °C pendant 5' puis vortexer et chauffer à 100 °C pendant 5'
- Vortexer puis centrifuger rapidement l'échantillon
- Récupérer **40 µl** de surnageant (V1) dans un tube (noté y) puis remettre **10 µl** de tampon de Laemmli 5X dans le tube x
- Vortexer puis chauffer l'échantillon à 100 °C pendant 5'
- Vortexer puis centrifuger rapidement l'échantillon (centrifugeuse de paillasse)
- Récupérer **10 µl** (volume V2) de surnageant et le rajouter au tube y

Ainsi, sur un volume total d'extraction de 60 µl, nous avons récupéré **50 µl d'extrait protéique** qui peut être directement déposé sur gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) ou congelé à -20 °C en attendant le dépôt. Le tampon de lyse utilisé plus haut est préparé extemporanément et est composé de :

- *Tissue Protein Extraction Reagent* ou T-PER (#78510, ThermoScientific) (1 mL)
- NaCl (850 mM)
- *Halt Protease Inhibitors Cocktail* (2X v/v), EDTA (2X v/v), (#87786, ThermoFisher)
- *Halt Phosphatase Inhibitors single-use Cocktail* (2X v/v), (#78428, ThermoFisher)

La Figure 37 représente un western blot réalisé à partir de lysat de modèles 3D de CHS à 4 ou 7 jours de culture cellulaire ou d'une éponge vide de collagène (blanc). Le pinceau (haut de l'image) démontre un bon ratio d'extraction de protéines cellulaires comparé au collagène de l'éponge vide. L'extraction cellulaire semble reproductible d'un puits à un autre avec plus de signal dans les échantillons à 7 jours de culture (gel SDS-PAGE 10%). Si ce protocole est très robuste, il ne permet cependant pas de doser les protéines.

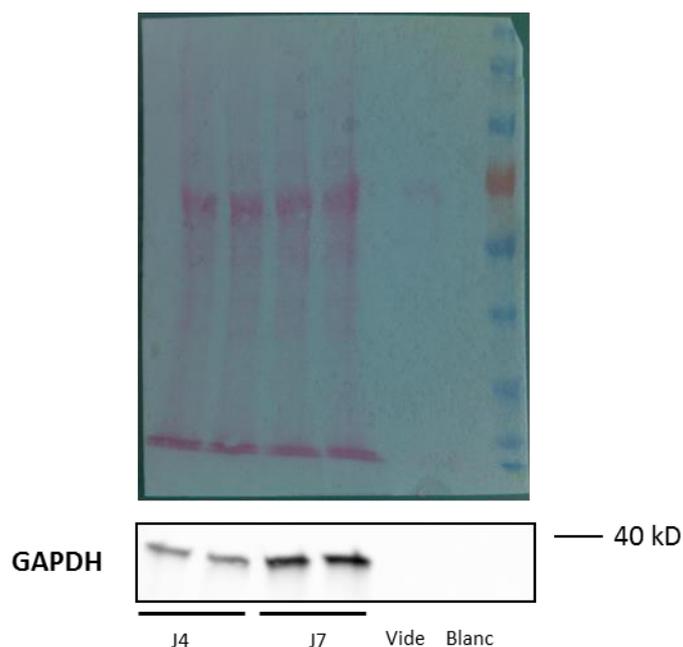


Figure 37: Western blot réalisé sur les M3DC à J4 et J7 de culture.

Ponceau (haut) et blot anti-GAPDH (bas) au 1/5000.

Afin d'estimer le ratio d'extraction, le protocole suscité a été réalisé deux fois sur le même échantillon test et le ratio des deux extraits successifs a été calculé en utilisant le signal d'Electro-ChimiLuminescence ou ECL (classico/crescendo, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) (le ratio est exprimé en moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences). Le résultat est décrit plus loin dans le manuscrit (voir page 139).

Cas de la lyse 2D:

La lyse cellulaire des échantillons 2D a été réalisée de manière comparable aux échantillons 3D. Le comptage cellulaire a servi à ajuster le volume de tampon de lyse et de La mml . Autour de 0,25 million de cellules (SW1353) et 0,15 million (CAH)/échantillon ont servi pour réaliser le western blot.

9.2) Dépôt, migration et transfert des gels :

La moitié de l'échantillon extrait (25 μ l) pour les M3DC et la totalité de l'échantillon pour les M3DCa ont subi une électrophorèse sur gel SDS-PAGE (10% ou 4-20%) suivi d'un transfert sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite bloquées 1h dans du TTBS (tampon Tris-Buffered Saline additionné de 5% p/v de lait et 0,05% de Tween-20) puis incubées sur la nuit (4 C) avec l'anticorps primaire dilué dans du TTBS 1% de lait. Le lendemain, les membranes sont incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase et dilué dans du TTBS 1% de lait. Une liste des anticorps ainsi que les dilutions utilisées est résumée dans le Tableau 8.

Anticorps	Hôte (type)	Référence (fournisseur)	Dilution	PM (kDa)
GAPDH	Souris (monoclonal)	#11335232 (thermoscientific)	1/1000 – 1/10000	37
γ -H2AX (S139)	Souris (monoclonal)	#05-636 (millipore)	1/1000	17
COX-2	Lapin (monoclonal)	#12282 (cell signaling)	1/1000	74
p21	Lapin (monoclonal)	#2947 (cell signaling)	1/1000	21
Caspase-3	Lapin (polyclonal)	#9662 (cell signaling)	1/1000	32/22/17
H2A.J	Lapin (polyclonal)	Développé par C.Mann	1/1000	15
pp53 (S15)	Lapin (polyclonal)	#9284S (cell signaling)	1/1000	53
Anti-rabbit (HRP)		#31460 (thermoscientific)	1/5000	/
Anti-mouse (HRP)		#31430 (thermoscientific)	1/5000	/

Tableau 8: Liste des anticorps utilisés dans le cadre de ce projet

La détection du signal a été réalisée à l'aide de films d'autoradiographie (GE Healthcare) en utilisant la méthode ECL. Le logiciel Image J a été utilisé afin de quantifier le signal. Une attention particulière a été portée afin de ne pas sélectionner des blots saturés. Les résultats sont exprimés comme la quantité relative de protéine X comparée au contrôle de charge (GAPDH ou Glycéraldéhyde-3 Phosphate DésHydrogénase). L'évaluation de l'EBR (E_{EBR}) est exprimée comme la quantité relative de la protéine γ -H2AX suite à une irradiation en ions accéléré divisé par le même paramètre après irradiation en bas TEL, au même point de cinétique (voir page 139).

10) Tests statistiques :

L'analyse statistique des données produites a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Les différents tests (ainsi que le nombre d'expériences) sont détaillés dans les légendes de figures.

CHAPITRE I : MISE AU POINT DES CONDITIONS D'IRRADIATION EN CULTURE 2D

Dans le cadre de ces travaux de thèse, deux types cellulaires ont été utilisés : la lignée de CHS la mieux caractérisée, SW1353, ainsi que des cellules primaires de chondrocytes articulaires humains (CAH). Ces cellules de CAH proviennent de deux donneurs mâles caucasiens sans affections apparentes ou déterminées ni addictions ; le donneur 1 (D1) était âgé de 38 ans et le donneur 2 (D2) de 50 ans, limitant les disparités liées à la croissance ou à l'âge. Les CAH sont des cellules primaires qui ne peuvent être réensemencés plus de 4-5 fois car elles atteignent un état de différenciation irréversible. Ces contraintes impactent le nombre de points expérimentaux réalisables simultanément et nécessitent des temps de culture très longs (un mois pour une expérience d'irradiation).

Dans la première partie de ce chapitre, nous ne présentons que les résultats obtenus avec le 1^{er} donneur de CAH. La deuxième partie comprend des résultats obtenus avec les deux donneurs de CAH.

1) Effet oxygène sur la survie des CAH et de la lignée SW1353 après une irradiation en RX (bas TEL) :

Le cartilage articulaire est un tissu avasculaire composé de chondrocytes différenciés qui synthétisent une matrice extracellulaire (MEC). L'absence naturelle de vaisseaux sanguins dans le cartilage induit localement une faible tension en O₂ (physioxie à environ 2%). Classiquement, en radiobiologie, les irradiations se font en normoxie (20% d'O₂). Cependant, en vue de l'utilisation d'un modèle 3D physioxique pour des études d'hadronbiologie, nous avons souhaité sélectionner un référentiel 2D pertinent. Pour ce faire, nous avons sélectionné des RX, plus simples d'accès, afin de comparer l'impact de la tension d'oxygène sur la prolifération et la sensibilité des CAH et de la lignée SW1353 aux RIs (bas TEL dans ce cas), en culture 2D.

Dans un premier temps, nous avons évalué le PE (*plating efficiency*) et le temps de doublement de ces deux types cellulaires en culture 2D normoxique et physioxique (Figure 38). Au bout de 12 jours de culture, le nombre de clones de plus de 50 cellules formés par les CAH était de 14,7% ± 1,7% et 26,6% ± 2,0% en normoxie et physioxie, respectivement. Concernant la lignée SW1353, le PE était de 25,5% ± 1,7% et 33,2% ± 2,0% en normoxie et physioxie, respectivement (Tableau 9). Le PE est donc significativement supérieur en physioxie en comparaison à la normoxie, et ce pour les deux types cellulaires (Figure 38.A). Par ailleurs, le temps de doublement a été évalué à ~ 70h et ~ 22h pour les chondrocytes normaux et la lignée SW1353, respectivement, et ce, pour les deux conditions de culture (Figure 38.B). Le temps de doublement ne semble pas être influencé par la tension d'oxygène et ne peut donc expliquer les meilleures capacités de prolifération conférées par la faible tension d'oxygène aux chondrocytes normaux et chondrocytes de CHS.

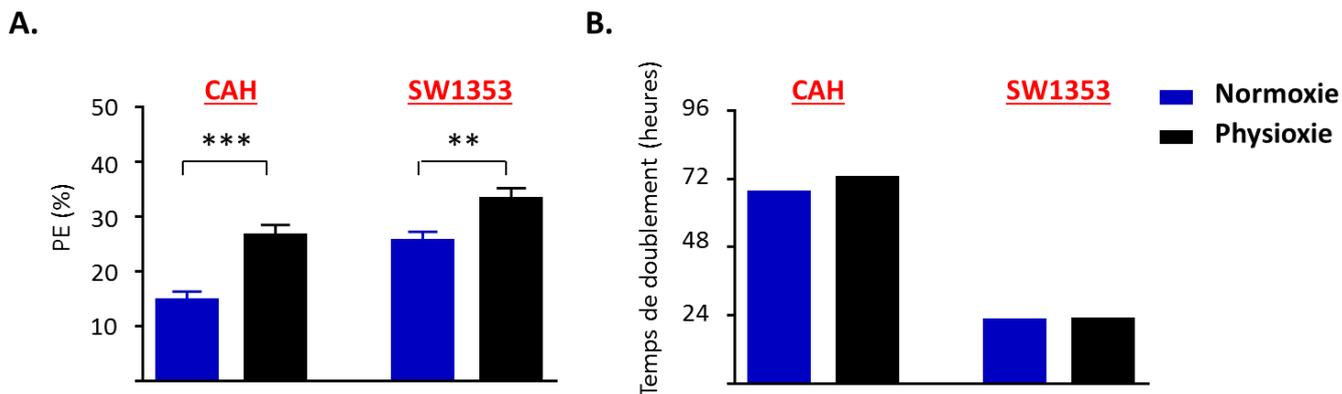


Figure 38: Etude de la prolifération dans les CAH (D1) et la lignée SW1353 en culture 2D normoxique et physioxique

A : Analyse du nombre de colonies de plus de 50 cellules (PE %) en normoxie et physioxie. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur sur la moyenne de trois (CAH) à six (SW1353) expériences indépendantes (test t non apparié, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). **B :** Temps de doublement des CAH (D1) et SW1353 en normoxie et physioxie.

Dans un second temps, nous avons évalué la survie cellulaire des CAH et de la lignée SW1353 en culture 2D physioxique et normoxique. La Figure 39 présente le résultat de ces courbes de survie et le Tableau 9 résume les caractéristiques de ces courbes.

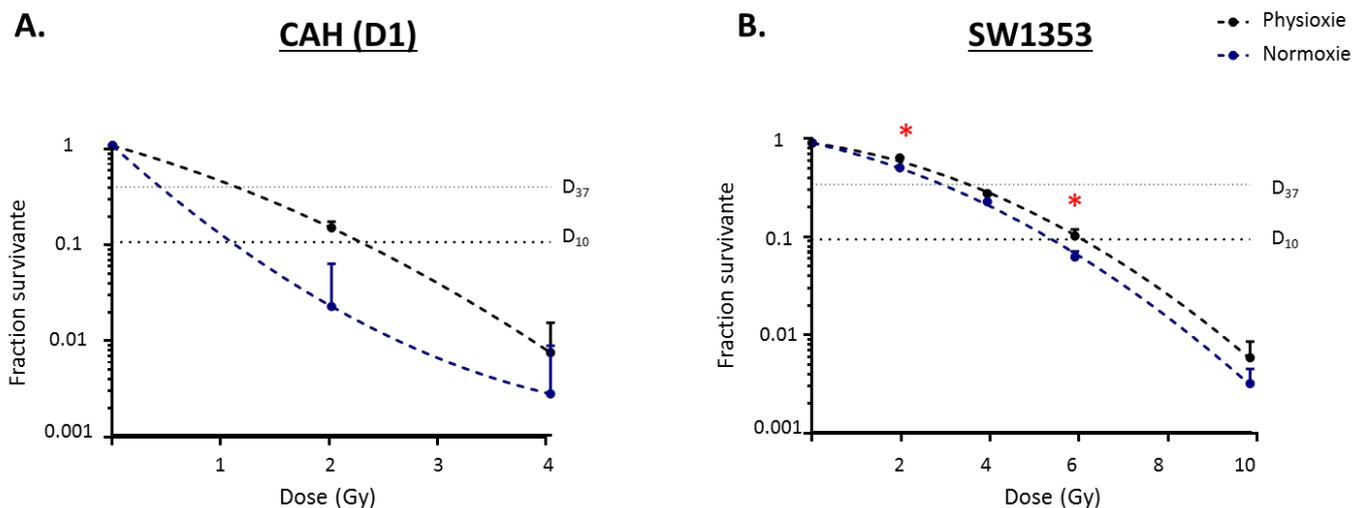


Figure 39: Courbes de survie des CAH (D1) et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL) en culture 2D normoxique et physioxique

Les CAH (1^{er} donneur) et les SW1353 ont été irradiés avec les doses indiquées de RX (bas TEL) en normoxie (bleu) ou en physioxie (noir). Les courbes représentent les fractions survivantes de cellules obtenues selon le modèle linéaire quadratique. Les résultats sont représentés en moyenne \pm erreur type sur la moyenne de trois à six expériences indépendantes. Test t (non apparié) à chaque dose d'irradiation entre la physioxie et la normoxie, * $p < 0,05$.

Les coefficients de corrélation R^2 nous ont semblé satisfaisants pour la lignée SW1353 (0,930 en normoxie et 0,900 en physioxie). Cependant, ces coefficients sont plus faibles pour les CAH (0,487 en normoxie et 0,743 en physioxie). Ceci peut être expliqué par le nombre inférieur d'expériences réalisées avec le 1^{er} donneur de CAH (n=3) en raison des temps de culture très longs que nécessitent ces cellules primaires. Le composant α est supérieur après une irradiation en normoxie ($2,354 \pm 0,898 \text{ Gy}^{-1}$ pour les CAH et $0,230 \pm 0,034 \text{ Gy}^{-1}$ pour la lignée SW1353) comparé à l'irradiation en physioxie ($0,729 \pm 0,426 \text{ Gy}^{-1}$ pour les CAH et $0,145 \pm 0,036 \text{ Gy}^{-1}$ pour la lignée SW1353). Pour ce qui est des CAH, les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 sont respectivement de 1,1 Gy, 0,4 Gy et 2,2 % en normoxie, et 2,3 Gy, 1,1 Gy et 14,0 % en physioxie. En ce qui concerne la lignée SW1353, ces mêmes valeurs sont, respectivement, de 5,5 Gy, 3,0 Gy et 54,9% en normoxie, et 6,2 Gy, 3,6 Gy et 64,6 % en physioxie. De ce fait, la physioxie confère une relative radiorésistance aux cellules de chondrocytes normaux et de CHS en culture 2D. De plus, la lignée SW1353 est plus radio-résistante que le 1^{er} donneur de CAH quelles que soient les conditions de culture.

	Tension d'O ₂	N	PE (%)	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	R ²	D ₁₀ (Gy)	D ₃₇ (Gy)	FS ₂ (%)
CAH (D1)	Normoxie	3	14,7 ± 1,7	2,354 ± 0,898	-0,219 ± 0,244	0,487	1,1	0,4	2,2
	Physioxie	3	26,6 ± 2,0	0,729 ± 0,426	0,126 ± 0,115	0,743	2,3	1,1	14,0
SW1353	Normoxie	6	25,5 ± 1,7	0,230 ± 0,034	0,035 ± 0,004	0,930	5,5	3,0	54,9
	Physioxie	6	33,2 ± 2,0	0,145 ± 0,036	0,037 ± 0,005	0,900	6,2	3,6	64,6

Tableau 9: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1) et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL) en culture 2D normoxique et physioxique

La définition des paramètres est détaillée dans la section « matériels et méthodes » en page 73.

Dans le but d'analyser plus en détails cet effet différentiel de la tension d'oxygène sur la survie cellulaire des chondrocytes normaux et de CHS en culture 2D, nous avons repris les mêmes plaques de culture utilisées pour la clonogénicité et avons compté l'ensemble des colonies formées d'une cellule à plus de 100 cellules. Nous avons ensuite fixé des classes de colonies en fonction de leur taille n : $n = 1-20$ cellules ou 20-100 cellules ou encore supérieur à 100 cellules. Le résultat de cette analyse de distribution de taille de colonies après une irradiation avec une dose unique de 2 Gy (RX) est représenté en Figure 40.A pour les CAH et Figure 40.B pour la lignée de CHS SW1353.

Dans le cas des CAH, la proportion de colonies composées de plus de 100 cellules était, respectivement, d'environ 13% et 37% dans le groupe contrôle normoxie et physioxie. Une dose unique de 2 Gy (RX) a réduit cette proportion à environ 2% pour les deux groupes normoxie et physioxie. Pour ce qui est de la lignée SW1353, le pourcentage de colonies composées de plus de 100 cellules a été évalué à environ 28% et 35%

dans le groupe contrôle normoxie et physioxie, respectivement. Une dose unique de 2 Gy (RX) a réduit cette proportion à environ 21% et 28% pour le groupe normoxie et physioxie, respectivement. Le nombre de clones comptés et de répétitions d'expériences, nous permettent d'affirmer que les clones formés en physioxie sont significativement plus grands qu'en normoxie et ce pour les deux types cellulaires (Figure 40.A et Figure 40.B). Ceci explique les valeurs supérieures de PE en condition physioxique observées plus haut (Figure 38.A). Cependant, Cet avantage prolifératif semble perdu après une dose unique de 2 Gy (RX) dans le cas des CAH (1^{er} donneur) mais maintenu dans le cas de la lignée de CHS.

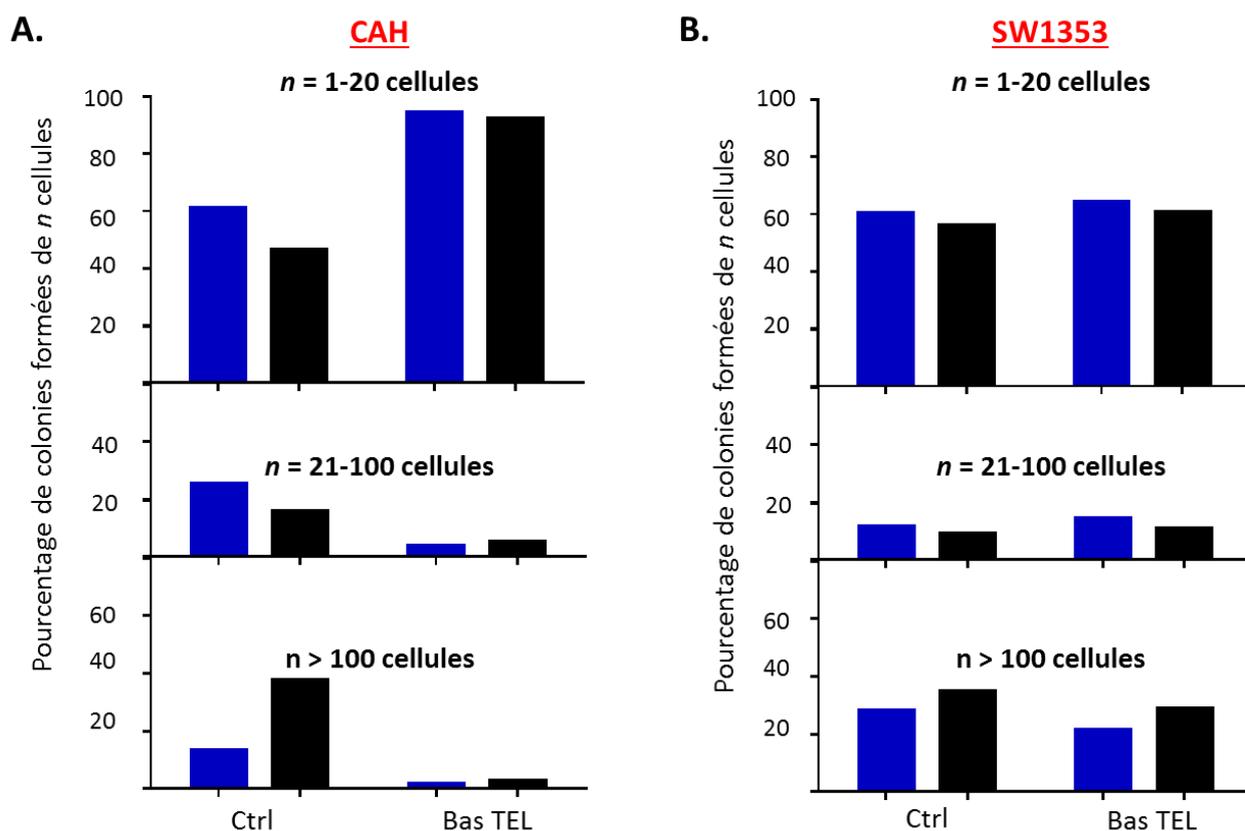


Figure 40: Analyse de la distribution de taille de colonies des CAH et de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL, 2 Gy) en culture 2D physioxique et normoxique

Les cellules (A : CAH, B : SW1353) irradiées en normoxie (bleu) ou physioxie (noir) sont remises en culture à faible densité, pendant 12 jours et sont ensuite fixées et colorées au *crystal violet*. Le nombre de cellules par colonie est déterminé et ce pour au moins 350 colonies par condition. Les résultats correspondant à 3 à 6 expériences indépendantes regroupées et représentés comme le pourcentage de colonies composées d'au moins n cellules.

2) Variabilité interindividuelle de la radiosensibilité des CAH après irradiation en RX (bas TEL) :

L'utilisation des cellules primaires en biologie et plus particulièrement en radiobiologie pose la question de la variabilité interindividuelle en raison de plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe ou encore le fond génétique du donneur. Au moment de sélectionner les donneurs, nous avons fait en sorte de choisir des profils comparables (même âge, même sexe, même origine ethnique). Nous avons ensuite souhaité évaluer la radiosensibilité des deux donneurs de CAH après irradiation en RX (bas TEL), plus faciles d'accès.

Dans un premier temps, nous avons évalué le PE et le temps de doublement de ces deux donneurs de CAH en culture physioxique 2D (Figure 41). Au bout de 12 jours de culture, le nombre de clones de plus de 50 cellules formés était, respectivement, de $26,6\% \pm 2,0\%$ et $47,2\% \pm 2,0\%$ pour le 1^{er} et le 2^{ème} donneur de CAH (Tableau 10). Le PE est donc significativement supérieur pour le 2^{ème} donneur de CAH en culture physioxique (Figure 41.A). Par ailleurs, le temps de doublement a été évalué à ~ 70 h et ~ 29 h pour le 1^{er} et le 2^{ème} donneur de CAH, respectivement, en culture physioxique 2D (Figure 41.B). Les deux donneurs, bien que de physiologies comparables, ont montré des temps de doublement cellulaire différents qui peuvent expliquer la différence observée dans la valeur de PE (Figure 41.A). Après analyse de la distribution du cycle cellulaire en cytométrie en flux (marquage à IP et à l'EdU), il semblerait que cette divergence ne soit pas due à une vitesse de prolifération différente (phase du cycle G₁, S, G₂ et M) mais plutôt à une phase G₀ plus longue dans le cas du premier donneur.

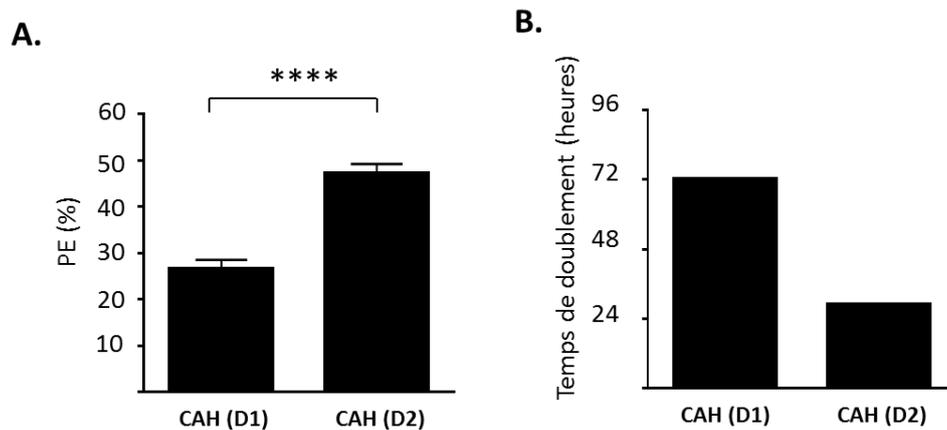


Figure 41: Etude de la prolifération des CAH (D1, D2) en culture 2D physioxique

A : Analyse du nombre de colonies de plus de 50 cellules (PE %). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur sur la moyenne de trois (CAH D1) à quatre (CAH D2) expériences (test *t* non apparié, **** $p < 0,0001$). **B :** Temps de doublement des CAH (D1 et D2) en physioxie.

Dans un second temps, nous avons souhaité savoir si cette différence de prolifération impactait la survie des deux donneurs de CAH suite à une irradiation en RX (bas TEL) en culture 2D physioxique. La Figure 42 présente le résultat de ces courbes de survie et le Tableau 10 résume les caractéristiques de ces courbes.

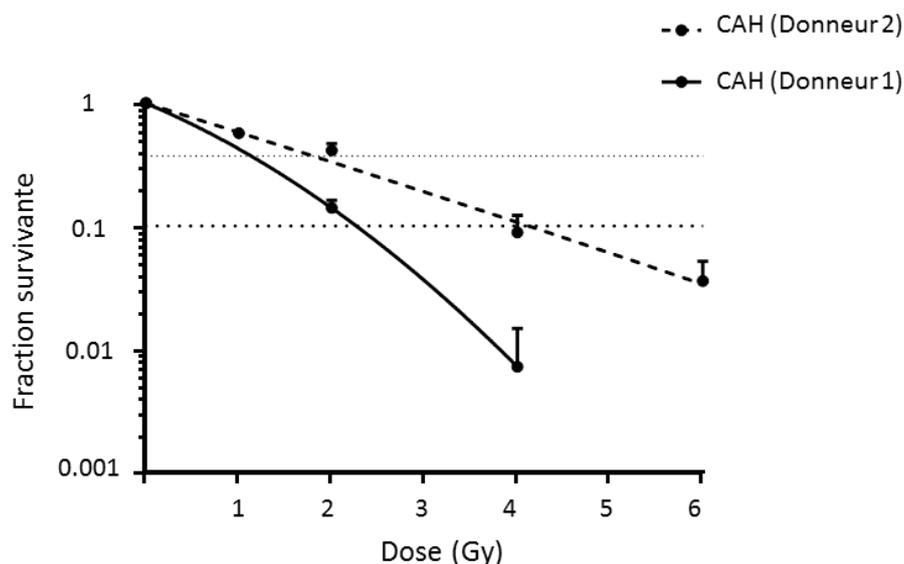


Figure 42: Courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL) en culture 2D physioxique

Les CAH (1^{er} en trait plein et 2^{ème} donneur en trait discontinu) ont été irradiés avec les doses indiquées de RX (bas TEL) en physioxie. Les courbes représentent les fractions survivantes de cellules obtenues selon le modèle linéaire quadratique. Les résultats sont représentés en moyenne \pm erreur type sur la moyenne de trois à quatre expériences.

En culture physioxique 2D, les coefficients de corrélation R^2 pour les deux donneurs nous ont semblé faibles (0,743 pour D1 et 0,723 pour D2) en comparaison à la lignée SW1353 (0,900, Tableau 9). Le composant α est supérieur pour le 1^{er} donneur ($0,729 \pm 0,426 \text{ Gy}^{-1}$) par rapport au 2^{ème} donneur ($0,542 \pm 0,023 \text{ Gy}^{-1}$). Les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 sont de 2,3 Gy, 1,1 Gy et 14% pour le 1^{er} donneur et 4,1 Gy, 1,8 Gy et 33,3 % pour le 2^{ème} donneur (Tableau 10). De ce fait, le 2^{ème} donneur de CAH est relativement plus radio-résistant que le 1^{er} donneur en culture physioxique 2D.

CAH	N	PE (%)	$\alpha \text{ (Gy}^{-1}\text{)}$	$\beta \text{ (Gy}^{-2}\text{)}$	R^2	$D_{10} \text{ (Gy)}$	$D_{37} \text{ (Gy)}$	$FS_2 \text{ (%)}$
Donneur 1	3	$26,6 \pm 2,0$	$0,729 \pm 0,426$	$0,126 \pm 0,115$	0,743	2,3	1,1	14,0
Donneur 2	4	$47,2 \pm 2,0$	$0,542 \pm 0,118$	$0,004 \pm 0,023$	0,723	4,1	1,8	33,3

Tableau 10: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL) en culture 2D physioxique

Dans le but d'analyser plus en détails cet effet différentiel entre donneurs de CAH en culture physioxique 2D, nous avons repris les mêmes plaques de culture utilisées pour la clonogénicité et évalué la distribution de taille de colonies comme décrit un peu plus haut. Le résultat de cette analyse après une irradiation avec une dose unique de 2 Gy (RX) est représenté en Figure 43. Dans le groupe contrôle, le pourcentage de colonies formées de plus de 100 cellules était, respectivement, d'environ 37% et 60% pour le 1^{er} et le 2^{ème} donneur. Une dose unique de 2 Gy (RX) a réduit cette proportion à environ 2% et 23% pour le 1^{er} et le 2^{ème} donneur, respectivement. De ce fait, les clones formés par le 2^{ème} donneur sont significativement plus grands que ceux formés par le 1^{er} donneur, ce qui peut être relié au temps de doublement deux fois plus grand pour le D2 (Figure 41.B) et qui explique les valeurs de PE observées plus haut (Figure 41.A). Cet avantage prolifératif semble être maintenu après une dose unique de 2 Gy (RX) ce qui explique la relative radiorésistance observée au niveau des courbes de survie (Figure 42).

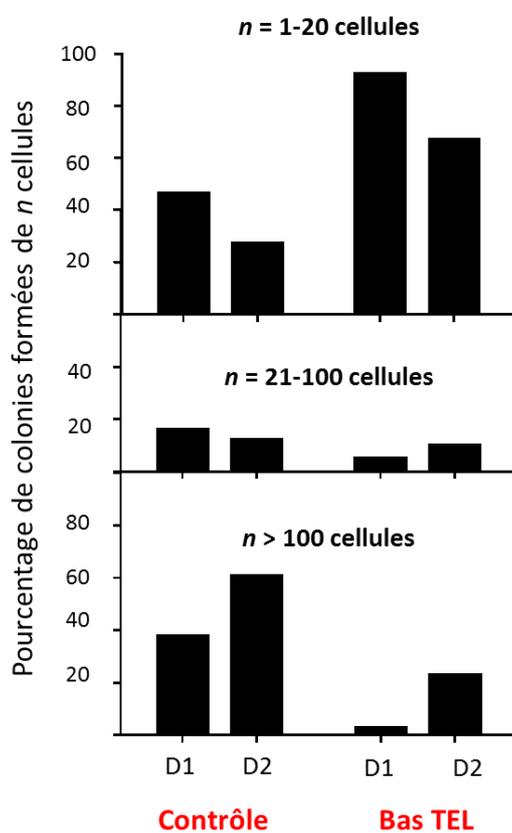


Figure 43: Analyse de la distribution de taille de colonies des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL, 2 Gy) en culture 2D physioxique

Les cellules irradiées en physioxie sont remises en culture à faible densité, pendant 12 jours et sont ensuite fixées et colorées au crystal violet. Le nombre de cellules par colonie est déterminé et ce pour au moins 350 colonies par condition. Les résultats correspondant à 3 à 4 expériences sont regroupés et représentés comme le pourcentage de colonies composées d'au moins n cellules.

3) Discussion :

La faible tension d'oxygène est souvent liée à la radiorésistance *via* des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN. Elle est également associée à une plus faible production de ROS. Ces derniers sont impliqués dans l'accélération du processus de sénescence répllicative. La plus forte production de ROS associée à la normoxie (20% d'O₂) pourrait être responsable d'une plus forte induction de sénescence répllicative en comparaison à la physioxie. Ceci peut expliquer la taille supérieure des clones en physioxie en comparaison à la normoxie et ce pour les deux types cellulaires (voir PE). Cependant, cet effet est plus marqué avec les CAH (D1), en comparaison à la lignée immortalisée SW1353, probablement car les chondrocytes normaux sont plus sensibles à la sénescence répllicative (Musumeci et al., 2015). Par ailleurs, nous avons démontré que la physioxie à 2% d'O₂ confère une relative radiorésistance aux cellules comparée à la normoxie (distribution de taille de colonies), bien que cette différence soit moins marquée en comptant uniquement les clones supérieurs à 50 cellules (courbes de survie). Ces résultats remettent en cause la limite de 50 cellules que la plupart des laboratoires utilisent afin de déterminer les courbes de survie. De plus, ils posent la question de la pertinence de l'utilisation d'incubateurs à air dans la plupart des laboratoires de radiobiologie.

Concernant les deux donneurs de CAH, le temps de doublement supérieur du D2 en comparaison au D1 pourrait être expliqué par la zone du cartilage articulaire dont sont issues ces cellules. De plus, le temps de doublement ne peut pas expliquer seul la relative radiosensibilité du D1 comparé au D2. En effet, nous avons vu dans l'introduction (voir page 48) que la tension d'oxygène pouvait varier d'1% à 10% dans les différentes zones du cartilage articulaire mature. Il est ainsi possible que les chondrocytes du D1 proviennent d'une zone du cartilage à plus forte tension d'oxygène et donc que ces cellules soient moins habituées à une physioxie à 2%. De même, les chondrocytes du D2 provient peut être d'une zone moins riche en oxygène et possèdent donc des mécanismes de réparation des CDBs plus performants. Malgré le choix de donneurs d'âges, de sexes et d'origine ethnique comparable, cette observation montre certainement l'importance de la zone du cartilage dont sont issus les CAH.

Enfin, en culture physioxique 2D, nous noterons que la lignée de CHS SW1353 reste plus radio-résistante aux RX que les deux donneurs de CAH avec une D₁₀ à 6,2 Gy (2,3 Gy pour le D1 et 4,1 Gy pour le D2).

Les résultats obtenus ont permis de valider la culture physioxique en flasque 2D comme contrôle interne du modèle 3D de cartilage humain. Etant donné le temps de doublement plus rapide du 2^{ème} donneur, nous avons décidé de continuer les expériences 3D avec ce donneur (voir chapitre II).

CHAPITRE II : EFFETS DES IONS CARBONE (TEL INTERMEDIAIRE) SUR UN MODELE 3D DE CARTILAGE ARTICULAIRE

Les résultats de ce chapitre correspondent à une publication soumise le 30 septembre 2015 au journal IJROBP (International Journal of Radiation Oncology, Biology & Physics, Particle therapy special issue) et acceptée le 3 février 2016 (doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.02.014). Une copie du manuscrit accepté se trouve à la fin de ce document.

Dans ce chapitre, seuls les résultats obtenus avec le 2^{ème} donneur de CAH sont présentés à l'exception des courbes de survie en culture 2D.

Durant une hadronthérapie par ions carbone, les tissus sains sont, en théorie, irradiés par des particules de TEL intermédiaire (~ 30 keV/μm) en amont du pic de Bragg (~ 100 keV/μm). L'évaluation du risque de séquelles au niveau des tissus sains tel le cartilage hyalin ou de cancers secondaires dans le trajet du faisceau de particules chargées n'est pas totalement prédite (Newhauser and Durante, 2011). Si les séquelles liées à la RT conventionnelle sont globalement bien décrites, ce n'est pas le cas des mécanismes cellulaires en réponse aux RIs, spécialement dans les cellules d'origine mésenchymateuse. L'étude de tels mécanismes est d'autant plus importante pour les ions carbone du fait de la tendance à l'hypo-fractionnement des protocoles d'hadronthérapie qui induisent un dépôt de dose plus élevé dans les tissus sains (Kamada et al., 2015).

Chez les patients atteints de cancer traités par chimiothérapie et/ou RT, la sénescence cellulaire peut aboutir au dysfonctionnement de l'organe ou le tissu concerné et contribuer à la détérioration de la qualité de vie des patients (van Deursen, 2014). Ceci peut devenir un problème sanitaire majeur étant donné l'espérance de vie prolongée des patients. Le cartilage articulaire hyalin peut être exposé aux RIs induisant une différenciation osseuse et de la sénescence (Saintigny et al., 2015). La sénescence des chondrocytes dite « chondrosenescence » a été définie comme la « détérioration progressive liée à l'âge des chondrocytes suite à des facteurs intrinsèques et extrinsèques » (Mobasher et al., 2015). Par conséquent, ces cellules développent un phénotype sécrétoire spécifique (SIPS) qui induit une perte du phénotype différencié chondrocytaire (synthèse de la MEC) à l'origine d'une ostéoarthrose douloureuse.

Dans le but d'évaluer la sénescence radio-induite dans les modèles 3D de cartilage, nous avons sélectionné trois protéines d'intérêt à analyser en western blot ; les protéines p21, H2A.J et COX-2 (Cyclo-OXYgénase 2). La protéine p21 (CKI) a été associée à la sénescence cellulaire et la protection contre l'apoptose dans différentes lignées cellulaires (Romanov et al., 2012) et joue un rôle majeur dans la régulation des effets à long terme des rayonnements ionisants dans les tissus d'origine mésenchymateuse (Mehrara et al., 2010). La protéine H2A.J a été récemment décrite comme un variant d'histone qui s'accumule dans les cellules humaines en sénescence (Contrepois et al., in revision). La protéine COX-2 a, quant à elle, été associée à la

différenciation chondrocytaire (Ulivi et al., 2008). Le choix de ces marqueurs nous a donc semblé pertinent pour l'analyse de la sénescence radio-induite.

L'EBR est un paramètre important d'évaluation de la dose clinique prescrite dans le volume tumoral et la dose maximale tolérée par les tissus sains. Cependant, les EBRs en clinique sont principalement extraites de données de courbes de survie réalisées en culture 2D et en normoxie ($pO_2=20\%$). Ces conditions sont très éloignées de l'homéostasie humaine à la différence des modèles de culture 3D qui peuvent recréer des conditions physiologiques plus proches du corps humain. Le but de cette étude est d'évaluer le risque relatif de sénescence dans un modèle 3D de cartilage suite à une irradiation en ions carbone (TEL intermédiaire) dans un contexte de traitement de CHS. Des irradiations en bas TEL (RX) ont également été réalisées afin de comparer ce risque relatif. La culture monocouche 2D ainsi que les RX ont été utilisés comme contrôle interne.

Le TEL plus élevé des ions carbone par rapport aux RXs, a permis d'émettre le postulat que les ions carbonés induiraient un risque relatif plus élevé de sénescence par rapport aux RXs. Cependant, nos résultats n'ont pas mis en évidence une meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire par rapport aux rayonnements de bas TEL, dans le modèle M3DCa, à la différence de la culture 2D. Cette méthode pourrait servir à l'évaluation du risque relatif de séquelles radio-induites lors d'un protocole d'hadronthérapie par ions carbone.

1) Résultats :

1.1) Survie et prolifération post-irradiation des CAH en culture 2D:

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet différentiel des rayonnements de bas TEL et de TEL intermédiaire sur la survie et la prolifération chondrocytaire en culture 2D (Figure 44). Sans surprise, le test de clonogénicité a montré une altération dose-dépendante de la survie pour les deux types de RIs.

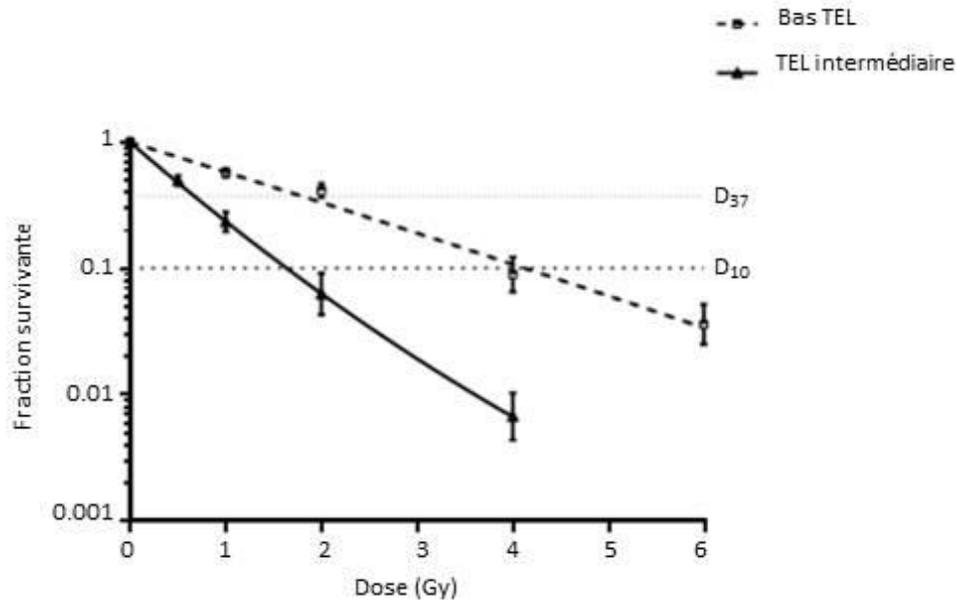


Figure 44: Courbes de survie des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

Les CAH ont été irradiés avec les doses indiquées de RI de bas TEL (carrés) ou de TEL intermédiaire (triangle). Les courbes (trait discontinu pour les RXs de bas TEL et trait continu pour les ions carbone de TEL intermédiaire) représentent les fractions survivantes de CAH obtenues selon le modèle linéaire quadratique. Les résultats sont représentés en moyenne \pm erreur type sur la moyenne de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat.

Les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 extrapolées à partir de ces courbes de survie sont de 4,1 Gy, 1,8 Gy et 33,3% pour les rayonnements de bas TEL et 1,6 Gy, 0,7 Gy et 6,3% pour les rayonnements de TEL intermédiaire, respectivement (Tableau 11). Ainsi, en culture monocouche 2D, les CAH sont plus radiosensibles aux RIs de TEL intermédiaire avec une EBR de 2,6 (D_{10}). En hadronthérapie, la dose biologique équivalente [Gy(RBE)] se réfère à la dose physique (Gy) délivrée corrigée par un facteur d'efficacité biologique (Newhauser and Durante, 2011). Si l'on se réfère à l'EBR obtenue ici (2,6), la dose de 2 Gy utilisée pour l'irradiation des échantillons en ions carbone (TEL intermédiaire) correspond en fait à une dose de 5,2 Gy(RBE).

Il est intéressant de noter qu'une EBR similaire a été obtenue en utilisant le premier donneur de CAH. En effet, Les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 extrapolées à partir des courbes de survie sont de 2,3 Gy, 1,1 Gy et 14% pour les rayonnements de bas TEL et 1,1 Gy, 0,5 Gy et 2,0% pour les rayonnements de TEL intermédiaire, respectivement (Tableau 11). Ainsi, l'EBR obtenue à 10% de survie était de 2,1.

	RI	n	PE (%)	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	R ²	D ₁₀ (Gy)	D ₃₇ (Gy)	FS ₂ (%)	EBR ₁₀	EBR ₃₇
Donneur 2	Bas TEL	4	47,2 ± 2,0	0,542 ± 0,118	0,004 ± 0,023	0,723	4,1	1,8	33,3	-	-
	TEL intermédiaire	4	31,3 ± 2,6	1,512 ± 0,205	-0,064 ± 0,057	0,794	1,6	0,7	6,3	2,6	2,6
Donneur 1	Bas TEL	3	26,6 ± 2,0	0,729 ± 0,426	0,126 ± 0,115	0,743	2,3	1,1	14,0	-	-
	TEL intermédiaire	2	25,3 ± 1,3	2,267 ± 0,356	-0,149 ± 0,096	0,922	1,1	0,5	2,0	2,1	2,2

Tableau 11: Caractéristiques des courbes de survie des CAH (D1, D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

La définition de ces paramètres est détaillée dans la section « matériels et méthodes » en page 73.

La problématique subséquente a été de déterminer si la meilleure efficacité biologique des ions de TEL intermédiaire était liée à un défaut de prolifération ou à la mort cellulaire des CAH en 2D. L'analyse de la distribution de taille de colonie a montré une altération TEL-dépendante de la taille des clones (Figure 45.A). En effet, environ 60% des colonies étaient composées de plus de 100 cellules dans le groupe contrôle. Une dose unique de 2 Gy a réduit cette proportion respectivement à 23% et 8% pour les RIs de bas TEL et de TEL intermédiaire. La prolifération en 2D a également été évaluée par l'expression de la protéine Ki-67 (Figure 45.B) présente durant toutes les phases du cycle et absente des cellules en quiescence (Scholzen and Gerdes, 2000). L'indice de prolifération était de 7,7% ± 0,8%, 1,7% ± 0,3% et 1,6% ± 0,3% dans les groupes contrôle, Bas TEL et TEL intermédiaire, respectivement. Ceci démontre une augmentation radio-induite du pool de cellules arrêtées en phase G₀ suite à l'irradiation indépendamment du TEL.

La distribution du cycle cellulaire a également été analysée par cytométrie en flux (Figure 45.C/D). Il est connu que la culture cellulaire à confluence induit une pseudo-synchronisation des cellules en phase G₀/G₁. Ainsi, dans le groupe contrôle non irradié, nous avons mesuré une vague de phase S à partir du temps 18h, à la différence des groupes irradiés (bas TEL et TEL intermédiaire). En effet, les deux RIs ont induit un arrêt en G₀/G₁ induisant un décalage de la phase S. De plus, nous noterons qu'une fraction des cellules arrêtées en G₀/G₁ (1/3 du groupe contrôle) semble reprendre le cycle au temps 24h post-irradiation en bas TEL. Par contre, dans le groupe irradié en ions de TEL intermédiaire, la fraction de cellules bloquées en phase G₀/G₁ ne reprend pas le cycle cellulaire jusqu'à 96h post-irradiation.

Ces expérimentations montrent que les deux types de RIs (bas TEL et TEL intermédiaire) réduisent la survie cellulaire en 2D en induisant un blocage dans les phases G₀ et G₁ du cycle cellulaire. Cependant, la meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire en culture 2D par rapport aux RX (Figure 42) ne semble pas pouvoir être attribuée à une plus forte réduction de la prolifération dans les CAH.

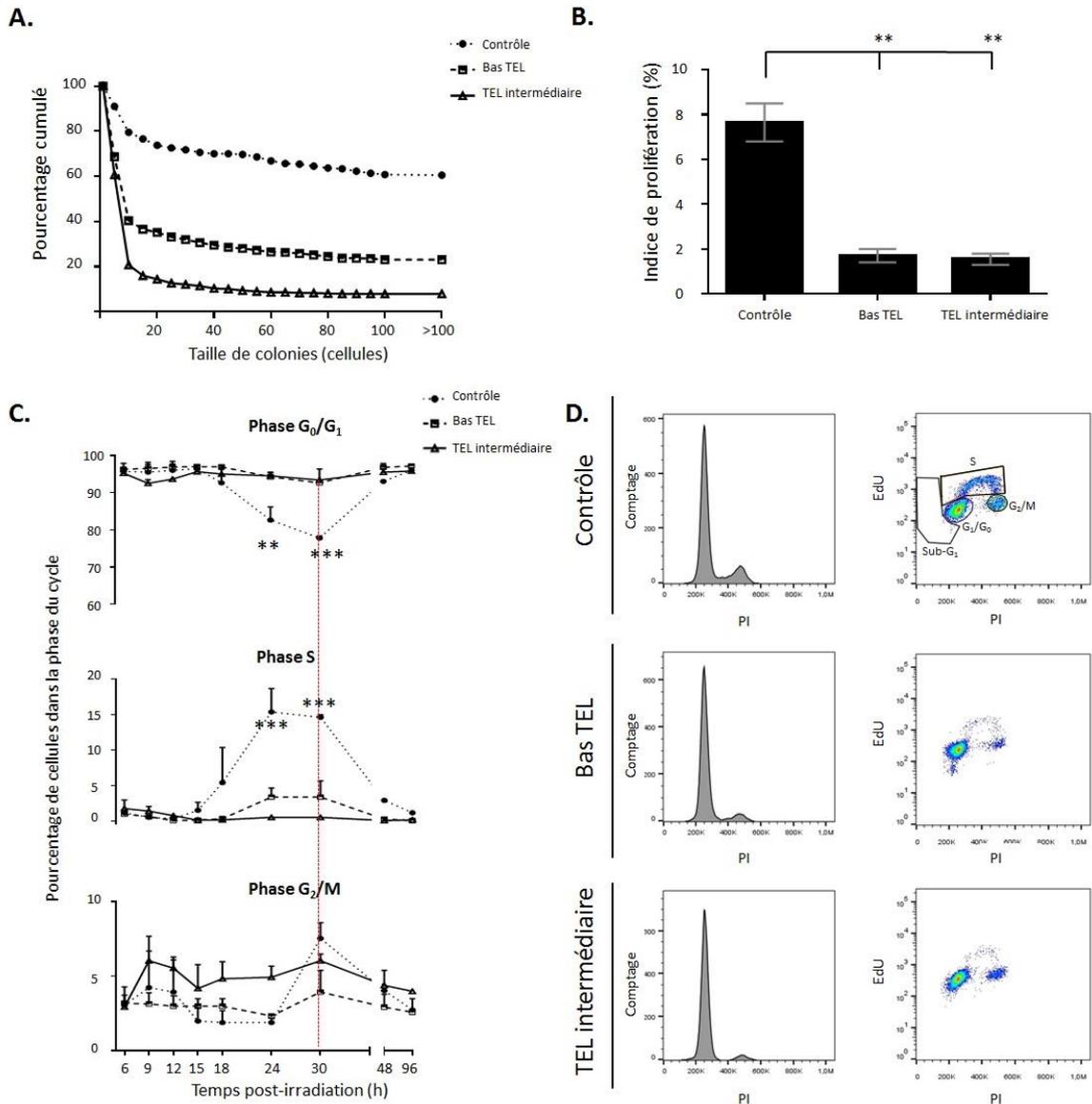


Figure 45: Etude de la prolifération des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Distribution de taille de colonies. Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture à faible densité, pendant 12 jours et sont ensuite fixées et colorées au crystal violet. Le nombre de cellules par colonie est déterminé et ce pour au moins 350 colonies par condition. Les résultats correspondant à deux expériences indépendantes en duplicat ont été regroupés et représentés comme le pourcentage cumulé de colonies composées d'au moins n cellules (n en abscisse) (Saintigny et al., 2002). **B : Indice de prolifération Ki-67.** Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 48h puis hybridées avec l'anticorps anti-Ki67 (immunocytochimie). L'indice de prolifération correspond aux cellules marquées par l'anticorps et est exprimé en moyenne \pm erreur sur la moyenne après avoir compté au minimum 500 cellules/condition (test statistique one-way ANOVA, ** $p < 0,01$). **C : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.** Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 6h à 96h. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux suite à un marquage à l'EdU et l'IP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans la phase du cycle au temps t , après avoir exclu les cellules en sub-G₁ (moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes, test statistique one way ANOVA comparé au temps 6h de chaque condition, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$). **D :** Exemple d'analyse de la distribution cellulaire dans les différentes phases du cycle, 30h après irradiation dans les échantillons contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire.

1.2) Morts cellulaires post-irradiation des CAH en culture 2D :

Les rayonnements ionisants peuvent induire plusieurs types de morts cellulaires en fonction notamment du type de rayonnement, du TEL, de la dose d'irradiation et du type cellulaire concerné (Panganiban et al., 2013). La nécrose radio-induite a été évaluée en culture 2D grâce au test métabolique Toxilight en utilisant un détergent (digitonine) comme contrôle positif de cytotoxicité. En comparaison à la digitonine, nous n'avons pas mesuré de nécrose radio-induite et ce jusqu'à 96h post-irradiation en culture 2D (Figure 46.A). En effet, les signaux mesurés restaient dans la zone de non significativité (grisée). Dans un second temps, nous avons évalué l'apoptose radio-induite par la mesure de la fraction sub-G₁ par cytométrie en flux de 6h à 96h post-irradiation. Nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative de cette fraction et ce jusqu'à 96h après irradiation, indépendamment du TEL (Figure 46.B). L'absence d'apoptose radio-induite a été confirmée par l'analyse par western blot de l'expression de la caspase-3 dans des extraits protéiques de cellules irradiées à différents temps, qui démontre l'absence de clivage de la procaspase-3 et ce jusqu'à 72h post-irradiation (Figure 46.C).

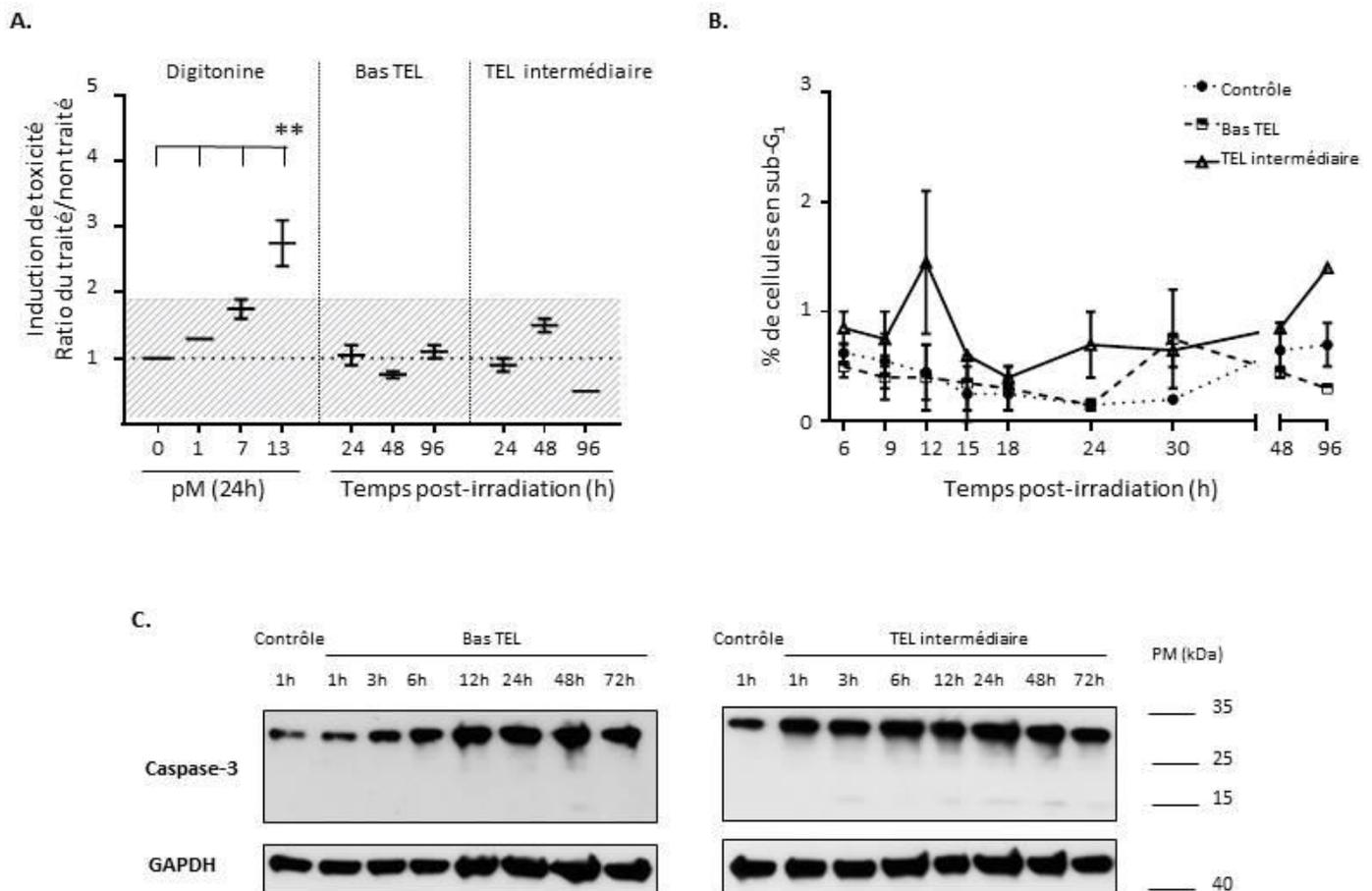


Figure 46: Etude de la mort cellulaire des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Etude de la nécrose par le test métabolique Toxilight™. Le milieu de culture des cellules irradiées à confluence a été récolté 24h, 48h et 96h post-traitement (la digitonine a servi de contrôle positif). La figure montre le ratio de la quantité de luminescence produit par l'échantillon traité (irradié ou lysé par la digitonine) rapporté à la quantité de luminescence de l'échantillon contrôle au même temps de cinétique (moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat). Un test one-way ANOVA réalisé sur le contrôle positif (** p<0,01) a permis de définir une zone de non significativité représentée en gris hachuré. **B : Etude de l'apoptose radio-induite.** Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 6 à 96h. La fraction sub-G₁ a été analysée par cytométrie en flux suite à un marquage à l'EdU et l'IP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en sub-G₁ au temps *t* (moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes, test statistique one way ANOVA comparé au temps 6h de chaque condition). **C : Analyse par western blot de l'expression de la caspase-3.** Les cellules irradiées à confluence sont récoltées entre 6h et 72h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE 4-20%. L'anticorps anti-caspase-3 utilisé pour l'hybridation reconnaît les deux formes de la protéine ; entière à 34 kDa et clivée 17-22 kDa. Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image.

Dans un troisième temps, la sénescence radio-induite a été évaluée par le test SA-β-gal (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Cet essai a été décrit comme un bon indicateur de la sénescence radio-induite dans des chondrocytes articulaires (Hong et al., 2010). Cependant, son interprétation peut être limitée car il n'est pas exclusif aux mécanismes de sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Il est basé sur la catalyse

enzymatique du X-gal ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside par la β -galactosidase (enzyme contenue dans le lysosome) à pH 6. Le produit de cette réaction est bleu ce qui colore le cytoplasme et permet d'établir un score de cellules X-gal positives. Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage de cellules SA- β -gal positives était de $18,5\% \pm 2,9\%$, $32,5\% \pm 4,3\%$ and $57,8\% \pm 0,4\%$ dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire, respectivement (Figure 47.A).

Par ailleurs, les radicaux libres oxygénés induits par les RX (bas TEL) ont été décrits comme un médiateur important de la sénescence cellulaire dans des conditions de culture et d'irradiation normoxique (Hong et al., 2010). Dans nos conditions de culture et d'irradiation physioxiques, nous n'avons pas mesuré d'induction significative du stress oxydatif après irradiation en TEL intermédiaire. De manière surprenante, une induction transitoire (au temps 48h) de stress oxydatif a été observée après une irradiation en bas TEL.

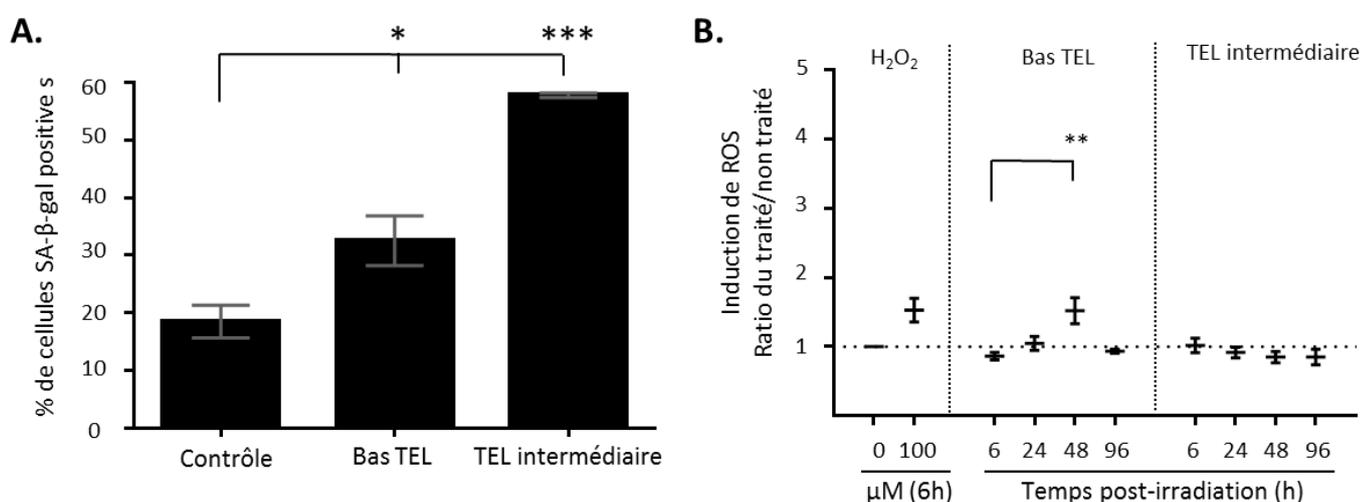


Figure 47: Etude de la sénescence et du stress oxydatif des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Evaluation de la sénescence radio-induite par le test SA- β -gal. Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 96h puis fixées et mises en contact avec le réactif X-gal. Le nombre de cellules positives (bleues) dans chaque échantillon est rapporté au nombre total de cellules comptées (200 cellules/échantillon). Le résultat est exprimé en moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat (test statistique one-way ANOVA, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). **B : Production de radicaux libres oxygénés.** Les cellules irradiées à confluence sont mises en contact de la sonde CM-H2DCFDA pendant 30 min et ce aux temps 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation. Les cellules sont fixées et la fluorescence émise est analysée par cytométrie en flux. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 100 μ M) a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont représentés en ratio de la médiane de fluorescence émise par l'échantillon traité (irradiation ou H₂O₂) relatif au contrôle non traité au même temps de la cinétique (moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat, test statistique one-way ANOVA ** $p < 0,01$).

Ces résultats indiquent que la meilleure efficacité biologique des rayonnements de TEL intermédiaire est due à une plus forte induction de la sénescence cellulaire dans les CAH en culture 2D. Cette induction de la sénescence ne semble pas liée à une plus forte production de radicaux libre oxygénés suite à l'irradiation.

1.3) Prolifération et morts cellulaires post-irradiation en culture 3D :

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré qu'en culture 2D de CAH, les RIs de TEL intermédiaire ont une meilleure efficacité biologique ($EBR=2,6$) que des RXs de bas TEL du fait de la plus forte induction de la sénescence radio-induite. Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel de ces deux types de rayonnements dans un modèle 3D de cartilage articulaire développé précédemment pour de l'ingénierie tissulaire (Legendre et al., 2013).

Afin de valider le modèle, nous avons étudié la distribution cellulaire dans la matrice de collagène. Au bout de 7 jours de culture dans la matrice de collagène, les CAH se distribuent de manière homogène (les flèches sur la Figure 48.A indiquent des cellules de CAH à différents endroits de la matrice). La différenciation cellulaire induite par la culture physioxique en 3D a été validée par l'expression de la protéine COX-2. En effet, COX-2 a été précédemment associée à la différenciation cellulaire via une activation de la voie de signalisation p38/NF- κ B (Ulivi et al., 2008). La Figure 48.B montre une diminution progressive de l'expression de la protéine COX-2 en culture 2D, signe de dé-différenciation. Les chondrocytes cultivés en 3D expriment à nouveau la protéine COX-2 et ce jusqu'à 11 jours après ensemencement, signe de re-différenciation chondrocytaire.

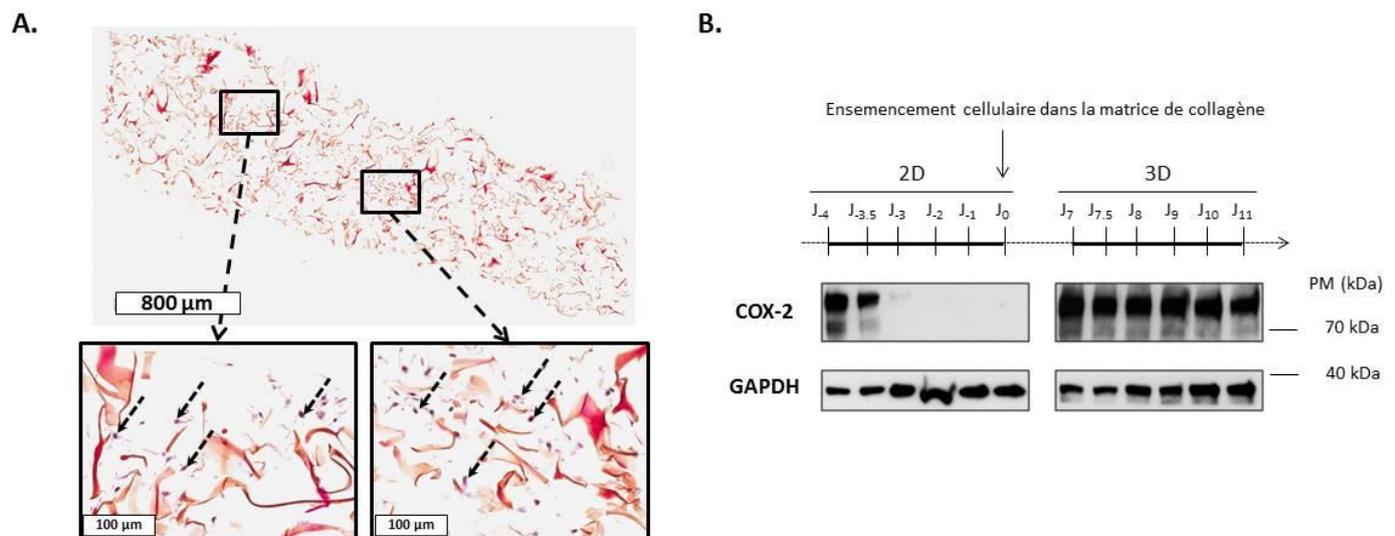


Figure 48: Re-différenciation chondrocytaire dans le M3DCa

A : Haut : image représentative d'une coloration HES effectuée sur une section de 8 µm du M3DCa inclus préalablement dans de la paraffine. Bas : Grossissements correspondants à l'image du haut. Les fibres de collagène sont colorées en rouge pâle et les cellules (indiquées par des flèches) en violet. **B :** Analyse par western blot de la protéine COX-2 pendant l'amplification en monocouche et la culture dans la matrice 3D. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

Les modèles 3D de cartilage ont été irradiés à une dose de 2 Gy en bas TEL ou TEL intermédiaire. Etant donné l'épaisseur de la matrice de collagène, nous avons évalué la distribution de TEL des ions accélérés

correspondant au temps de faisceau alloué au GANIL (décrite plus haut en page 71). En effet, le TEL varie du fait du ralentissement des particules dans la matière. Un modèle possédant une épaisseur non négligeable (contrairement à une monocouche de cellules), peut induire des variations du TEL au cours du trajet des ions rendant l'irradiation inhomogène. Cependant, dans notre cas de figure, quel que soit le logiciel de calcul utilisé (FLUKA ou PHITS) et pour tous les ions de TEL intermédiaire, le TEL ne varie pas de plus de 10% entre l'entrée et la sortie de la matrice de collagène (Figure 49.A/B/C).

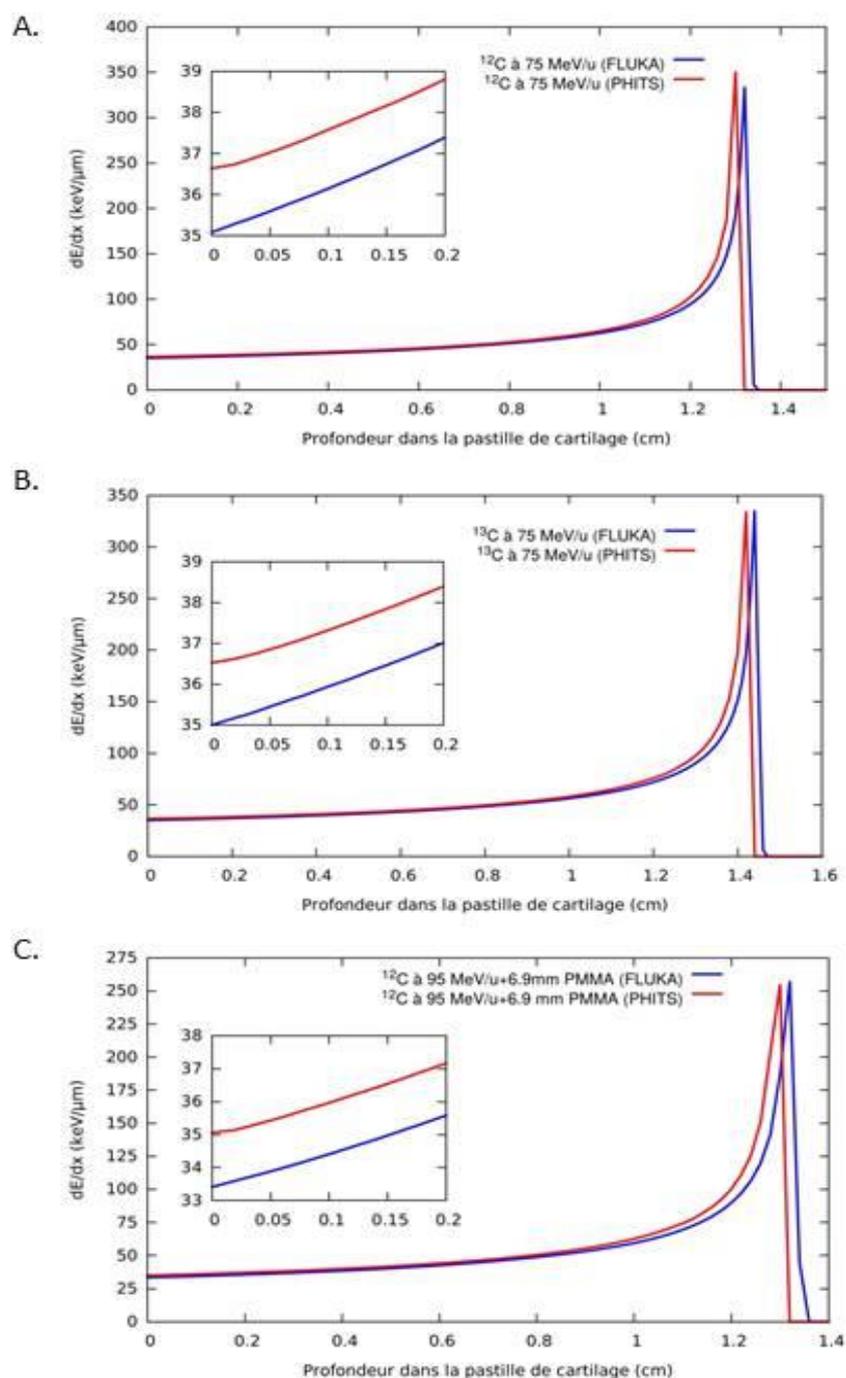


Figure 49: Distribution de TEL dans le M3DCa

Profil de distribution de TEL ($\text{keV}/\mu\text{m}$) des ions carbone dans une épaisseur de cartilage (cm) estimé par deux modèles mathématiques ; FLUKA (courbe bleue) et PHITS (courbe rouge). Le modèle 3D de cartilage utilisé dans nos expériences correspond aux 0,2 premiers centimètres de la courbe (grosissement sur la gauche de la courbe principale). Trois types de faisceaux ont été utilisés en fonction de la disponibilité du temps de faisceau ; le panel A correspond à un faisceau ^{12}C à 75 MeV/A, le panel B à un faisceau ^{13}C à 75 MeV/A et le panel C à un faisceau ^{12}C à 95 MeV/A additionné d'une fine couche de PMMA (6,9 mm).

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas été en mesure d'extraire assez de cellules vivantes de la matrice. Le collagène (I et III) de l'éponge de collagène étant ponté à la glutaraldéhyde, il est possible qu'il soit inattaquable par les enzymes de dissociation comme la trypsine, l'acutase ou encore la collagénase que nous avons testées. Cette contrainte technique a rendu impossible la réalisation de tests de clonogénicité et d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Afin d'évaluer l'impact des RIs sur la prolifération cellulaire, nous avons mesuré l'indice de prolifération Ki-67 sur des coupes en paraffine (Figure 50.A). L'indice de prolifération dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire était de $20,3 \pm 0,9\%$, $22,7\% \pm 4,5\%$ et $23,9\% \pm 0,1\%$, respectivement et ce 96h post-irradiation (Figure 50.B). De façon surprenante, nous n'avons pas mesuré de baisse de l'indice de prolifération après irradiation et ce, quel que soit le TEL, à la différence des résultats obtenus en culture 2D.

L'analyse de la mort cellulaire dans le modèle de cartilage reconstruit *in vitro* n'a montré aucun signe de nécrose ou d'apoptose radio-induite. La nécrose radio-induite a été analysée par le test métabolique Toxilight sur le surnageant de culture cellulaire. A la différence du traitement à la digitonine (contrôle positif), nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative de la libération d'AK et ce jusqu'à 96h post-irradiation quel que soit le TEL (Figure 50.D). De manière intrigante, un ratio d'induction inférieur à 1 a été mesuré suite à l'irradiation en ions carbone ce qui signifie moins de relargage d'AK et un métabolisme réduit par rapport au groupe contrôle. De plus, nous n'avons mesuré de baisse de l'expression de la procaspase-3 ni son clivage et ce jusqu'à 72h post-irradiation (Figure 50.C).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les RXs ainsi que les ions accélérés de TEL intermédiaire n'altèrent pas le pool de cellules quiescentes dans un M3DCa, à la différence de la culture classique en 2D. Ceci peut être expliqué par la physiologie particulière des chondrocytes en culture 3D. Par ailleurs, à la dose unique de 2 Gy, ces rayonnements ne semblent pas induire d'apoptose, ni de nécrose.

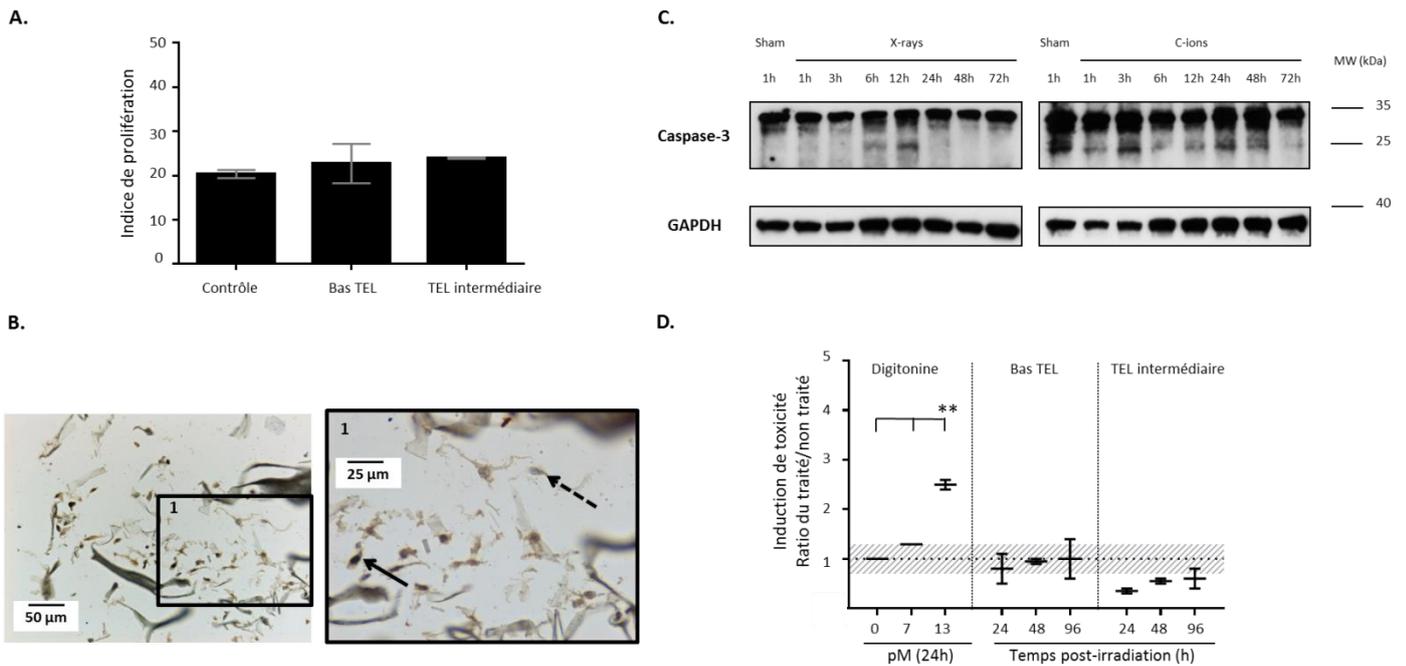


Figure 50: Prolifération et morts cellulaires dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire)

A : Indice de prolifération Ki-67. Les M3DCa ont été irradiés puis remis en culture pendant 96h et fixés au PFA. Le marquage Ki-67 est effectué par immunohistochimie-paraffine sur des coupes de 8 µm. Seuls les noyaux positifs francs sont comptés pour le calcul de l'indice (au moins 250 cellules/condition). Les résultats sont exprimés en moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes (test statistique one-way ANOVA). **B : Image représentative d'un marquage Ki-67** (contre-coloration à l'hématoxyline) effectué sur une section de 8 µm du M3DCa inclus préalablement dans de la paraffine. La flèche en trait continu indique un noyau positif et la flèche en trait discontinu indique un noyau négatif. L'échelle est indiquée sur l'image (25 µm et 50 µm). **C : Analyse par western blot de l'expression de la caspase-3.** Les M3DCa irradiés à confluence sont prélevés entre 6h et 72h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE (-4-20%). Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image. **D : Étude de la nécrose par le test métabolique Toxilight™.** Le milieu de culture des M3DCa irradiés a été récolté 24h, 48h et 96h post-traitement (la digitonine a servi de contrôle positif). Les résultats sont présentés comme le ratio de luminescence produit par l'échantillon traité (irradié ou lysé par la digitonine) relatif à l'échantillon contrôle au même temps de cinétique (moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes). Un test one-way ANOVA réalisé sur le contrôle positif (** p<0,01) a permis de définir une zone de non significativité présentée en gris hachuré dans la figure.

1.4) Sénescence radio-induite en culture 3D :

La sénescence cellulaire est un mécanisme potentiel expliquant l'ostéo-arthrose radio-induite observée en pratique clinique avec des rayonnements médicaux de bas TEL (Saintigny et al., 2015). Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que la sénescence radio-induite est à l'origine de la meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire en culture 2D de CAH. Il nous a semblé nécessaire de vérifier si ce phénomène était reproduit en culture 3D.

Le test SA-β-gal peut être réalisé sur des coupes 3D mais uniquement si le modèle ou le tissu est inclus à froid (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Cependant, malgré plusieurs essais, nous n'avons pas pu réaliser ce type de coupes sur le modèle M3DCa. Comme alternative, nous avons proposé d'analyser trois protéines d'intérêt

COX-2, p21 et H2A.J et ce entre 1h et 96h post-irradiation (bas TEL *versus* TEL intermédiaire). L'ensemble de l'analyse western blot réalisée est présentée en Figure 51 et Figure suppl 2. Dans un premier temps, nous avons assigné un score qualitatif à l'expression de ces protéines (chaque blot est comparé à son contrôle interne non irradié). Nous avons assigné un score positif (+) à l'expression (ou surexpression) de la protéine p21 ou H2A.J (signe d'arrêt de cycle) ou à la baisse d'expression de la protéine COX-2 (signe de perte de différenciation). L'analyse quantitative de ce « scoring » n'a pas permis de ressortir une tendance générale à un temps précis de la cinétique post-irradiation et nous en avons conclu que les effets observés étaient de nature stochastique. Afin d'évaluer un risque relatif de sénescence radio-induite, nous n'avons pas tenu compte du temps post-irradiation et considéré chaque M3DCa comme un modèle indépendant.

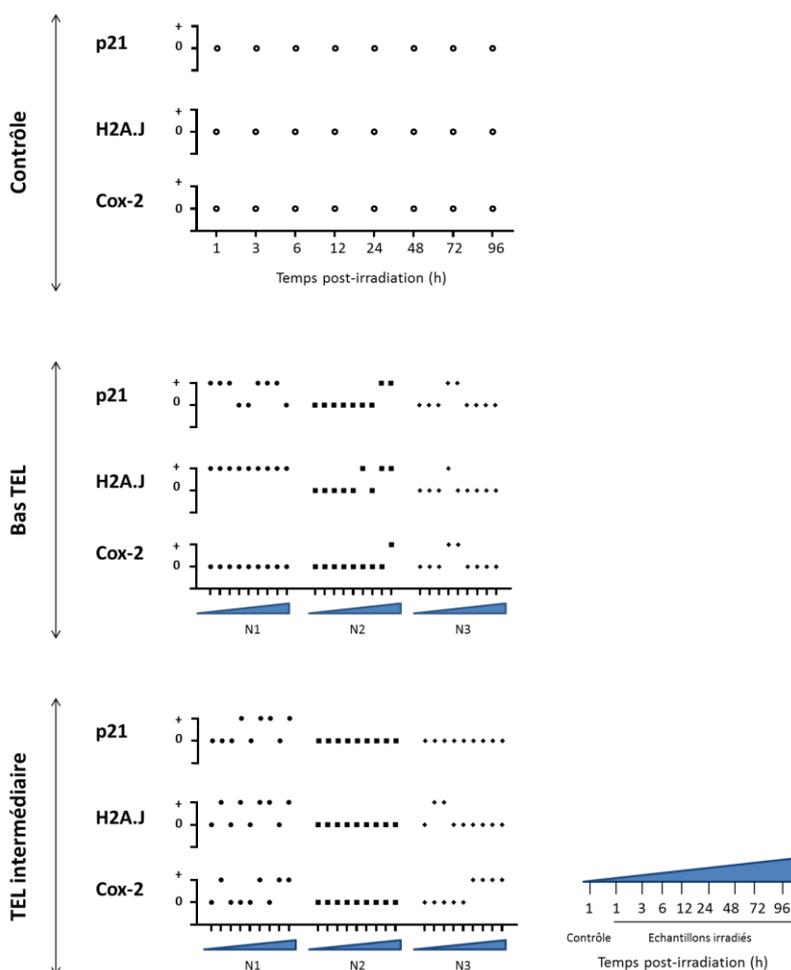


Figure 51: Analyse qualitative de l'expression protéique dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire)

L'ensemble des blots est représenté dans la Figure suppl 2 (voir annexe). L'expression protéique de p21, H2A.J et COX-2 a été analysée sur des échantillons collectés entre 1h et 96h post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire). Un score positif (+) a été attribué lorsque les protéines p21 et H2A.J sont surexprimées ou que l'expression de COX-2 baisse. L'expérience a été répétée 3 fois pour chaque condition (N1, N2, N3).

En ne tenant pas compte de la cinétique post-irradiation, nous avons analysé un nombre total de 14, 24 et 24 échantillons dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire, respectivement. La Figure 52 représente le résultat du scoring décrit plus haut. Chaque échantillon s'est vu attribuer un score ; - correspond à l'absence d'expression de la protéine H2A.J, + correspond à l'expression de la protéine H2A.J dans l'échantillon, ++ correspond à l'expression de la protéine H2A.J associé à l'expression de la protéine p21 ou l'inhibition de l'expression de COX-2 et +++ correspondant à ces trois conditions réunies dans un même échantillon. Si l'on ne retient que la dernière condition (+++), nous pouvons dire que l'irradiation des M3DCa n'induit pas plus de sénescence dans les échantillons irradiés en TEL intermédiaire comparée à l'irradiation en bas TEL (8,3% dans les deux cas).

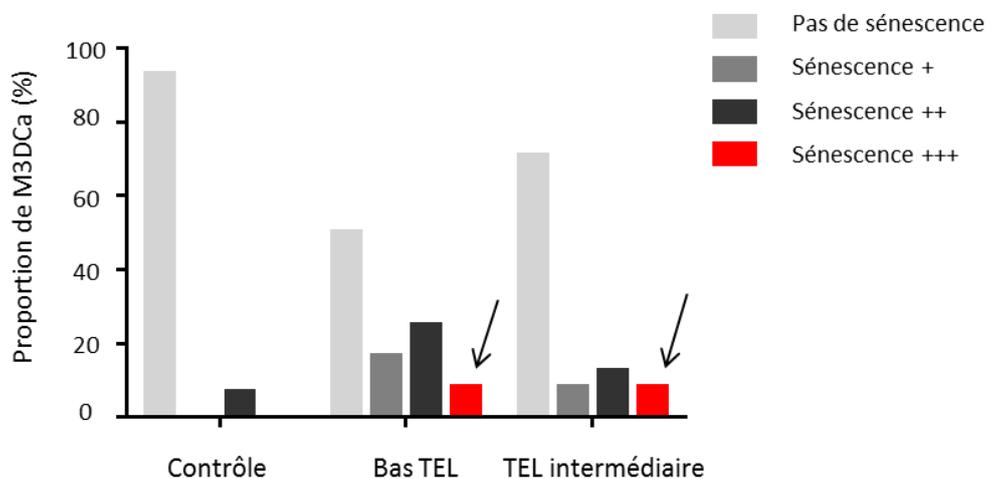


Figure 52: Mesure de la sénescence dans le M3DCa post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire)

Les modèles M3DCa ont été irradiés avec une dose unique de 2 Gy (bas TEL ou TEL intermédiaire) et récoltés entre 1h et 96h post-irradiation. L'analyse par western blot des protéines p21, H2A.J et COX-2 a permis d'établir un système de scoring pour évaluer la sénescence radio-induite à partir de la Figure 51 : « pas de sénescence » correspond aux échantillons H2A.J négatifs. « sénescence + » correspond aux échantillons H2A.J positifs. « sénescence ++ » correspond aux échantillons qui expriment H2A.J en association avec la surexpression de p21 ou la baisse de COX-2. « sénescence +++ » correspond aux échantillons qui expriment H2A.J en association avec la surexpression de p21 et la baisse de COX-2. Les résultats sont représentés en proportion (%) d'échantillons ou de modèles sénescents (+/+/+/+) ou non sénescents en ne tenant pas compte du temps post-traitement.

2) Discussion :

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel des ions carbone de TEL intermédiaire et de RXs de bas TEL dans un modèle 3D de cartilage. La culture monocouche 2D a été utilisée comme contrôle interne.

Très peu d'études ont été publiées sur la survie de CAH après une irradiation en 2D (Saintigny et al., 2015). La valeur D_{10} que nous avons retrouvé après une irradiation en bas TEL (4,1 Gy) est relativement supérieure à

ce qui a été publié précédemment (2,7 Gy) (Moussavi-Harami et al., 2006). Ceci peut être dû à la faible tension d'oxygène dans nos expériences (2%) *versus* normoxie (20%) dans l'étude citée ci-dessus. De plus, la variabilité interindividuelle entre donneurs de radiosensibilité différente peut expliquer ces différences. Aucune étude n'a été publiée sur la survie des chondrocytes après une irradiation en ions carbone. Cependant, l'EBR que nous avons calculée (2,6 pour le second donneur et 2,1 pour le premier donneur) est cohérente avec les EBR précédemment retrouvée dans les expériences effectuées au GANIL pour des ions et des énergies comparables (Ferrandon et al., 2015). Une précédente compilation de données de 855 expériences de clonogénicité (*in vitro*) correspondant à des irradiations en ions et en photons (Friedrich et al., 2013) a fait ressortir que pour un tel approximatif de 30 keV/ μm , l'EBR se situe entre 1 et 2, ce qui semble légèrement inférieur à nos résultats.

L'analyse du cycle cellulaire a montré que les deux types de RIs (bas TEL et TEL intermédiaire) induisent un arrêt de cycle en G_0/G_1 ce qui a été décrit extensivement pour des cellules primaires p53 positives (Little, 1994). Ce résultat est cohérent avec des études précédentes qui ont démontré une baisse dose-dépendante de la synthèse d'ADN après une irradiation aux RXs dans des chondrocytes primaires de lapin (Matsumoto et al., 1994) ou de chondrocytes primaires issus de la plaque de croissance de rats (Margulies et al., 2006). L'analyse de l'indice Ki-67 a également montré une augmentation significative de la fraction de cellules en phase de quiescence (G_0) après une irradiation quel que soit le TEL. L'ensemble de ces résultats indiquent un arrêt prolongé dans les phases G_0 et G_1 suite à l'irradiation mais ne permettent pas d'expliquer la meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire (2D) induisant une survie réduite (clonogénicité, Figure 44) et une augmentation significative des colonies de moins de 10 cellules (distribution de taille de colonies, Figure 45.A).

Il a été démontré qu'un arrêt de cycle prolongé et/ou permanent permettrait d'éliminer les cellules endommagées de la population viable (Linke et al., 1997). Nous nous sommes donc demandé si la plus forte induction d'un type de mort pouvait être à l'origine de la meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire dans les CAH en 2D. Dans nos conditions expérimentales et aux doses utilisées (2 Gy), nous n'avons relevé aucun signe de nécrose ou d'apoptose dans les CAH. Ce résultat est similaire à des études précédentes utilisant des RXs (2 à 10 Gy) dans des chondrocytes articulaires de lapin (Hong et al., 2010) ou des explants humain ou porcins (Willey et al., 2013) de cartilage articulaire ce qui supporte la relative radiorésistance de ces cellules. Les résultats du test SA- β -gal ont montré que les ions carbone de TEL intermédiaire induisent deux fois plus de sénescence que les RIs de bas TEL (Figure 47.A). L'induction de sénescence cellulaire est en concordance avec l'altération de la prolifération radio-induite décrite plus haut (Figure 45) et décrite auparavant (Blagosklonny, 2006). Ceci n'a pas été corrélé à une augmentation du stress oxydatif radio-induit dans nos conditions de culture physioxique. En effet, nous n'avons pas mesuré d'induction significative de la production de radicaux libres oxygénés après irradiation en bas TEL et TEL intermédiaire (mis à part une induction transitoire à 48h en bas TEL).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet différentiel de ces deux rayonnements dans un modèle 3D de cartilage. La meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire observée en culture monocouche 2D n'a pas été reproduite en culture 3D. L'indice de prolifération des chondrocytes dans le modèle 3D (~ 20%) est étrangement supérieur à la valeur retrouvée en culture 2D (7%), étant donné l'état de différenciation des cellules dans le M3DCa. Cependant, cet indice de prolifération en 3D (20%) est proche de la valeur de 13-18% décrite dans une étude précédente faite sur des explants de chondrocytes articulaires d'origine bovine (Tchetina et al., 2007). L'irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) avec une dose de 2 Gy n'a pas modifié cet indice de prolifération ce qui signifie une absence d'accumulation de cellules en phase de quiescence (G_0). Ce résultat en opposition à ce que nous avons observé en culture 2D semble contre-intuitif mais peut être expliqué par état physiologique différent des cellules en culture 2D et 3D comme cela a été décrit précédemment (Sowa et al., 2010).

La chondrosénescence a été décrite comme un arrêt de cycle prolongé associé à de l'hypertrophie et à une perte de différenciation. Afin d'évaluer l'ampleur de ce phénomène après une irradiation du M3DCa, nous avons sélectionné trois protéines d'intérêt ; la protéine p21 responsable du maintien de l'arrêt du cycle cellulaire, l'histone H2A.J récemment décrite comme un potentiel marqueur s'accumulant dans les cellules en sénescence et la protéine COX-2 associée à la différenciation chondrocytaire. Dans un premier temps, nous avons tenté d'analyser l'expression de ces protéines en tenant compte du temps de cinétique mais nous nous sommes rendu compte de l'effet stochastique des RIs sur l'expression de ces protéines en 3D. Ces effets stochastiques n'ont pas été retrouvés dans le modèle 3D de CHS (voir chapitre III des résultats). Dans ces conditions, nous avons noté que les RIs de TEL bas et intermédiaire induisaient une surexpression de p21 et H2A.J associée à une répression de COX-2 dans 8% des modèles. Ces résultats vont dans le sens d'une sénescence radio-induite et ne permettent pas de démontrer un effet différentiel entre RIs de bas TEL et TEL intermédiaire à la différence de la culture monocouche 2D. Les effets biologiques mesurés en culture 2D, telle la meilleure efficacité biologique des ions carbone comparée aux RXs, pourraient être surévalués par rapport aux résultats obtenus en clinique surtout concernant les tissus sains. Cette approche de modèles 3D pourrait servir à remplacer les courbes de survie (2D) dans l'évaluation de l'EBR et de la dose délivrée à la tumeur.

CHAPITRE III : EFFETS DES IONS ACCELERES SUR LES CHONDROSARCOMES

1) Effets des ions carbone (TEL intermédiaire) sur une lignée de chondrosarcome en culture 2D :

Lors des séquences d'accès au faisceau en ions carbone, nous avons eu l'opportunité de tester l'effet différentiel de RIs de TEL intermédiaire par rapport aux RXs (bas TEL) dans une lignée de CHS (SW1353), en culture physioxique 2D. Ces résultats correspondent à du temps de faisceau ^{12}C à 95 MeV/A et ^{13}C à 75 MeV/A (TEL 28 et 33 keV/ μm , respectivement). Quelques résultats préliminaires sont donnés pour des expériences réalisées en haut TEL. Ces données pourraient servir de référence pour d'éventuelles comparaisons en 3D.

1.1) Résultats :

1.1.1) Survie et prolifération de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL vs TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet différentiel des rayonnements de bas TEL et de TEL intermédiaire sur la survie de la lignée SW1353 en culture physioxique 2D. La Figure 53 présente le résultat de ces courbes de clonogénicité et le Tableau 12 les caractéristiques de ces courbes. La valeur α est supérieure après une irradiation en TEL intermédiaire ($0,195 \pm 0,210 \text{ Gy}^{-1}$) en comparaison à l'irradiation en bas TEL ($0,145 \pm 0,036 \text{ Gy}^{-1}$). Les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 extrapolées à partir de ces courbes de survie sont de 6,2 Gy, 3,6 Gy et 64,6% pour les rayonnements de bas TEL et 2,7 Gy, 1,7 Gy et 26,1% pour les rayonnements de TEL intermédiaire, respectivement (Tableau 12). Sans surprise, en culture monocouche 2D, la lignée SW1353 est plus radiosensible aux RIs de TEL intermédiaire en comparaison à des RIs de bas TEL (RX) avec une EBR de 2,3 (D_{10}).

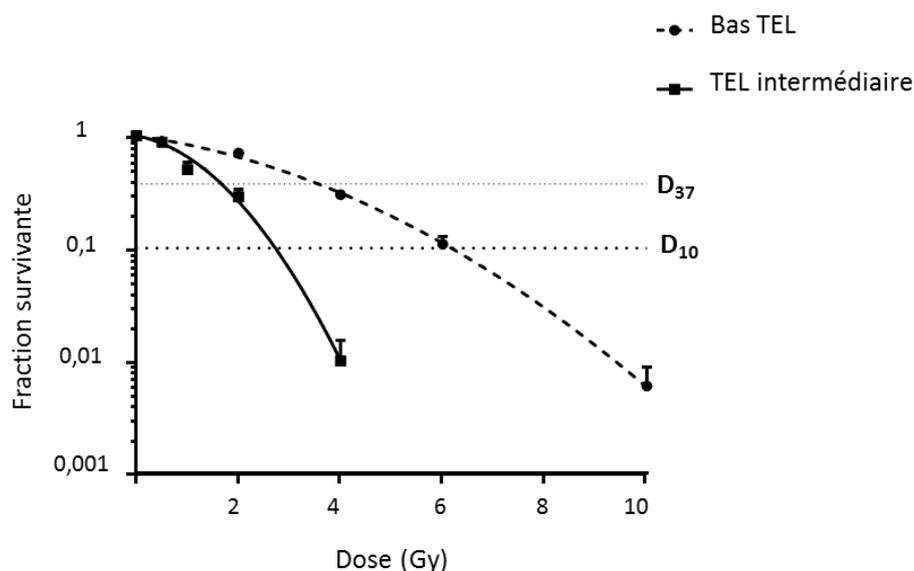


Figure 53: Courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

Les SW1353 ont été irradiés avec les doses indiquées de RI de bas TEL (rond) ou de TEL intermédiaire (carré). Les courbes (trait discontinu pour les RXs de bas TEL et trait continu pour les ions carbone de TEL intermédiaire) représentent les fractions survivantes de SW1353 obtenues selon le modèle linéaire quadratique. Les résultats sont représentés en moyenne \pm erreur type sur la moyenne de six expériences.

SW1353	N	PE (%)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	R^2	D_{10} (Gy)	D_{37} (Gy)	FS_2 (%)	EBR ₁₀	EBR ₃₇
Bas TEL	6	$33,2 \pm 2,0$	$0,145 \pm 0,036$	$0,037 \pm 0,005$	0,900	6,2	3,6	64,6	-	-
TEL intermédiaire	6	$37,7 \pm 1,7$	$0,195 \pm 0,210$	$0,238 \pm 0,057$	0,793	2,7	1,7	26,1	2,3	2,1

Tableau 12: Caractéristiques des courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

La définition de ces paramètres est disponible dans la section « matériels et méthodes » en page 73.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel d'une dose unique de 2 Gy de RIs de TEL intermédiaire en comparaison à la même dose physique de RX (bas TEL) sur la prolifération de la lignée SW1353 en culture physioxique 2D. La Figure 54.A présente les résultats de l'analyse de distribution de colonies réalisée comme décrite dans le chapitre I (page 93). La proportion de colonies formées de plus de 100 cellules était, respectivement, de 35%, 28% et 6% dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire. Ce résultat dénote donc d'une perte, TEL-dépendante, des capacités de prolifération de la lignée SW1353 en culture physioxique 2D.

La prolifération a également été évaluée par l'expression de la protéine Ki-67 (présente durant toutes les phases actives du cycle cellulaire) par la technique d'immunocytochimie. La Figure 54.B présente le résultat de cet index évalué à 48h post-irradiation (dose unique de 2 Gy). L'indice de prolifération était, respectivement, de $87,2\% \pm 1,4\%$, $65,0\% \pm 4,0\%$ et $55,9\% \pm 2,6\%$ dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire. La protéine Ki-67 est absente de la phase G_0 (quiescence) rendant la baisse significative de l'indice Ki-67 suite à l'irradiation comme un signe de l'augmentation du pool de cellules arrêtée en phase G_0 . Cependant, l'effet différentiel du TEL mesuré par l'analyse de la distribution de colonies (Figure 54.A) ne peut être attribué à un recrutement plus important des cellules en phase G_0 (du moins à 48h post-irradiation).

Enfin, nous avons analysé la distribution du cycle cellulaire par cytométrie en flux (marquage simple à l'IP) par une cinétique post-irradiation (de 6h à 48h) en utilisant une dose unique de 2 Gy (Figure 54.C). L'analyse de la phase G_2/M a montré une accumulation progressive, à partir de 6h post-traitement, des cellules dans cette phase et ce pour les deux types de rayonnements. Dans le cas des RX (bas TEL), le blocage en phase G_2/M atteint un pic 9h post-traitement ($23,2\% \pm 1,4\%$ dans le contrôle *versus* $36,9\% \pm 2,3\%$ dans l'échantillon irradié) puis diminue progressivement jusqu'à être levé entièrement à partir de 18h post-traitement ($16,5\% \pm 0,2\%$ dans le contrôle *versus* $16,2\% \pm 1,9\%$ dans l'échantillon irradié). Dans le cas des RIs de TEL intermédiaire, le blocage est significativement plus fort et dure plus longtemps en comparaison aux RX (bas TEL). En effet, le pic est atteint 12h post-irradiation ($21,1\% \pm 1,3\%$ dans le contrôle *versus* $45,2\% \pm 2,7\%$ dans l'échantillon irradié) puis diminue progressivement sans être levé entièrement, jusqu'à 48h post-traitement ($17,0 \pm 2,3\%$ dans le contrôle *versus* $28,6\% \pm 1,4\%$). Cette accumulation en phase G_2/M est accompagnée par une baisse de la fraction cellulaire en phase G_0/G_1 entre 6h et 12h post-traitement, plus marquée avec les RIs de TEL intermédiaire.

Par ailleurs, l'analyse de la phase S montre qu'une baisse (non significative) de la fraction cellulaire en phase de réplication à partir de 15h post-traitement, ce qui suggérerait un potentiel blocage, plus tardif, en phase G_0/G_1 . Afin d'analyser de manière plus fine ce potentiel blocage, nous avons réalisé un marquage supplémentaire à l'EdU, qui est incorporé spécifiquement dans les cellules en réplication active. Le résultat de cette expérience est représenté dans la Figure suppl 3 en annexe de ce document. Dans les échantillons irradiés par des RIs de TEL intermédiaire, nous noterons que la phase S se vide progressivement à partir de 15h post-traitement (absence de signal en début de phase S) ce qui signe un blocage en phase G_0/G_1 . Ce blocage semble être levé à partir de 24h où on note une reprise progressive (mais timide) de la phase S. Ces observations n'ont pas été faites après une irradiation en bas TEL. Ces résultats prouvent qu'il y a un blocage supplémentaire en G_1/S après une irradiation en TEL intermédiaire.

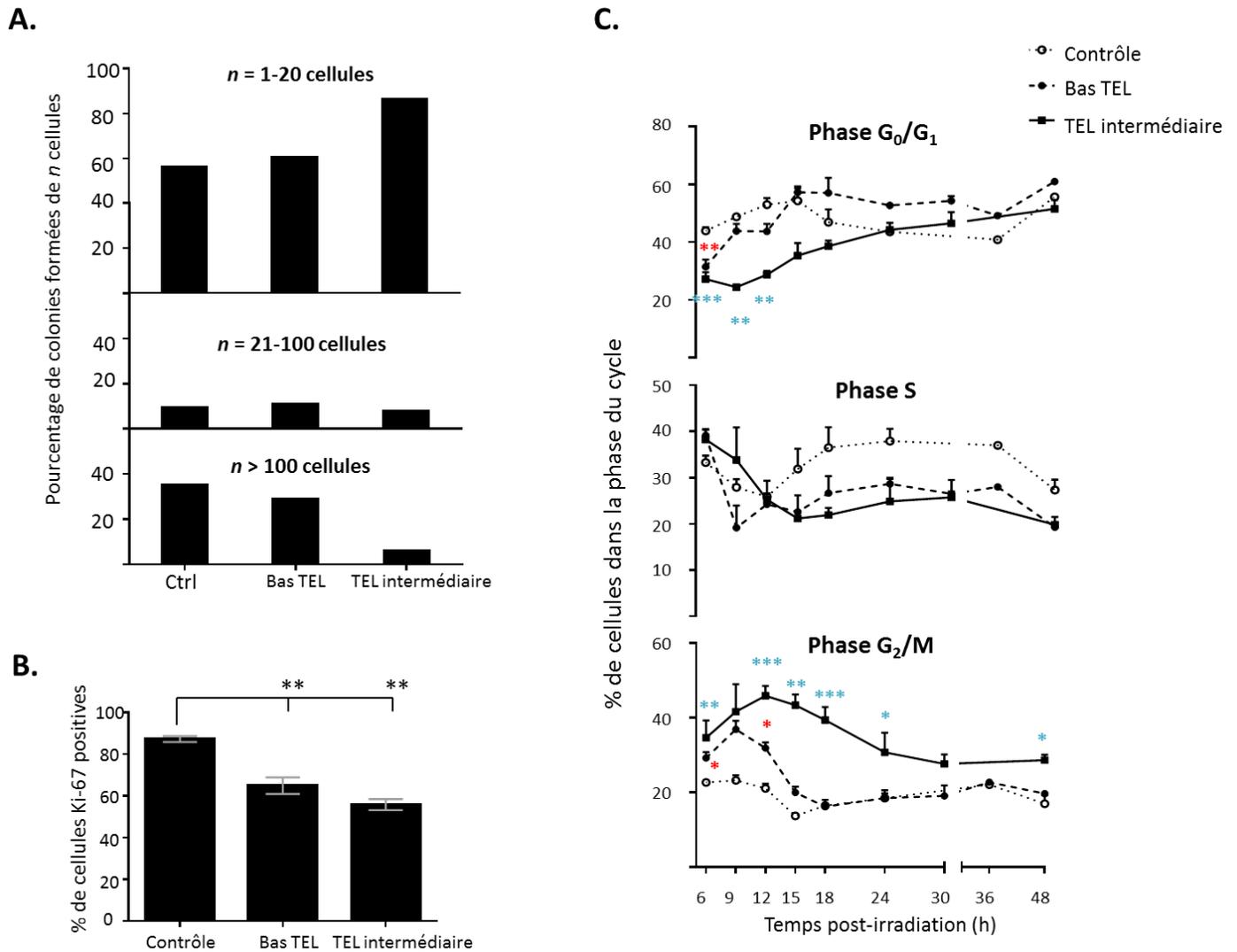


Figure 54: Etude de la prolifération dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Distribution de taille de colonies. Les cellules irradiées sont remises en culture à faible densité, pendant 12 jours et sont ensuite fixées et colorées au crystal violet. Le nombre de cellules par colonie est déterminé et ce pour au moins 350 colonies par condition. Les résultats correspondant à 2 à 6 expériences indépendantes regroupées et représentés comme le pourcentage de colonies composées d'au moins n cellules. **B : Indice de prolifération Ki-67.** Les cellules irradiées sont remises en culture pendant 48h puis hybridées avec l'anticorps anti-Ki67 (immunocytochimie). L'indice de prolifération correspond aux cellules marquées par l'anticorps et est exprimé en moyenne \pm erreur sur la moyenne après avoir compté au minimum 500 cellules/condition (test statistique one-way ANOVA, ** $p < 0,01$). **C : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.** Les cellules irradiées sont remises en culture pendant 6h à 96h. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux suite à un marquage à l'IP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans la phase du cycle au temps t , après avoir exclu les cellules en sub- G_1 (moyenne \pm erreur sur la moyenne de trois expériences indépendantes, test statistique one way ANOVA à chaque point de cinétique (rouge pour le bas TEL et bleu pour le TEL intermédiaire) comparé au contrôle non irradié, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$)

L'ensemble des résultats de la Figure 54 montrent que la meilleure efficacité biologique des RIs de TEL intermédiaire par rapport aux RX (bas TEL) qui se traduit par une EBR_{D10} de 2,3, semble être due, au moins en partie, à une plus forte réduction des capacités de prolifération de la lignée SW1353. Cet effet différentiel

est associé à un blocage plus intense et qui se maintient dans le temps (du moins jusqu'à 48h) dans la phase G₂/M après une irradiation en TEL intermédiaire mais ne peut être attribué à un plus grand recrutement des cellules en phase G₀. Par ailleurs, l'accumulation des dommages de l'ADN plus difficiles à réparer, suite à une irradiation en TEL intermédiaire, semble activer des checkpoints supplémentaires dans la transition G₁/S (marquage EdU, Figure suppl 3).

1.1.2) Analyse par western blot de protéines d'intérêt dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :

Une cinétique post-irradiation d'1h à 96h a été retenue, afin de suivre, par western blot, l'expression de protéines d'intérêt, impliquées dans la réponse cellulaire aux RIs. Nous avons sélectionné la protéine γ -H2AX, la protéine p21 et p-p53 (phosphorylation de la protéine p53 sur la Ser15). La Figure 55.A présente le résultat de cette analyse après une irradiation unique (2 Gy) en RX (bas TEL) et TEL intermédiaire dans la lignée SW1353 en culture physioxique 2D. La Figure 55.B représente la quantification du signal ECL rapporté à la protéine GAPDH. A titre de comparaison, la Figure 56 représente les résultats d'une expérience similaire réalisée en utilisant un RI de haut TEL (¹⁸O dans ce cas-là).

La phosphorylation de la protéine H2AX (γ -H2AX) est induite dès 1h après irradiation puis décroît avec le temps pour revenir au niveau de base 48h post-irradiation dans le cas des RX (bas TEL). Ce niveau reste légèrement supérieur au contrôle (à 96h post-irradiation) avec les RIs de TEL intermédiaire. Cette persistance des dommages est, non seulement, plus marquée avec des RIs de haut TEL (Figure 56) où le niveau de γ -H2AX reste plus élevé qu'après une irradiation avec des RX, mais aussi plus marquée : jusqu'à 96h post-irradiation (en comparaison du contrôle).

La phosphorylation de la protéine p53 (Ser15) n'est pas détectable en western blot jusqu'à 96h post-irradiation dans le cas des RX (bas TEL). Dans le cas des RIs de TEL intermédiaire, cette phosphorylation est induite dès 1h après irradiation puis décroît à partir de 6h post-irradiation pour disparaître à 48h post-irradiation. Il est intéressant de noter qu'en utilisant un RI de haut TEL, la phosphorylation de la protéine p53 (Ser15) est également détectable à 1h post-irradiation (Figure 56). Mais cette phosphorylation est augmentée pour atteindre un pic à 24h post-irradiation pour disparaître pratiquement à 48h post-irradiation.

Enfin, la protéine p21 s'accumule dans les cellules irradiées (à partir de 3h pour les RX et de 1h pour les RIs de TEL intermédiaire) jusqu'à atteindre un maximum à 12h pour les RX et à 24h pour les RIs de TEL intermédiaire puis décroît progressivement jusqu'à un retour au niveau de base à 96h pour les deux types de RIs. Par ailleurs, une irradiation en haut TEL induit une accumulation progressive de la protéine p21 à partir d'1h post-irradiation pour atteindre un pic à 24h post-irradiation et décroître légèrement jusqu'à 96h sans retour définitif au niveau de base (Figure 56).

Les résultats décrits plus haut, bien que préliminaires démontrent clairement une influence du TEL sur la cinétique d'induction des protéines γ -H2AX, p-p53 (Ser15) et p 21 dans la lignée SW1353 en culture physioxique 2D.

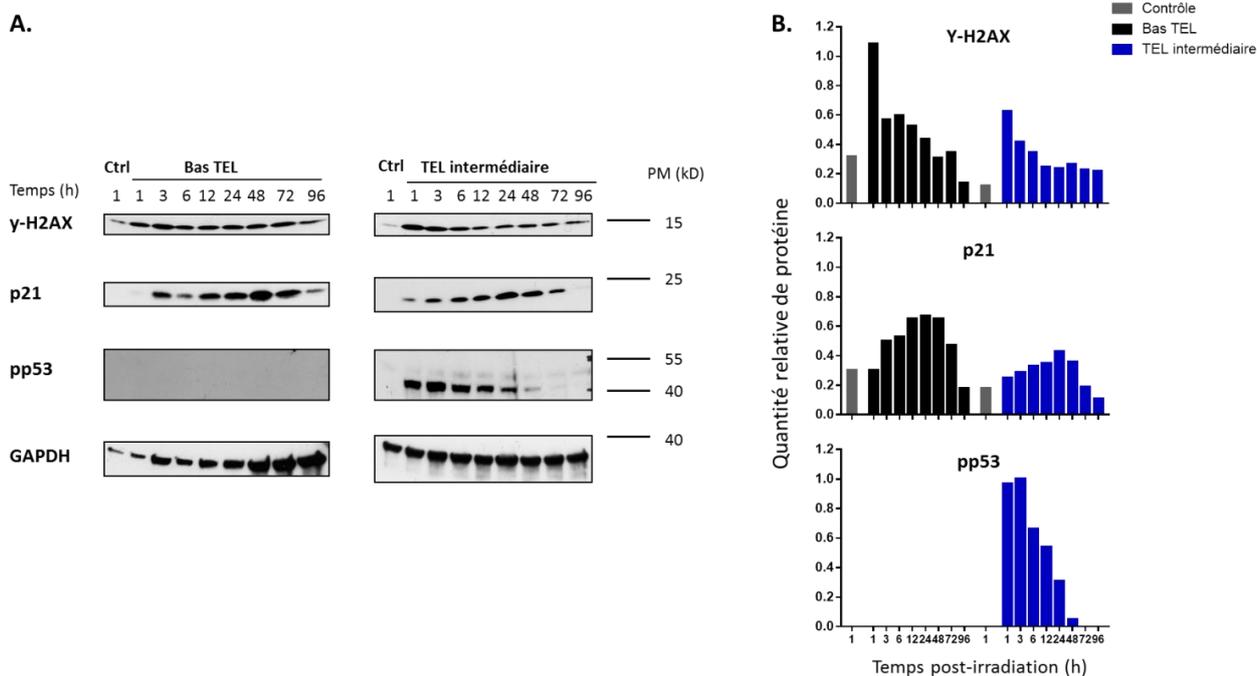


Figure 55: Analyse par western blot des protéines γ -H2AX, p21 et pp53 dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Les cellules irradiées à confluence sont récoltées entre 6h et 96h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE (4-20%). Suite à l'étape de transfert, les membranes sont hybridées avec l'anticorps correspondant. Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image. La figure **B** correspond à la quantification du signal réalisée par le logiciel Image J. Les résultats sont présentés en quantité de protéine relative à la quantité de GAPDH.

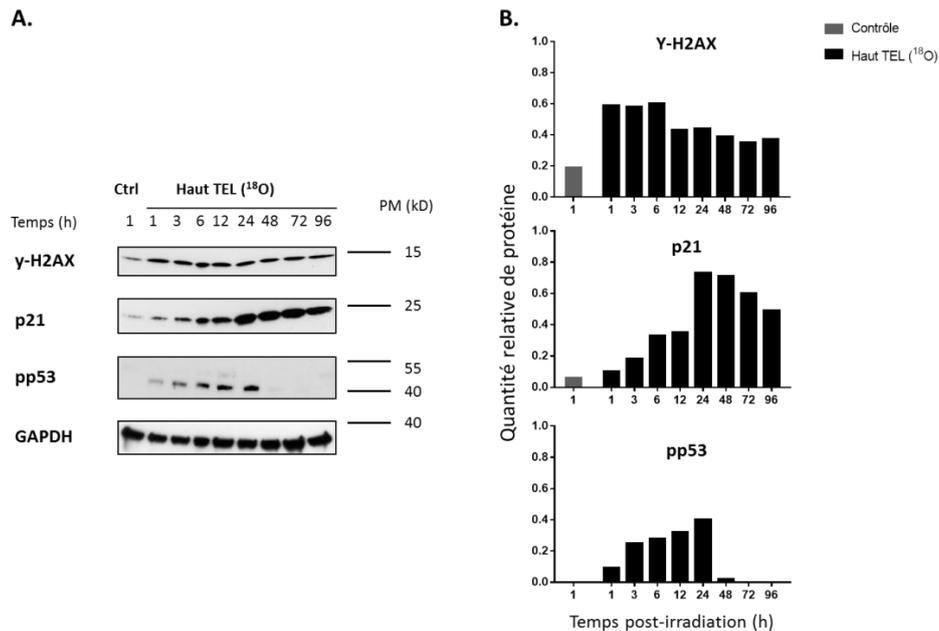


Figure 56: Analyse par western blot des protéines γ-H2AX, p21 et pp53 dans la lignée SW1353 post-irradiation (haut TEL) en culture 2D physioxique

A : Les cellules irradiées à confluence sont récoltées entre 6h et 96h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE 4-20%. Suite à l'étape de transfert, les membranes sont hybridées avec l'anticorps correspondant. Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image. La figure **B** correspond à la quantification du signal réalisée par le logiciel Image J. Les résultats sont présentés en quantité de protéine relative à la quantité de GAPDH.

1.1.3) Induction de stress oxydatif dans lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :

Enfin, l'augmentation des radicaux libres oxygénés (ROS) est impliquée à plusieurs niveaux dans les effets délétères des RIs particulièrement les RX. Cependant, la plupart des études publiées en radiobiologie ont été réalisées en normoxie. Nous avons voulu savoir si, dans des conditions de culture physioxique 2D, une irradiation unique (2 Gy) en bas TEL *versus* haut TEL induisait un effet différentiel sur le niveau de stress oxydatif de la lignée SW1353. La Figure 57 présente le résultat de cette mesure en utilisant la sonde fluorescente CM-H2DCFDA mise en contact des cellules 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation. Les données sont exprimées en ratio de fluorescence (médiane) de l'échantillon irradié sur l'échantillon non irradié, au même point de cinétique.

Pour ce qui est de l'irradiation en RX (bas TEL), cette mesure du stress oxydatif montrait des valeurs, respectivement, de 1.12 ± 0.08 , 0.93 ± 0.22 , 1.16 ± 0.10 et 1.24 ± 0.06 dans les groupes 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation. Le test statistique (One-way ANOVA) s'est révélé négatif et n'a pas montré d'augmentation significative dans le temps de la quantité globale de ROS. Dans le cas de l'irradiation en TEL intermédiaire, ces valeurs étaient, respectivement, de 0.93 ± 0.05 , 1.22 ± 0.19 , 1.35 ± 0.03 et 1.68 ± 0.07 dans les groupes

6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation. Il y a donc une augmentation progressive du niveau de stress oxydatif (significatif à 96h) après une dose unique de 2 Gy en TEL intermédiaire. Par ailleurs, après une irradiation en dose unique de RI de haut TEL, ce ratio d'induction a été évalué à 1.94 ± 0.05 à 96h post-irradiation. Ces résultats montrent donc un effet du TEL dans l'induction du stress oxydatif dans la lignée SW1353 en culture physioxique 2D. Cependant, cette augmentation du stress oxydatif ne semble pas suffisante pour induire la sénescence radio-induite.

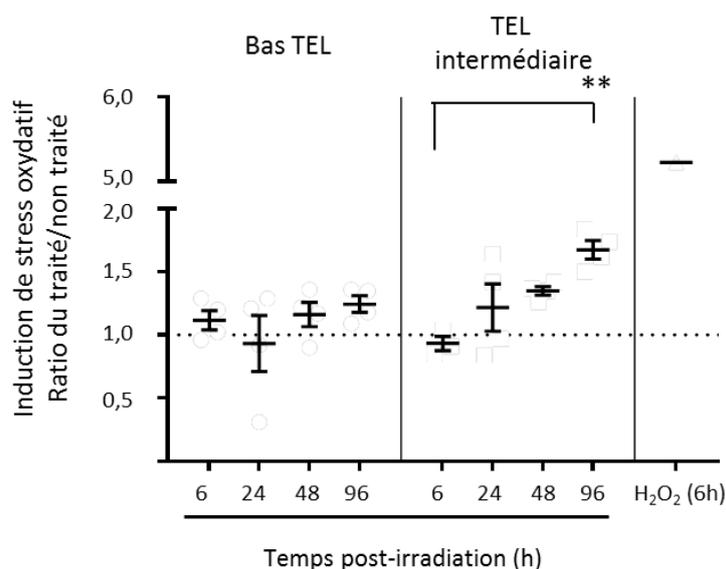


Figure 57: Analyse du stress oxydatif par la sonde CM-H2DCFDA dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL versus TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D

Les cellules irradiées à confluence sont mises en contact de la sonde CM-H2DCFDA pendant 30 min et ce aux temps 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation. Les cellules sont fixées et la fluorescence émise est analysée par cytométrie en flux. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 100 μM) a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont représentés en ratio de la médiane de fluorescence émise par l'échantillon traité (irradiation ou H_2O_2) relatif au contrôle non traité au même temps de la cinétique (moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat, test statistique one-way ANOVA ** $p < 0,01$).

1.1.4) Morts cellulaires dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL vs TEL intermédiaire) en culture physioxique 2D :

Les RIs sont capables d'induire plusieurs types de morts cellulaires en fonction du modèle, du type de rayonnement, de sa dose, entre autres. Suite à l'analyse de la prolifération cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel d'une dose unique (2 Gy) de RX (bas TEL) *versus* TEL intermédiaire sur l'induction de la mort cellulaire dans la lignée SW1353 en culture physioxique 2D.

La Figure 58.A présente le résultat de l'analyse de la nécrose radio-induite par le test Toxilight à 24h, 48h et 96h post-irradiation. La digitonine (détergent) utilisée entre 0 pM et 65 pM (concentration finale) a servi de contrôle positif de cytotoxicité. En comparaison à la digitonine, nous n'avons pas mesuré de nécrose radio-

induite et ce jusqu'à 96h post-irradiation en culture physioxique 2D. En effet le ratio d'induction de nécrose (luminescence émise par l'échantillon traité/l'échantillon non traité) était, respectivement, de 0.8 ± 0.2 , 1.1 ± 0.1 et 1.3 à 24h, 48h et 96h post-irradiation en RX. Ces valeurs étaient, respectivement, de 0.9 ± 0.1 , 0.7 ± 0.1 et 0.9 ± 0.1 à 24h, 48h et 96h post-irradiation en TEL intermédiaire. Ces valeurs avoisinent un ratio de 1 et sont significativement inférieures au contrôle positif (65 pM de digitonine). A titre indicatif, l'irradiation avec un RI de haut TEL (toujours à une dose unique de 2 Gy) n'a pas induit d'augmentation de ce ratio (1,0 à 96h post-irradiation).

La Figure 58.B présente le résultat de l'analyse de la fraction sub-G₁ par cytométrie en flux mesurée dans les échantillons irradiés (cellules et surnagent de culture) entre 6h et 48h post-irradiation. En comparaison à l'échantillon contrôle, nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative de la fraction sub-G₁ et ce jusqu'à 48h post-irradiation (test One-way ANOVA détaillé dans la légende de figure). Ceci signe l'absence d'induction d'apoptose dans la lignée SW1353 avec un RI de bas TEL ou de TEL intermédiaire. A titre indicatif, l'irradiation avec un RI de haut TEL n'a pas induit une augmentation significative de la fraction sub-G₁ (3,7% à 48h post-traitement).

Enfin, la Figure 58.C indique le résultat de la sénescence radio-induite évaluée par le test SA-β-gal comme détaillé dans la section « matériels et méthodes » (page 84). Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage de cellules SA-β-gal positives était de $1,5\% \pm 1,0\%$, $3,2\% \pm 0,2\%$ and $1,3\% \pm 0,6\%$ dans les groupes contrôle, bas TEL et TEL intermédiaire, respectivement. Nous n'avons donc pas mesuré d'augmentation significative de la sénescence cellulaire indépendamment du TEL. L'irradiation avec un RI de haut TEL n'a pas induit une augmentation de cette proportion ($1,4\% \pm 0,7\%$).

L'ensemble de ces résultats indiquent que la meilleure efficacité biologique des rayonnements de TEL intermédiaire en comparaison aux RX (EBR_{D10} 2,3) ne peut pas être attribuée à une plus forte induction de la nécrose, apoptose ou sénescence radio-induites dans la lignée SW1353 en culture physioxique 2D.

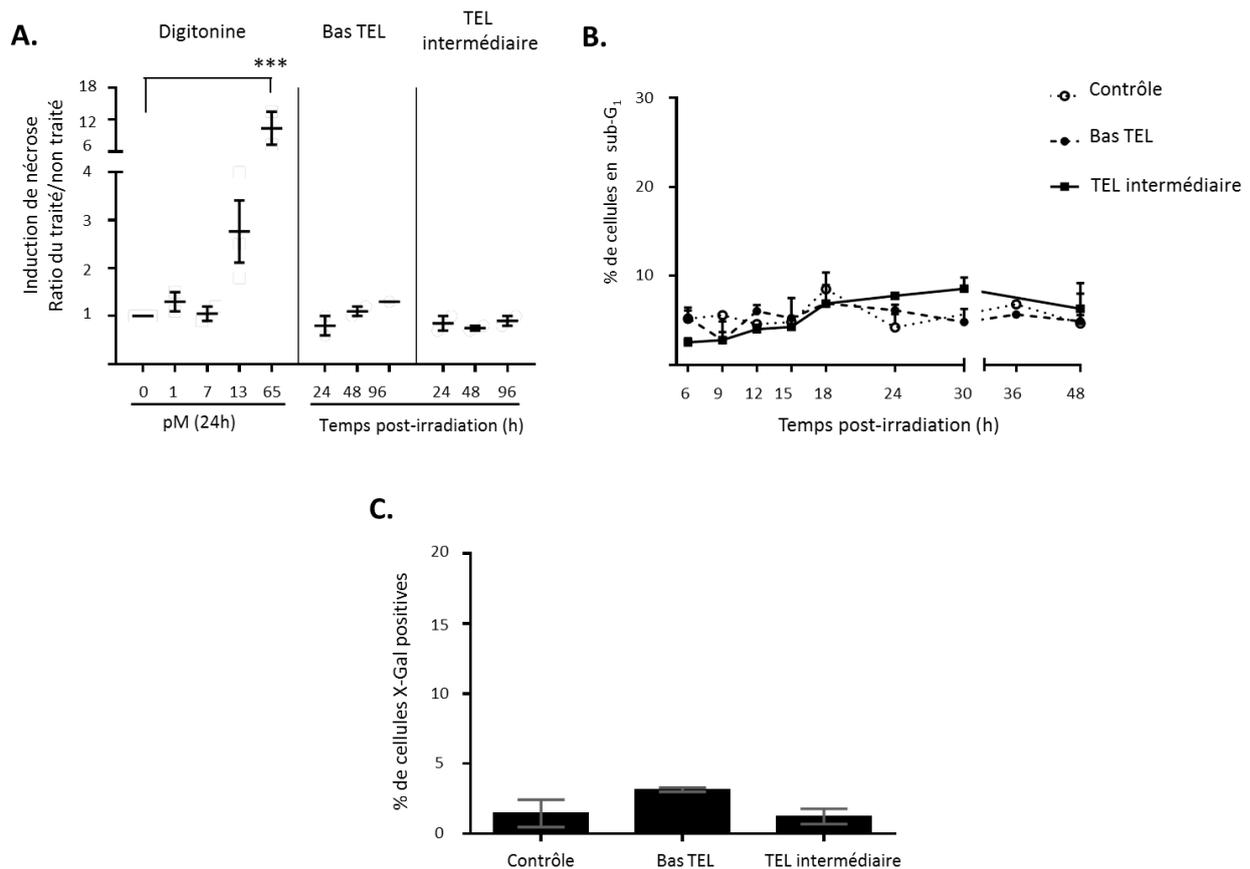


Figure 58: Analyse de la mort cellulaire et de la sénescence dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique

A : Etude de la nécrose par le test métabolique Toxilight™. Le milieu de culture des cellules irradiées à confluence a été récolté 24h, 48h et 96h post-traitement (la digitonine a servi de contrôle positif). Les résultats sont présentés comme le ratio de luminescence produit par l'échantillon traité (irradié ou lysé par la digitonine) relatif à l'échantillon contrôle au même temps de cinétique (moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat). Un test one-way ANOVA a été réalisé sur le contrôle positif (***) $p < 0,001$). **B : Mesure de la fraction sub-G₁ post-irradiation.** Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 6 à 96h. La fraction sub-G₁ a été analysée par cytométrie en flux suite à un marquage à l'IP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en sub-G₁ au temps t (moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux à trois expériences indépendantes, test statistique one way ANOVA à chaque point de cinétique comparé au contrôle non irradié). **C : Evaluation de la sénescence radio-induite par le test SA- β -gal.** Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 96h puis fixées et mises en contact avec le réactif X-gal. Le nombre de cellules positives (bleues) dans chaque échantillon est rapporté au nombre total de cellules comptées (200 cellules/échantillon). Le résultat est exprimé en moyenne \pm erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes (test statistique one-way ANOVA).

1.2) Discussion :

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel des RIs de TEL intermédiaire en comparaison aux RX dans la lignée de CHS la mieux caractérisée, SW1353, en culture physioxique 2D.

Très peu d'études ont été publiées sur la radiobiologie du CHS. Dans nos conditions expérimentales, une dose de 6,2 Gy (RX) a réduit de 90% la survie clonogénique ($D_{10} = 6,2$ Gy). Cette valeur se situe dans l'intervalle

de deux valeurs publiées précédemment (Moussavi-Harami et al., 2006; Wakatsuki et al., 2012). La première publication relate une D_{10} à environ 4,5 Gy mais a été réalisée en culture normoxique et la deuxième publication citée ci-dessus décrit une D_{10} à environ 7,5 réalisée dans des conditions de culture inhabituelles (0% de CO_2). Par ailleurs, aucun article portant sur la survie de la lignée SW1353 après irradiation en ions carbone, n'a été publié. Dans nos conditions expérimentales, nous avons évalué l'EBR de RIs de TEL intermédiaire à 2,3 (Tableau 12), ce qui est légèrement supérieur à une compilation de données (EBR-TEL pour plusieurs particules accélérées) précédemment publiée (Ando and Kase, 2009). Pour une valeur du TEL proche de 30 keV/ μ m, cette compilation de données cite des EBR entre 1 et 2, ce qui est inférieur à nos résultats.

Cette meilleure efficacité biologique des RIs de TEL intermédiaire en comparaison aux RX a été corrélée à une perte des capacités de prolifération (Figure 54.A) et un blocage G_2/M (Figure 54.C) plus intenses. Ce blocage semble se maintenir dans le temps après une irradiation en TEL intermédiaire (jusqu'à 48h post-traitement). En effet, l'exposition au RIs induit l'activation de *checkpoint* qui bloquent spécifiquement ou ralentissent la progression des cellules d'une phase du cycle à une autre, afin de leur permettre de réparer correctement les dommages à l'ADN. Parmi ces checkpoints, les plus connus sont celui de la transition G_1 (à la phase S) et celui de la transition G_2 (à la phase de mitose). Le checkpoint G_1 est activé de manière p53 dépendante. Cependant, plus de la moitié des tumeurs sont p53 mutées ce qui fait que le checkpoint G_2 reste la seule barrière dans les cellules où p53 est mutée ou inexistante (Tubiana et al., 2008). Le fait que ce checkpoint soit plus fortement activé par les RIs de TEL intermédiaire dans la lignée de CHS SW1353 en fait une cible moléculaire intéressante pour augmenter la radiosensibilité des cellules cancéreuses comme cela a récemment été investigué par (Ma et al., 2015) sur des cellules de cancer du poumon non à petites cellules. Par ailleurs, la levée rapide du blocage en G_2/M après une irradiation en RX (dès 18h post-irradiation) peut expliquer le fait que ces cellules de CHS soient relativement résistantes aux RX. En clinique, cela se traduit par une nécessité d'escalade de dose (plus de 65 Gy) afin de venir à bout d'une tumeur de CHS. Des doses plus faibles d'ions carbone permettent d'arriver au même effet biologique. De plus, les ions carbone de TEL intermédiaire semblent activer un checkpoint supplémentaire en G_1 (souvent décrit pour des cellules primaires p53 positives) qui n'est pas mesurable après irradiation en RX.

Le stress oxydatif radio-induit est également un mécanisme important pouvant aggraver les effets délétères des RIs qui causent des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules (ADN, protéines), quand les défenses anti-oxydantes sont dépassées. Très peu d'études se sont intéressées au stress oxydatif induit après une irradiation en ions carbone, encore moins en culture physioxique (2% d' O_2). Laurent et associés ont récemment décrit une augmentation significative du stress oxydatif dans des fibroblastes humains après irradiation en ions carbone (TEL intermédiaire) en comparaison à l'irradiation en bas TEL (RX) (Laurent et al., 2013). Cependant, ces expériences ont été réalisées en normoxie (20% d' O_2). Dans nos conditions expérimentales en physioxie, nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative du stress oxydatif après irradiation en RX, potentiellement due à la faible tension d'oxygène de culture. Cette observation se traduit en

clinique par la relative radiorésistance conférée par l'hypoxie aux CHSs. Après une irradiation en TEL intermédiaire, il semblerait qu'un stress oxydatif significativement supérieur au contrôle s'installe à 96h post-irradiation, ce qui est concordant avec (Laurent et al., 2013). Cependant, le fold d'induction reste relativement faible (autour de 1,5 à 96h post-irradiation) et peut être expliqué par les dommages localisés qu'induisent les ions accélérés et qui empêchent les radicaux libres oxygénés de se recombinaison et aggraver les dommages oxydatifs.

Il a été démontré qu'un arrêt de cycle prolongé et/ou permanent permettrait d'éliminer les cellules endommagées de la population viable (Linke et al., 1997). Dans nos conditions expérimentales et aux doses utilisées (2 Gy), nous n'avons pas relevé de signe de nécrose, apoptose ou sénescence radio-induites quel que soit le TEL (Figure 58). La lignée de CHS SW1353 a précédemment été décrite comme résistante à l'apoptose par la surexpression de gènes anti-apoptotiques (Kim et al., 2007) ainsi que la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs tels p53 (V203L) et p16 (délétion) (van Oosterwijk et al., 2012). De plus, la sénescence cellulaire est rarement associée à des lignées tumorales immortalisées. La catastrophe mitotique radio-induite a précédemment été suggérée dans cette même lignée (Moussavi-Harami et al., 2006). De plus, Amornwichet et associés ont démontré que l'induction de catastrophe mitotique mesurée en microscopie dans des cellules p53 déficientes et résistantes à l'apoptose, était responsable de la meilleure efficacité biologique des ions carbone en comparaison aux RX (Amornwichet et al., 2014). Cette piste de catastrophe mitotique nous semble d'autant plus intéressante à explorer et approfondir car, comme on le voit dans la Figure 59, nous avons mesuré une augmentation TEL-dépendante et dans le temps de la taille et de la granulosité des cellules SW1353 en culture physioxique 2D.

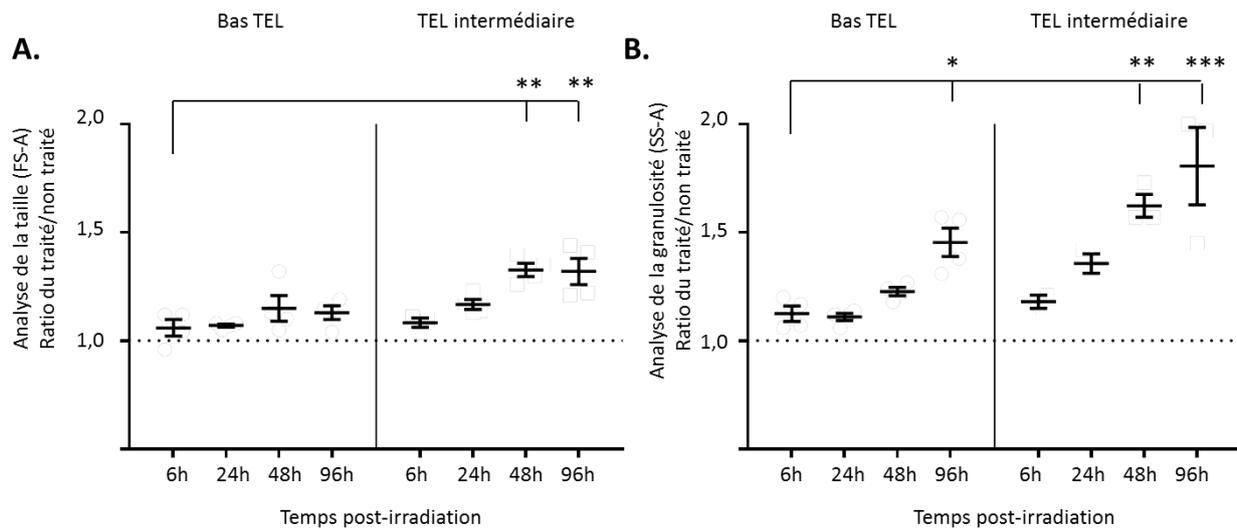


Figure 59: Analyse de la taille et de la granulosité dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physiologique

Les cellules irradiées à confluence sont mises en culture puis fixées au PFA aux temps 6h, 24h, 48h et 96h post-irradiation et analysées par cytométrie en flux. Les données de taille (**A** : FS-A) et granulosité (**B** : SS-A) ont été extraites. Les résultats sont représentés en ratio de la médiane du signal dans l'échantillon traité (irradiation ou H₂O₂) relatif au contrôle non traité au même temps de la cinétique (moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences indépendantes en duplicat, test statistique one-way ANOVA comparé 6h en bas TEL, * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001).

Enfin, l'analyse par western blot de protéines impliquées dans la réparation des CDBs de l'ADN et de la régulation du cycle cellulaire a permis de mettre en avant un effet différentiel du TEL sur la réponse cellulaire de la lignée SW1353. Cependant, ces effets étaient plus significatifs en utilisant un RI de haut TEL (¹⁸O dans cas précis). L'ensemble de ces expériences complétées par des irradiations en haut TEL (70-80 keV/μm) pourraient servir de base de comparaison à un modèle 3D afin de proposer de nouvelles méthodes d'évaluation de l'EBR.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous proposons de développer la mise au point et l'étude de faisabilité d'un modèle 3D de CHS pour des études d'hadronbiologie.

2) Mise au point d'un modèle 3D de chondrosarcome appliqué à des études d'hadronbiologie :

Les résultats de ce chapitre correspondent à une publication parue dans BMC Cancer en Aout 2015 ([BMC Cancer. 2015 Aug 8;15:579. doi: 10.1186/s12885-015-1590-5](#)). Une copie du manuscrit final se trouve à la fin de ce document.

Malgré les résultats encourageants dans le traitement des CHSs par hadronthérapie, il existe très peu d'études de radiobiologie sur les CHSs. Par ailleurs, jusqu'à ce jour, les modèles animaux de CHS consistent en la xéno greffe sous-cutanée de cellules tumorales de CHS provenant de lignées cellulaires ou de tissus humains (Clark et al., 2009). Trois modèles orthotopiques de souris ont été récemment publiés (Clark et al., 2010; Monderer et al., 2013; van Oosterwijk et al., 2012) utilisant des lignées humaines de CHS mais aucun modèle de souris transgénique n'existe pour cette pathologie. Etant donné l'absence de modèle de référence *in vivo* de ce type de sarcome, nous avons développé un nouveau modèle 3D de CHS pour des études d'hadronbiologie. Des cultures 3D de CHS ont été réalisées précédemment pour des applications de pharmacologie mais les propriétés chondrogéniques du collagène de type I/III (Freyria et al., 2009) et la culture physioxique n'ont pas été pris en compte comme précédemment réalisé pour du cartilage (Demoor et al., 2014; Legendre et al., 2013).

En utilisant la lignée de CHS de grade II la mieux caractérisée (SW1353), un milieu de culture standardisé, un facteur chondrogénique (BMP-2), une faible tension d'oxygène (2%) ainsi qu'une matrice de collagène (Claus et al., 2012), nous avons développé le premier modèle 3D appliqué à des études d'hadronbiologie. Pour ce faire, nous avons sélectionné un faisceau de ^{18}O comme RI de haut TEL afin de mimer le TEL au niveau du pic de Bragg lors d'une hadronthérapie par ions carbone (Ando and Kase, 2009). A titre de comparaison, nous avons utilisé des RX comme rayonnement de bas TEL. En collaboration avec J-E. Groetz (Université de Besançon), nous avons évalué la distribution de dose dans toute l'épaisseur de l'éponge. La toxicité radio-induite a été évaluée dans le M3DC ainsi que la clonogénicité en culture 2D. L'indice de prolifération Ki-67 et la cinétique de réparation $\gamma\text{-H2AX}$ ont été réalisés afin de démontrer la faisabilité et l'utilité de ce modèle en hadronbiologie et l'impact de la qualité des RIs sur la prolifération et la réparation des CDBs de l'ADN.

En utilisant la même dose de 2 Gy, nous avons été capables de démontrer l'utilité de ce type de modèles dans l'étude de l'impact de la qualité du rayonnement sur quelques critères d'évaluation biologique. Aucun signe de nécrose n'a été observé et ce quel que soit le type de rayonnement. Jusqu'à quatre jours après irradiation, les cellules contenues dans la matrice semblaient maintenir une capacité de prolifération. Cependant, une induction plus forte et plus longue de la protéine $\gamma\text{-H2AX}$ a été mesurée, par western blot, après irradiation en haut TEL. Ce dernier point nous a permis de suggérer une nouvelle manière de calculer l'efficacité biologique d'un rayonnement par rapport aux RX.

2.1) Caractérisation cellulaire du modèle :

L'usage thérapeutique des hadrons s'est focalisée principalement sur des CHSs de bas grade ou de grade intermédiaire (Tsuji and Kamada, 2012). Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le grade intermédiaire (II) car il présente une relative radiorésistance aux photons, un potentiel métastatique et un pourcentage élevé de récurrence mais maintient un phénotype cartilagineux (Kim et al., 2007). Les lignées SW1353, JJ012 et CH3573 sont actuellement les cellules issues de CHS de grade II les mieux caractérisées (van Oosterwijk et al., 2012). Parmi ces lignées, les SW1353 sont les plus utilisées et considérées comme le gold standard. En effet, une recherche sur le site Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>) a permis d'extraire 170 articles contenant le mot [SW1353 OR HTB-94], 48 articles contenant [JJ012] et un article pour [CH3573] (fin novembre 2015).

Les cellules SW1353 ont été adaptées à partir du milieu DMEM vers notre milieu standardisé puis amplifiées en normoxie comme détaillé dans la section « matériels et méthodes » (page 59). Cependant, la culture 3D ainsi que toutes les irradiations (2D et 3D) ont été réalisées en physioxie (2% d'O₂).

Les M3DC ont été préparés en ensemençant 4×10^5 cellules/matrice de collagène suivi de 7 jours de culture physioxique comme décrit dans le présent manuscrit (page 60). Après 7 jours de culture, nous avons procédé à un rinçage au PBS qui a permis de récupérer $1,5 \times 10^5$ cellules qui ne sont pas attachées à la matrice. La distribution des cellules qui ont réussi à s'attacher a été réalisée après inclusion du modèle dans de la paraffine. La Figure 60 est une image représentative d'une coloration HES effectuée sur une coupe transversale du bloc de paraffine. Les trois grossissements (bas de la figure) montrent une distribution cellulaire homogène dans la partie proximale (bas, gauche), interne (bas, milieu) et distale (bas, droite) de la matrice. Cette distribution est comparable à la distribution observée dans un modèle 3D de cartilage arthrosique en utilisant une technique de microscopie électronique à balayage (Legendre et al., 2013) ou de la microscopie optique (Claus et al., 2012). Les coupes histologiques de CHSs de grade II montrent une faible cellularité (Gelderblom et al., 2008). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous avons réussi à obtenir un M3DC mimant une cellularité de grade intermédiaire de CHS.

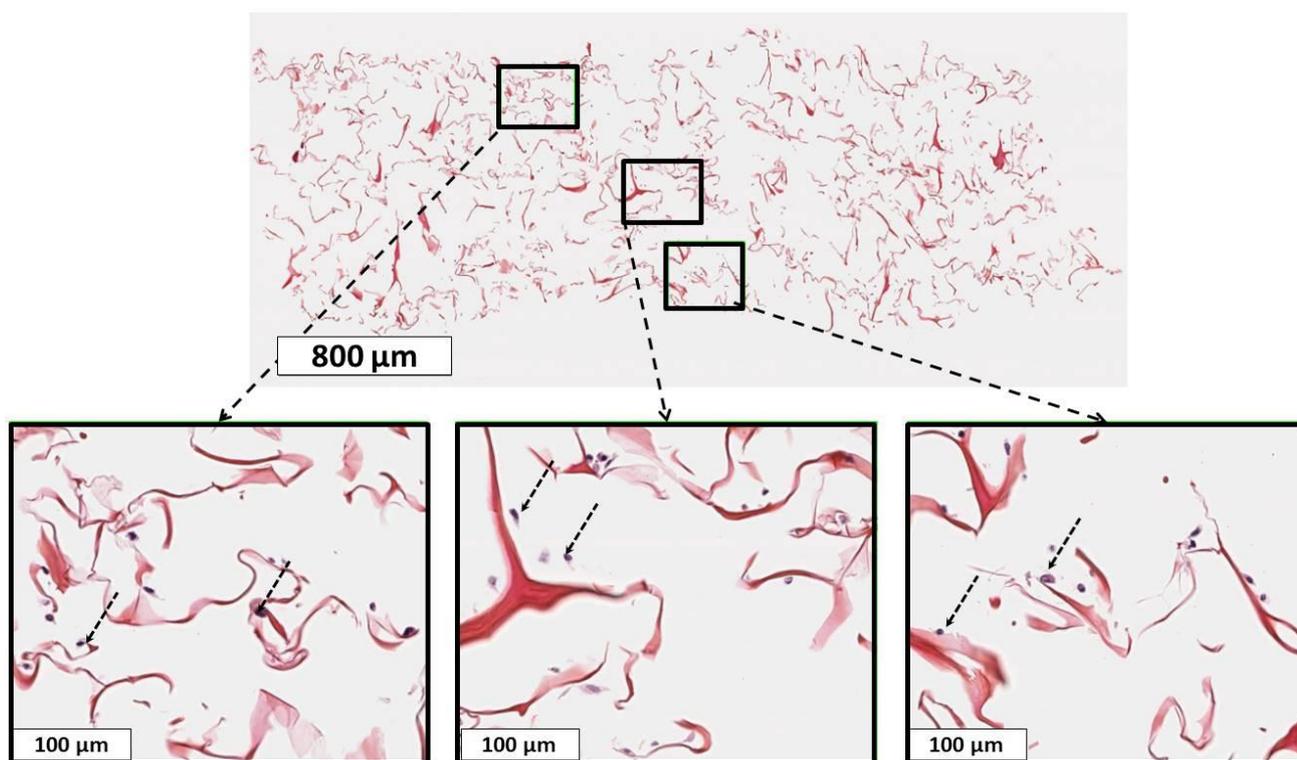


Figure 60: Distribution cellulaire de la lignée SW1353 dans le M3DC

Haut : image représentative d'une coloration HES effectuée sur une section de 8 μm du M3DC inclus préalablement dans de la paraffine. Bas : Grossissements correspondants à l'image du haut. Les fibres de collagène sont colorées en rouge et les cellules (indiquées par des flèches) en violet.

Afin d'évaluer le ratio de prolifération des SW1353 dans le M3DC, nous avons mesuré l'indice Ki-67 après inclusion du modèle dans la paraffine. L'indice de prolifération Ki-67 a été décrit comme potentiel marqueur de grade tumoral et un facteur pronostic pour des patients atteints de CHS de grade II (Nawa et al., 1996). Cet indice a également été utilisé afin de tester plusieurs drogues dans un modèle orthotopique de rat de CHS (Perez et al., 2012). Le comptage a été réalisé par un seul expérimentateur. Afin d'évaluer la variabilité intra-individuelle de comptage, la même lame a été comptée à des temps différents. Le Tableau 13 représente le résultat de ce comptage.

Comptage	Indice Ki-67 (%)	Déviati on standard (%)
Jour 1	28,3	
Jour 2	33,1	2,4
Jour 3	30,8	

Tableau 13: Evaluation de la variabilité intra-individuelle de comptage de l'index Ki-67

Après 7 jours de culture physioxique dans la matrice de collagène, l'indice de prolifération des SW1353 était de $33\% \pm 4\%$ (Tableau 16). Cette valeur semble légèrement supérieure à la valeur moyenne décrite dans une étude rétrospective sur des biopsies humaines de CHSs ($14,7\% \pm 4,4\%$ pour un grade II), bien qu'un intervalle étendu ait été décrit (de 1,1% à 50,2%) (Nawa et al., 1996). Cette divergence entre tissus humains et notre modèle peut être expliquée par la lignée cellulaire utilisée mais aussi au fond génétique inconnu des patients prélevés et/ou différentes techniques d'IHC utilisées. Par ailleurs, l'indice de prolifération obtenu dans notre modèle 3D de cartilage articulaire était deux fois inférieur à celui retrouvé dans ce modèle de CHS ($17,5\% \pm 4,5\%$ pour la moyenne des donneurs). Cette différence entre cellules primaires et lignée tumorale est en adéquation avec la physiologie du cartilage humain.

2.2) Irradiations et distribution du TEL dans le modèle :

Les cultures cellulaires 2D et 3D ont été irradiées en bas TEL (RX) dans une position horizontale et en haut TEL (^{18}O) en position verticale comme décrit pages 63 et 68. Dans les deux cas de figure, cela a été réalisé en physioxie à 2% d' O_2 . Ces deux rayonnements ont été utilisés afin de mimer une fraction canonique de RT conventionnelle (bas TEL) *versus* une fraction d'hadronthérapie en ions carbone (haut TEL).

Concernant l'irradiation en ions lourds, compte tenu de l'épaisseur de la matrice de collagène ainsi que la courbure imposée par le tube de polypropylène, la distribution de TEL a été évaluée à l'aide de codes de calcul comme décrit page 71. Le résultat de ces simulations est détaillé dans le Tableau 14. En utilisant le logiciel FLUKA, le TEL calculé en zones proximales et distales était de $85,91 \pm 0,38$ et $109,82 \pm 0,57$, respectivement. Les résultats donnés par PHITS étaient de $96,27 \pm 0,32$ et $122,97 \pm 0,67$ keV/ μm , respectivement. Ces données révèlent une différence de ~17% entre les deux zones quelle que soit la méthode de calcul. Cette variabilité n'est pas surprenante étant donnée l'épaisseur de la matrice de collagène (2 mm). De plus, le TEL moyen à l'intérieur de la matrice était de $99,87 \pm 0,21$ keV/ μm (intervalle de 85-120 keV/ μm) en utilisant FLUKA, et $107,24 \pm 0,11$ keV/ μm (intervalle de 95-135 keV/ μm) en utilisant PHITS.

Code de calcul	TEL (keV/ μm)		
	Zone proximale	Zone interne	Zone distale
FLUKA	$85,91 \pm 0,38$	$99,87 \pm 0,21$	$109,82 \pm 0,57$
PHITS	$96,27 \pm 0,32$	$107,24 \pm 0,11$	$122,97 \pm 0,67$

Tableau 14: Distribution de TEL des ions ^{18}O (50 MeV/A) dans le M3DC

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur standard

Enfin, le profil de distribution de TEL illustré dans la Figure 61 est lié à la courbure imposée par le tube de polypropylène et le cylindre de verre qui sert à maintenir le modèle en position horizontale fixe (Figure 21). Cette courbure a induit une variation dans l'épaisseur du modèle traversée par les ions incidents. Cette distribution n'a pas été observée en considérant une géométrie dite plate. Ces résultats, bien que différents d'une méthode de calcul à une autre, démontrent l'homogénéité d'irradiation des cellules par les ions oxygène ^{18}O (50 MeV/A) dans notre modèle et dans notre configuration d'irradiation.

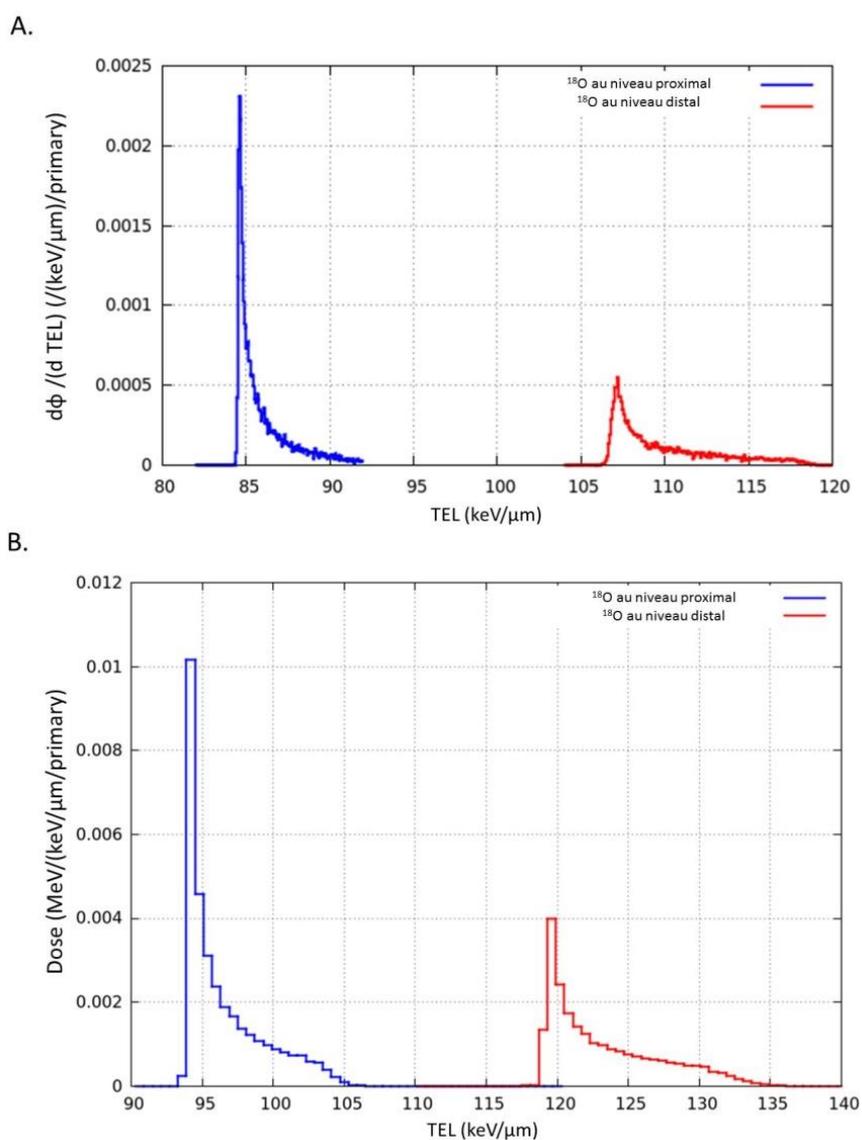


Figure 61: Distribution de TEL dans la partie proximale et distale du M3DC

L'ensemble des éléments de la ligne IRABAT ainsi que la géométrie d'irradiation (tube en polypropylène et cylindre en verre) ont été pris en compte dans la simulation utilisant les logiciels FLUKA (A) ou PHITS (B). Les résultats sont exprimés en valeurs les plus probables du TEL dans la partie proximale et distale de l'éponge de collagène.

2.3) Survie et prolifération post-irradiation :

Dans un premier temps, nous avons évalué la clonogénicité des SW1353 en culture 2D comme réalisé classiquement en radiobiologie (Upton and Bond, 1980). Le Tableau 15 résume les caractéristiques des courbes de survie après irradiation en bas TEL ou en haut TEL. Le coefficient de corrélation R^2 nous a semblé satisfaisant pour les deux conditions, étant donné la variabilité souvent observée avec les courbes de clonogénicité (0,900 pour le bas TEL et 0,804 pour le haut TEL). Le composant α est supérieur après irradiation en haut TEL ($2,567 \pm 0,217 \text{ Gy}^{-1}$) comparé à l'irradiation en bas TEL ($0,145 \pm 0,005 \text{ Gy}^{-1}$). Les valeurs D_{10} , D_{37} et FS_2 sont respectivement de 6,2 Gy, 3,6 Gy et 64,6% pour les RX, et 0,9 Gy, 0,4 Gy et moins d'1% pour les ions ^{18}O . De ce fait, les cellules SW1353 sont plus sensibles aux rayonnements de haut TEL en culture 2D. L'efficacité biologique relative des ions ^{18}O comparée aux RX a été évaluée à 6,8 (D_{10}) et 9 (D_{37}). Ces valeurs sont en concordance avec une compilation d'EBR réalisée par (Ando and Kase, 2009) et en tenant en compte un TEL $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$.

Rayonnement	N	PE (%)	$\alpha \text{ (Gy}^{-1}\text{)}$	$\beta \text{ (Gy}^{-2}\text{)}$	R^2	$D_{10} \text{ (Gy)}$	EBR ₁₀	$D_{37} \text{ (Gy)}$	EBR ₃₇	FS ₂ (%)
Bas TEL	6	$33,2 \pm 2,0$	$0,145 \pm 0,036$	$0,037 \pm 0,005$	0,900	6,2	/	3,6	/	64,6
Haut TEL (^{18}O)	3	$15,3 \pm 1,7$	$2,567 \pm 0,217$	0	0,804	0,9	6,8	0,4	9	< 1

Tableau 15: Caractéristiques des courbes de survie de la lignée SW1353 post-irradiation (bas et haut TELs) en culture 2D physioxique

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer la clonogénicité des cellules SW1353 après culture et irradiation dans le modèle 3D. Pour ce faire, nous avons essayé d'extraire les cellules par un traitement associant collagénase et accutase (ou trypsine). Cependant, ceci ne nous a pas permis d'extraire suffisamment de cellules vivantes. Les lignées de CHS sont connues pour produire de la MEC (Clark et al., 2009) ce qui pourrait expliquer la difficulté d'extraire des cellules de cette matrice. Comme alternative, nous avons estimé l'impact de ces RIs sur la prolifération et la mort cellulaires à l'intérieur du modèle 3D. La toxicité cellulaire a été évaluée en utilisant le test Toxilight et un contrôle positif comme décrit page 83. Le résultat est illustré dans la Figure 62. Le ratio d'induction était de 0,3 à 24h, $0,8 \pm 0,2$ à 48h et 0,3 à 96h post-irradiation en bas TEL. Ce ratio s'est élevé à 0,9 à 96h après irradiation en ions ^{18}O (1,1 après irradiation en ions ^{20}Ne). A titre de comparaison, l'utilisation de digitonine a induit une augmentation de ce ratio de manière proportionnelle à sa concentration (1,1 à 7 pM, 1,5 à 13 pM, $3,6 \pm 1,8$ à 65 pM et $15,4 \pm 5,4$ à 130 pM). Ainsi, après une dose unique de 2 Gy, nous n'avons pas mesuré de nécrose radio-induite dans le modèle 3D quelle que soit le TEL.

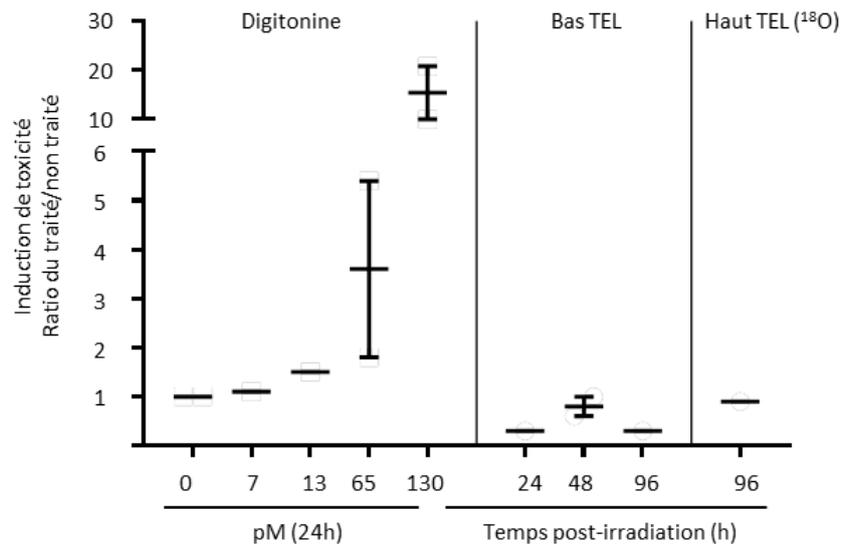


Figure 62: Analyse de la nécrose dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs)

Le milieu de culture des modèles 3D de CHS irradiées a été récolté 24h, 48h et 96h post-traitement (la digitonine a servi de contrôle positif) puis analysé par le test Toxilight. Les résultats sont présentés comme le ratio de luminescence produit par l'échantillon traité (irradié ou lysé par la digitonine) relatif à l'échantillon contrôle au même temps de cinétique (moyenne ± erreur sur la moyenne de deux expériences).

Nous avons ensuite mesuré l'indice de prolifération cellulaire Ki-67 post-irradiation comme décrit plus haut dans ce chapitre. L'expression de la protéine humaine Ki-67 est strictement associée à la prolifération cellulaire car elle est exprimée durant toutes les phases du cycle cellulaire (G_1 , S, G_2 et M) mais absente des cellules quiescentes (G_0) (Gerdes et al., 1984). Cependant, elle prédit le potentiel des cellules à se diviser et non pas l'état actuel de la division de ces cellules (Scholzen and Gerdes, 2000). Le Tableau 16 résume les indices de prolifération dans le modèle 3D après une irradiation de 2 Gy. Après une irradiation en bas TEL, nous avons mesuré un indice de 21% et 27% à J_4 et J_7 post-irradiation, respectivement. Suite à l'irradiation en haut TEL, cet indice a atteint 45% et 43% à J_4 et J_7 post-irradiation. Cette augmentation de l'indice de prolifération après une irradiation en haut TEL peut être expliquée par un plus grand nombre de cellules arrêtées dans les phases actives du cycle cellulaire pour cause de dommages irréparables de l'ADN. Bien que ces expériences nécessitent d'être répétées et approfondies, nous pouvons supposer qu'il reste, après irradiation, une fraction des cellules qui maintient un potentiel de division. En effet, il a été démontré *in vivo*, que les cellules de CHS à l'état de quiescence pouvaient contribuer à la relative radiorésistance de ces cellules à des rayonnements de bas TEL (Gelderblom et al., 2008).

Rayonnement	Temps après irradiation		
	J ₀	J ₄	J ₇
Bas TEL	33 ± 4	21	27
Haut TEL (¹⁸ O)		45	43

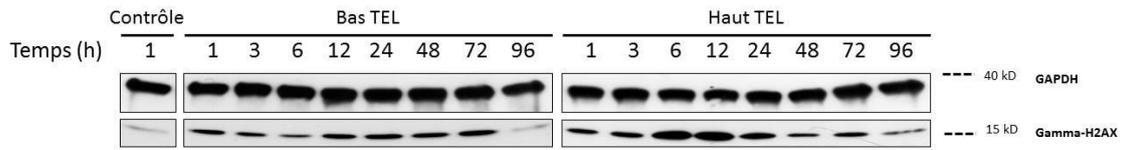
Tableau 16: Indice de prolifération Ki-67 dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs)

2.4) Cinétique de réparation des dommages à l'ADN (γ -H₂AX) :

L'extraction reproductible et efficace de protéines cellulaires à partir du modèle 3D a été un challenge technique. Le protocole d'extraction que nous avons développé (décrit page 88) nous a permis d'évaluer un rendement d'extraction de 94% ± 4% même avec des protéines nucléaires peu abondantes (quantification du signal γ -H₂AX).

La forme phosphorylée de l'histone H₂AX (γ -H₂AX) est impliquée dans la signalisation et la réparation des CDBs, spécialement après une irradiation (Löbrich et al., 2010; Paull et al., 2000). C'est pour cette raison que cette protéine a été choisie afin de comparer la cinétique de réparation des CDBs dans le modèle 3D. Pour ce faire, nous avons réalisé des western blots à partir d'extraits de M3DC prélevés entre 1h et 96h après irradiation en bas TEL ou haut TEL (dose unique de 2 Gy). En utilisant la protéine GAPDH comme contrôle de charge, nous avons mesuré une induction de la phosphorylation de la protéine H₂AX, et ce 1h après irradiation en bas TEL (4 fois le niveau du contrôle non irradié) (Figure 63). Suite à cette augmentation, l'expression de la protéine baisse pour atteindre les niveaux du contrôle 6h post-irradiation. Ces données semblent indiquer que la réparation des cassures de l'ADN dans le M3DC suit une cinétique rapide comme décrit précédemment en culture 2D (Löbrich et al., 2010). Cependant, nous avons mesuré une seconde vague de phosphorylation de H₂AX entre 12h et 72h de la cinétique, ce qui pourrait être expliqué par la prolifération cellulaire associée à la reprise du cycle cellulaire (Bhogal et al., 2010; Mah et al., 2010). Suite à l'irradiation en haut TEL, l'induction de γ -H₂AX 1h post-irradiation est similaire à la condition en bas TEL. Cependant, cette phosphorylation continue à augmenter pour atteindre un pic à 12h (10 fois le niveau du contrôle). A partir de 24h après irradiation, l'expression de γ -H₂AX baisse progressivement. Cette plus forte induction pourrait être expliquée par le fait que les rayonnements de haut TEL induisent des dommages à l'ADN plus complexes et plus difficiles à réparer que des rayonnements de bas TEL (Desai et al., 2005; Fürweger et al., 2007; Roig et al., 2010). En plus d'être plus forte, cette induction semble être prolongée indiquant probablement un décalage dans la cinétique de réparation des CDB.

A.



B.

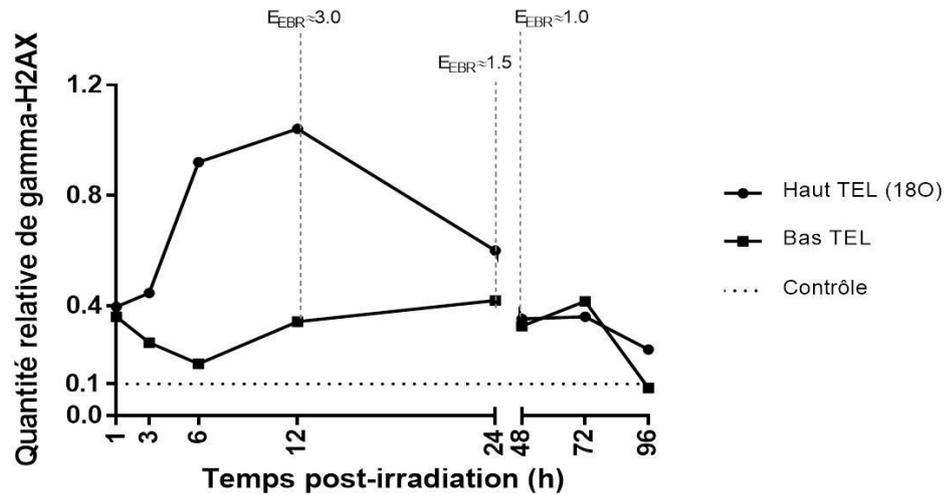


Figure 63: Cinétique de réparation γ -H2AX dans le M3DC post-irradiation (bas et haut TELs)

A : Les M3DC irradiés sont récoltées entre 6h et 96h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE 4-20%. Suite à l'étape de transfert, les membranes sont hybridées avec l'anticorps correspondant. Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image. La figure **B** correspond à la quantification du signal réalisée par le logiciel Image J. Les résultats sont présentés en quantité de protéine relative à la quantité de GAPDH.

A titre de comparaison, nous avons également réalisé une cinétique de réparation des CDBs en culture 2D dans des conditions comparable d'irradiation. En utilisant la protéine GAPDH comme contrôle de charge, nous avons mesuré une induction (facteur 3 comparé au contrôle) de la protéine γ -H₂AX et ce 1h post-irradiation en bas TEL (Figure 64). Suite à cela, l'expression de la protéine diminue en deux phases, une phase rapide 3h post-irradiation suivie d'une baisse plus progressive de 6h à 24h post-irradiation. De façon similaire, nous avons mesuré une induction (facteur 3) de γ -H₂AX 1h post-irradiation en haut TEL. Cependant, la baisse de la phosphorylation est plus progressive et seulement partielle (à 96h de la cinétique, l'expression de γ -H₂AX est deux fois supérieure au contrôle non irradié). Cette réparation plus lente suite à une irradiation en haut TEL a précédemment été décrite (Antonelli et al., 2015; Ostashevsky, 1989).

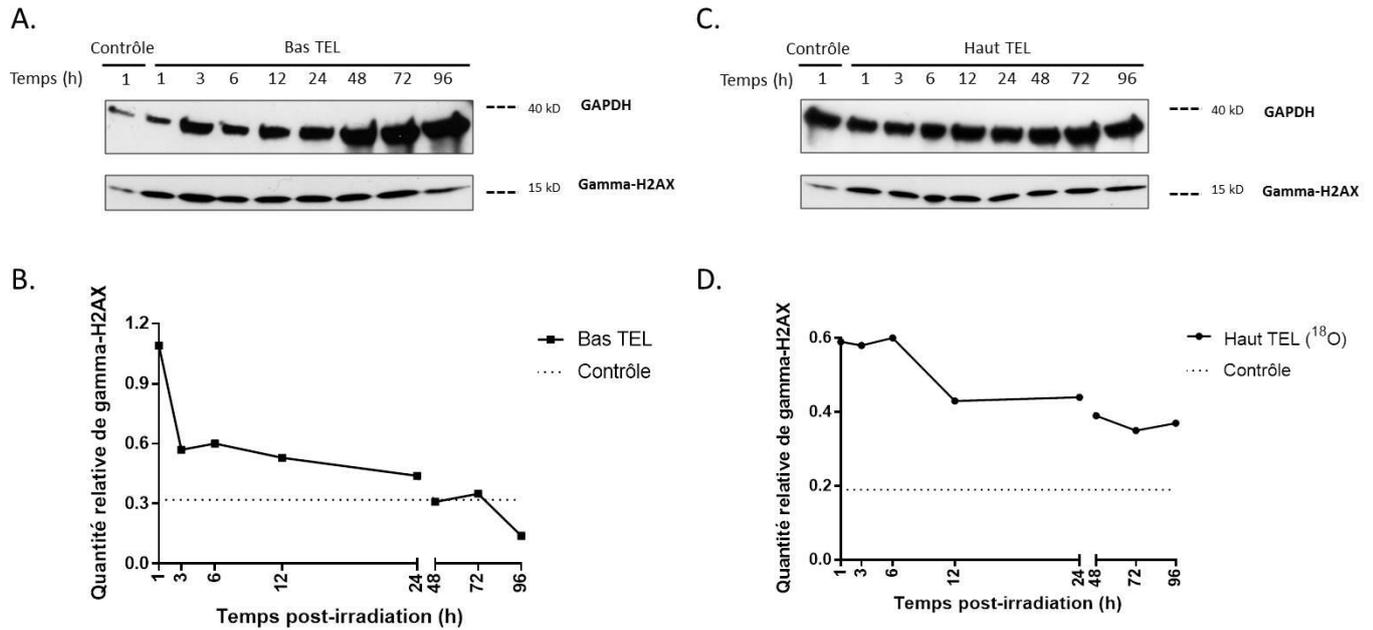


Figure 64: Cinétique de réparation γ -H2AX dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas et haut TELs) en culture 2D physioxique

A : Les cellules irradiées en bas TEL (**A**) ou en TEL intermédiaire (**C**) sont récoltées entre 6h et 96h post-irradiation. L'extrait protéique correspondant subit une électrophorèse SDS-PAGE 4-20%. Suite à l'étape de transfert, les membranes sont hybridées avec l'anticorps correspondant. Le contrôle de charge choisi est la GAPDH et les poids moléculaires reportés sur la droite de l'image. Les figures **B** et **D** correspondent à la quantification du signal réalisée par le logiciel Image J. Les résultats sont présentés en quantité de protéine relative à la quantité de GAPDH.

Enfin, nous proposons une nouvelle méthode d'évaluation de l'efficacité biologique relative dans les modèles 3D nommée E_{EBR} en utilisant le ratio de l'induction d'une protéine d'intérêt (γ -H₂AX dans notre cas) suite à une irradiation en haut TEL comparé au ratio obtenu en bas TEL au même point de cinétique. Dans notre cas de figure, l' E_{EBR} à 12h, 24h et 48h de la cinétique était de 3,0 1,5 et 1,0 respectivement dans le M3DC (Figure 63). Ce marqueur peut être utile dans l'évaluation de l'effet différentiel du type du RI dans des modèles 3D dont l'extraction cellulaire est impossible. De plus, l'analyse de l' E_{EBR} en fonction du temps après irradiation en utilisant des hadrons pourrait servir à étudier les réponses cellulaires et tissulaires spécifiques à des protocoles émergents de RT (hypo-fractionnement).

DISCUSSION GENERALE :

Ce projet de thèse avait pour objectif principal l'étude de la dépendance des réponses cellulaires des chondrocytes articulaires sains et pathologiques (CHS) à la nature du faisceau (TEL) dans un contexte d'hadronthérapie par ions carbone. Etant donné l'aspect transversal de cette problématique et son applicabilité en routine clinique, nous avons souhaité utiliser un modèle expérimental 3D, proche de l'homéostasie humaine. La prise en compte de la physioxie tissulaire du cartilage (2% d'O₂) nous a paru pertinente étant donné l'influence majeure de la tension d'oxygène sur la réponse tumorale à la RT.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons pu constater qu'en culture 2D, la physioxie (2% d'O₂) conférait une relative radiorésistance aux cellules de chondrocytes normaux et de CHS (lignée SW1353), par rapport à la normoxie (20% d'O₂). Cette observation confirme l'avantage attribué par la très faible tension d'oxygène (hypoxie) à certaines tumeurs résistantes à la ph-RT. Par ailleurs, le choix des donneurs de CAH peut s'avérer problématique étant donné leur radiosensibilité différentielle aux RX (donneur 1 plus radiosensible que le donneur 2). Ayant fait le choix de donneurs physiologiquement proches, nous pensons que cette réponse différentielle aux RX doit être due à la zone du cartilage articulaire d'où proviennent ces cellules. L'utilisation de multiples donneurs permettrait dans le futur de gommer ces différences et d'obtenir des résultats robustes afin d'extraire une tendance globale de la réponse des chondrocytes articulaires aux RX. Pour la suite des expériences, nous avons souhaité nous focaliser sur la réponse différentielle de RIs de différents TELs mais en faisant varier uniquement le mode de culture ; 2D *versus* 3D. Pour ce faire, la culture physioxique a été utilisée pour les deux conditions (2D et 3D). De plus, le 2^{ème} donneur a été privilégié car il a permis de réduire les temps de culture déjà très longs (un mois entier pour obtenir un modèle 3D de cartilage articulaire).

Dans les chapitres II et III-1 de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel des RIs de TEL intermédiaire en comparaison aux RXs (bas TEL) en culture physioxique 2D de chondrocytes articulaires normaux (chapitre II) et de CHS (chapitre III-1). A notre connaissance, c'est la première étude à se pencher sur ce sujet. L'EBR est une notion très importante en hadronthérapie car elle est intégrée dans les logiciels de traitement (TPS) utilisés en routine clinique. Dans nos conditions de culture physioxique 2D et pour un TEL d'environ 30 keV/μm, l'EBR a été évaluée à 2,6 pour le D2 de CAH, 2,1 pour le D1 de CAH et 2,3 pour la lignée de CHS SW1353. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces valeurs sont supérieures à la compilation de données de clonogénicité publiée précédemment (Ando and Kase, 2009), pour un TEL proche de 30 keV/μm. Cette observation peut être, soit liée aux spécificités de la ligne D1 du GANIL, ou encore à la culture physioxique choisie pour nos expériences (si la D₁₀ en RX est plus élevée du fait de la faible tension d'oxygène, l'EBR augmente).

La meilleure efficacité biologique des RIs de TEL intermédiaire en comparaison aux RX (bas TEL) a été corrélée à une plus forte altération des capacités de prolifération dans les deux types cellulaires. Cependant, dans le cas des CAH, ceci a été associé à une plus forte induction de la sénescence cellulaire. Par contre, pour la lignée SW1353, cette meilleure efficacité biologique a été associée à un blocage prolongé en phase G₂/M et potentiellement une induction plus forte de la catastrophe mitotique.

En effet, dans le cas des CAH, les deux types de rayonnement (bas TEL et TEL intermédiaire) ont induit un arrêt de cycle en G₀/G₁. Ceci est cohérent avec des études précédentes démontrant une baisse dose-dépendante de la synthèse d'ADN après une irradiation en RXs dans des chondrocytes primaires de lapin (Matsumoto et al., 1994) ou de chondrocytes primaires issus de la plaque de croissance de rats (Margulies et al., 2006). Cependant, cet arrêt de cycle n'a pas permis d'expliquer la meilleure efficacité biologique des RIs de TEL intermédiaire induisant une survie réduite (clonogénicité, Figure 44) et une augmentation significative des colonies de moins de 10 cellules (distribution de taille de colonies, Figure 45.A). Pour ce qui est de la lignée SW1353, les RIs de TEL intermédiaire ont induit un blocage plus intense et prolongé en phase G₂/M (Figure 54.C) en comparaison aux RX (bas TEL). Ce résultat a été décrit précédemment pour des cellules cancéreuses de poumon non à petite cellule, p53 mutées (Ma et al., 2015). De plus, les RIs de TEL intermédiaire semblent activer un *checkpoint* supplémentaire en G₁ dans la lignée SW1353, qui n'est pas mesurable après irradiation en RX. Ces effets différentiels entre chondrocytes normaux et chondrocytes de CHS sont très probablement liés à un statut p53 différent (CAH sont p53 *wild type* et SW1353 sont p53 mutées).

Par ailleurs, il a été démontré qu'un arrêt de cycle prolongé et/ou permanent permettait d'éliminer les cellules endommagées de la population viable (Linke et al., 1997). Dans nos conditions expérimentales et aux doses utilisées (2 Gy), nous n'avons relevé aucun signe de nécrose ou d'apoptose dans les CAH et la lignée SW1353, ce qui est cohérent avec des cellules d'origine mésenchymateuse. De plus, la lignée SW1353 a précédemment été décrite comme résistante à l'apoptose par la surexpression de gènes anti-apoptotiques (Kim et al., 2007) ainsi que la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs tels p53 (V203L) et p16 (délétion) (van Oosterwijk et al., 2012). Les résultats du test SA-β-gal ont montré que les RIs de TEL intermédiaire (2 Gy) induisent deux fois plus de sénescence que les RX (bas TEL), à la même dose physique, dans les chondrocytes articulaires normaux (Figure 47.A). Cependant, ces mêmes doses n'ont pas induit d'augmentation de sénescence dans la lignée SW1353. Amornwichee et associés ont démontré que l'induction de catastrophe mitotique mesurée en microscopie dans des cellules p53 déficientes et résistantes à l'apoptose (comme la lignée SW1353), était responsable de la meilleure efficacité biologique des ions carbone en comparaison aux RX (Amornwichee et al., 2014). Cette piste de catastrophe mitotique nous semble intéressante à explorer et approfondir afin de mieux appréhender les mécanismes de réponse des CHSs aux RIs.

Le stress oxydatif radio-induit est également un mécanisme important pouvant aggraver les effets délétères des RIs, quand les défenses anti-oxydantes sont dépassées. Cependant, la plupart des études relatives au stress oxydatif ont été réalisées en normoxie. Dans nos conditions de culture physioxique, nous n'avons pas mesuré

d'induction significative de la production de ROS dans les CAH après irradiation en RX (bas TEL) et TEL intermédiaire (mis à part une induction transitoire à 48h en RX). Pour ce qui est de la lignée SW1353, après une irradiation en TEL intermédiaire, il semblerait qu'un stress oxydatif significativement supérieur au contrôle s'installe à 96h post-irradiation, ce qui est concordant avec une publication précédente réalisée dans des cellules de fibroblaste humain (Laurent et al., 2013). Cependant, dans notre cas, le *fold* d'induction reste relativement faible (autour de 1,5 à 96h post-irradiation) et peut être expliqué par les dommages localisés qu'induisent les ions accélérés et qui empêchent les radicaux libres oxygénés de se recombinaisonner et aggraver les dommages oxydatifs.

Dans le second chapitre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet différentiel de RIs de TEL intermédiaire en comparaison aux RX (bas TEL) dans un modèle 3D de cartilage articulaire. La meilleure efficacité biologique des ions carbone de TEL intermédiaire observée en culture monocouche 2D n'a pas été reproduite en culture 3D. L'irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) avec une dose de 2 Gy n'a pas modifié l'indice de prolifération Ki-67, ce qui signifie une absence d'accumulation de cellules en phase de quiescence (G_0). Ce résultat semble contre-intuitif car en opposition à ce qui a été mesuré en culture 2D mais peut être expliqué par un état physiologique différent des cellules en culture 3D, comme cela a été décrit précédemment (Sowa et al., 2010).

La chondrosénescence a été décrite comme un arrêt de cycle prolongé associé à de l'hypertrophie et à une perte de différenciation. Afin d'évaluer l'ampleur de ce phénomène après une irradiation du M3DCa, nous avons sélectionné trois protéines d'intérêt ; p21, H2A.J et COX-2. Dans un premier temps, nous avons tenté d'analyser les résultats en tenant compte du temps de cinétique mais nous nous sommes rendu compte de l'effet stochastique des RIs sur l'expression de ces protéines en 3D. En considérant chaque M3DCa comme un modèle indépendant, nous avons noté que les RIs de TEL bas et intermédiaire induisaient une surexpression de p21 et H2A.J associée à une répression de COX-2 dans 8% des modèles. Ces résultats vont dans le sens d'une sénescence radio-induite et ne permettent pas de démontrer un effet différentiel entre RIs de bas TEL et TEL intermédiaire à la différence de la culture monocouche 2D. Les effets biologiques mesurés en culture 2D, telle la meilleure efficacité biologique des ions carbone comparée aux RXs, pourraient être surévalués par rapport aux résultats obtenus en clinique surtout concernant les tissus sains. La Figure 65 récapitule le modèle de sénescence induite dans le M3DCa suite à une irradiation, pour les deux TELs utilisés ; La culture prolongée des chondrocytes articulaires en monocouche 2D induit leur perte de différenciation (dé-différenciation) mesurée par la perte progressive de l'expression de COX-2. Le passage de ces cellules en matrice de collagène en physioxie a permis le retour à un état de différenciation cellulaire. L'irradiation de ces modèles a induit en faible proportion (autour de 8% des modèles) de la sénescence signifiée par une augmentation de l'expression de p21 (arrêt de cycle) et H2A.J (histone s'accumulant dans les cellules

sénescentes) et une baisse de l'expression de COX-2 (perte de différenciation). La sénescence est un phénomène qui exclue tout autre type de mort par apoptose ou nécrose.

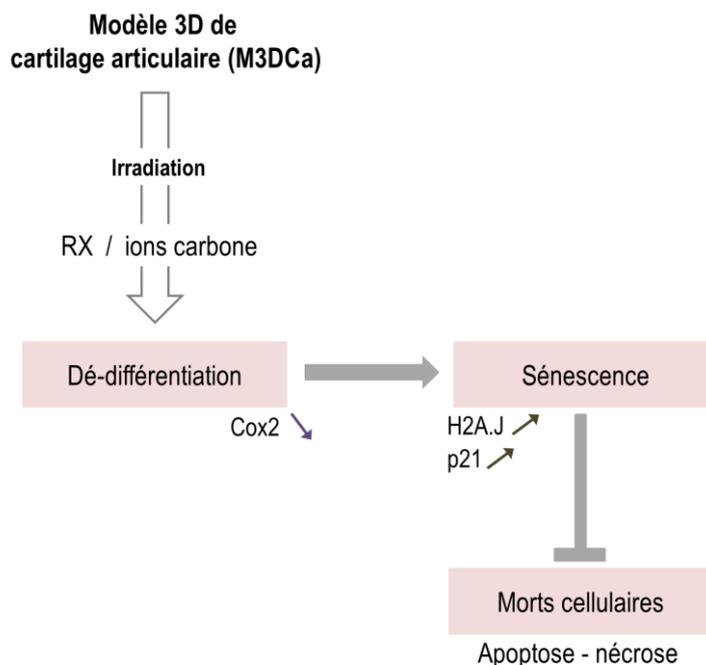


Figure 65: Modèle de sénescence radio-induite dans le M3DCa

L'aspect stochastique que nous avons mesuré avec ce modèle 3D en éponge de collagène semble être lié au type cellulaire car il a été mis en évidence avec le cartilage articulaire normal et pas dans le modèle 3D de CHS décrit dans le chapitre III-2. Le développement d'autres modèles 3D permettrait de lever le voile sur cet aspect stochastique et explorer sa pertinence en clinique.

Enfin, dans le dernier chapitre de cette thèse, nous avons décrit le premier modèle 3D physioxique de CHS appliqué à une étude d'hadronbiologie. L'extraction protéique de la matrice de collagène a été un réel challenge technique qui a été surmonté en utilisant un protocole développé par les spécialistes de la levure. Nous pensons que le crosslink ou pontage qu'a subi l'éponge de collagène au cours de son processus de fabrication est à l'origine de cette difficulté à extraire des protéines cellulaires. Par ailleurs, la distribution de TEL dans le modèle a été évaluée à l'aide de deux codes de calcul démontrant une irradiation homogène des cellules au sein de la matrice. Nous avons décrit des réponses cellulaires différentielles (prolifération, cinétique de réparation des CDBs) suite à une irradiation en bas TEL *versus* haut TEL, et ce en utilisant la même dose physique de 2 Gy. Les différences entre les résultats obtenus en 2D et 3D, spécialement pour l'irradiation en haut TEL, peut être expliquée par la physiologie particulière des cellules dans le modèle 3D. En effet, les cellules qui sont entourées d'une MEC changent leur métabolisme (Saintigny et al., 2015) et

peuvent présenter une cinétique décalée de la phosphorylation de la protéine H₂AX (Desai et al., 2005; Mah et al., 2010). De plus, suite à l'irradiation en haut TEL des M3DC, nous avons mesuré une induction plus intense et plus longue comparée à l'irradiation en bas TEL.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

L'hadronthérapie par ions carbone représente une méthode thérapeutique innovante qui allie les avantages physiques de la p-RT à une meilleure efficacité biologique. Ceci permettrait de réduire la fréquence et la sévérité de la morbidité liée à la RT. Cependant, la combinaison de plusieurs facteurs liés au rayonnement (TEL, énergie, débit de dose, dose) et au statut biologique du tissu concerné (tension d'oxygène, facteurs de comorbidité, fond génétique) ne facilite pas la mise en place de modèles d'exposition des tissus sains et cancéreux pendant un protocole d'hadronthérapie (Loeffler and Durante, 2013). Il nous a donc semblé nécessaire de développer de nouveaux outils afin d'optimiser l'usage des faisceaux d'hadrons en oncologie.

Le modèle 3D de cartilage articulaire utilisé dans le cadre de cette thèse a initialement été développé à des fins d'ingénierie tissulaire (Legendre et al., 2013). Le choix s'est porté sur ce modèle car il prend en compte la physioxie tissulaire naturelle du cartilage et offre la possibilité d'être greffé sur souris immunodéprimées pour d'éventuelles études *in vivo*. De plus, l'utilisation d'une matrice commercialisée permet de s'affranchir de la variabilité inhérente à la fabrication de modèles 3D. Cependant, les nombreuses contraintes techniques, notamment la difficulté à extraire des protéines cellulaires en grande quantité, l'impossibilité de doser ces protéines extraites (avec notre protocole de disruption) et de réaliser des coupes au cryostat et des marquages en immunofluorescence en limitent l'usage en radiobiologie. De plus, malgré plusieurs essais, nous n'avons pas été en mesure d'extraire assez de cellules vivantes du modèle 3D après irradiation (travail de M2, Sofia Barbieri), empêchant ainsi la comparaison de la radiosensibilité cellulaire (2D *versus* 3D) avec des techniques identiques. Le développement d'autres modèles 3D de cartilage et de CHS, qui, comme ceux que nous avons utilisés, prennent en compte la physioxie tissulaire, et en plus offrent la possibilité d'extraire les cellules vivantes après irradiation, serait une perspective intéressante de ce travail. L'utilisation de lignées chondrocytaires plutôt que des cellules primaires limiterait également le temps de culture et permettrait de multiplier les critères biologiques et la reproductibilité des expériences.

Par ailleurs, notre étude s'est basée sur l'utilisation de la ligne IRABAT du GANIL dont le fonctionnement par campagne limite considérablement le temps de faisceau et les possibilités d'expériences, ce qui impacte la reproductibilité des expériences. Malgré la mise en place d'une salle (D1) pour les irradiations d'échantillons biologiques, il subsiste encore des limitations techniques à l'utilisation de cette ligne. Comme par exemple le choc thermique que subissent les cellules dans la salle D1, ainsi que les conditions climatiques qui peuvent induire l'arrêt électrique de la machine ou modifier la dosimétrie au cours d'une irradiation. De plus, nous avons utilisé une machine de RX de bas kilovoltage (car plus facile d'accès qu'une machine médicale) alors qu'en condition idéale nous aurions utilisé du ^{60}Co (qui sert classiquement à calculer les EBR). Enfin, le référentiel biologique, balistique et clinique des ions carbone est un faisceau de proton auquel nous n'avons pas eu accès durant cette thèse. Dans la perspective du centre ARCHADE, en cours de construction, il serait intéressant de transposer ces expériences à une machine produisant des faisceaux de qualité médicale (protons *versus* ions carbone).

Dans le deuxième chapitre de ce travail, nous avons développé l'étude à court terme de l'irradiation d'un cartilage articulaire en sélectionnant quelques critères d'évaluation, à savoir la prolifération et la/les mort(s) radio-induite(s). Ces expériences pourraient être étendues à l'étude des effets à long terme des ions carbone sur les propriétés mécaniques du cartilage car les effets tardifs sur les tissus sains sont les facteurs limitants lors de l'établissement d'un protocole de RT (Stone et al., 2003). Pour ce faire, des donneurs pré- et post-pubères de statuts génétiques différents pourraient être sélectionnés. De plus, comme l'inflammation chronique est à l'origine de l'ostéoarthrose radio-induite, il serait intéressant d'analyser la composition du secretome suite à une irradiation en bas TEL ou TEL intermédiaire. Enfin, l'étude de l'altération de l'ostéogénèse et de la chondrogenèse dans les CSMs par les ions carbone pourrait être utile afin d'évaluer l'étendue des défauts osseux observés après une RT comme cela a été réalisé précédemment en RXs (Cruet-Hennequart et al., 2015).

Notre projet s'est intéressé aux effets directs de rayonnements ionisants (à différents TELs) sur le cartilage sain et pathologique. Cependant, les RIs sont également responsables d'effets indirects ou effets « bystander ». Ces effets de « voisinage » se font par le biais d'un signal de stress émis par une cellule irradiée vers les cellules non irradiées voisines ou à distance. L'utilisation récente de la tomothérapie et de ses variantes (arcthérapie, cyberknife) en ph-RT de nouvelle génération pose la problématique d'un plus grand volume de tissus sains irradié à faible dose. La littérature ne rapporte à ce jour qu'un seul article relatif à un signal de type bystander émis par des chondrocytes de CHS dans des conditions expérimentales en 2D et normoxie (Wakatsuki et al., 2012), sans le contrôle interne à savoir les chondrocytes normaux. La mise en évidence d'un éventuel effet bystander dans des conditions mimant au mieux la réalité biologique d'un tissu humain est pourtant essentielle dans la perspective d'un protocole d'hadronthérapie par ions carbone ou protons ciblant un sarcome (chordome, ostéo- et CHSs) tumeur en première ligne pour l'hadronthérapie (Durante and Galès, 2014) et le projet ARCHADE. Des études futures utilisant ce modèle ou d'autres modèles 3D de CHS ainsi que des outils innovants (Chevalier et al., 2015) permettraient de lever le voile sur cette radiorésistance.

Enfin, les perspectives de ce projet, transposable à d'autres types de tumeurs éligibles pour l'hadronthérapie, pourront être à l'origine d'une nouvelle vision de la recherche d'EBRs en conditions de physioxie cellulaire et de leurs intégrations dans un TPS. A long terme, quand des salles d'expériences spécifiques seront disponibles dans les bâtiments d'ARCHADE, certaines conditions d'expérience pourront être transposées sur le modèle déjà utilisé de greffe de cultures 3D (Legendre et al., 2013) de cellules humaines saines et/ou pathologiques, implantées en sous-cutané chez la souris immunocompétente, et irradiées en doses uniques *versus* fractionnées (comme c'est le cas des protocoles de RT au Japon). En effet, le M3DC décrit ici et les modèles 3D en général pourraient servir comme outil de validation pour des faisceaux médicaux d'ions carbone ou de proton. Ceci à travers l'évaluation de la dépendance EBR-TEL et la mesure de la variation de l'EBR le long du parcours d'un faisceau thérapeutique de proton ou d'ion lourd tels les ions carbone comme ceci a précédemment été réalisé (Britten et al., 2013).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, A., Iwadate, Y., Ikegami, S., Kambe, M., Hasegawa, A., Inaniwa, T., and Saeki, N. (2015). Brain tumor induced by heavy particle radiotherapy: a case report (*International Journal of Molecular Medicine*).
- Akasaki, Y., Alvarez-Garcia, O., Saito, M., Caramés, B., Iwamoto, Y., and Lotz, M.K. (2014). FoxO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 3349–3358.
- Allen, J.L., Cooke, M.E., and Alliston, T. (2012). ECM stiffness primes the TGF β pathway to promote chondrocyte differentiation. *Mol. Biol. Cell* 23, 3731–3742.
- Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J.E., Goltzman, D., and Karaplis, A.C. (1994). Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J. Cell Biol.* 126, 1611–1623.
- Amornwichee, N., Oike, T., Shibata, A., Ogiwara, H., Tsuchiya, N., Yamauchi, M., Saitoh, Y., Sekine, R., Isono, M., Yoshida, Y., et al. (2014). Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe. *PLoS One* 9, e115121.
- Ando, K., and Kase, Y. (2009). Biological characteristics of carbon-ion therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 715–728.
- Antonelli, F., Campa, A., Esposito, G., Giardullo, P., Belli, M., Dini, V., Meschini, S., Simone, G., Sorrentino, E., Gerardi, S., et al. (2015). Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death. *Radiat. Res.*
- Aro, E., Khatri, R., Gerard-O’Riley, R., Mangiavini, L., Myllyharju, J., and Schipani, E. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) but not HIF-2 is essential for hypoxic induction of collagen prolyl 4-hydroxylases in primary newborn mouse epiphyseal growth plate chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 37134–37144.
- Battistoni, G., Cerutti, F., Fasso, A., Ferrari, A., Muraro, S., Ranft, J., Roesler, S., and Sala, P.R. (2007). The FLUKA code: description and benchmarking. In *Hadronic Shower Simulation Workshop*, M. Albrow, and R. Raja, eds. (Melville: Amer Inst Physics), pp. 31–49.
- Belli, M., Saporita, O., and Tabocchini, M.A. (2002). Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 43, S13–S19.
- Belyakov, O.V., Mitchell, S.A., Parikh, D., Randers-Pehrson, G., Marino, S.A., Amundson, S.A., Geard, C.R., and Brenner, D.J. (2005). Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14203–14208.
- Bentovim, L., Amarilio, R., and Zelzer, E. (2012). HIF1 α is a central regulator of collagen hydroxylation and secretion under hypoxia during bone development. *Dev. Camb. Engl.* 139, 4473–4483.
- Bhogal, N., Kaspler, P., Jalali, F., Hyrien, O., Chen, R., Hill, R.P., and Bristow, R.G. (2010). Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. *Radiat. Res.* 173, 1–9.
- Blagosklonny, M.V. (2006). Cell senescence: hypertrophic arrest beyond the restriction point. *J. Cell. Physiol.* 209, 592–597.
- Bovée, J.V.M.G., Hogendoorn, P.C.W., Wunder, J.S., and Alman, B.A. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* 10, 481–488.

- Britten, R.A., Nazaryan, V., Davis, L.K., Klein, S.B., Nichiporov, D., Mendonca, M.S., Wolanski, M., Nie, X.L., George, J., and Keppel, C. (2013). Variations in the RBE for Cell Killing Along the Depth-Dose Profile of a Modulated Proton Therapy Beam. *Radiat. Res.* 179, 21–28.
- Bühning, H.-J., Battula, V.L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., and Vogel, W. (2007). Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 262–271.
- Buonanno, M., de Toledo, S.M., Pain, D., and Azzam, E.I. (2011). Long-Term Consequences of Radiation-Induced Bystander Effects Depend on Radiation Quality and Dose and Correlate with Oxidative Stress. *Radiat. Res.* 175, 405–415.
- Castro, J.R., Linstadt, D.E., Bahary, J.P., Petti, P.L., Daftari, I., Collier, J.M., Gutin, P.H., Gauger, G., and Phillips, T.L. (1994). Experience in charged particle irradiation of tumors of the skull base: 1977-1992. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29, 647–655.
- Chajra, H., Rousseau, C.F., Cortial, D., Ronzière, M.C., Herbage, D., Mallein-Gerin, F., and Freyria, A.M. (2008). Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed. Mater. Eng.* 18, S33–S45.
- Chevalier, F., Hamdi, D.H., Saintigny, Y., and Lefaix, J.-L. (2015). Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763, 280–293.
- Clark, J.C., Akiyama, T., Dass, C.R., and Choong, P.F. (2010). New clinically relevant, orthotopic mouse models of human chondrosarcoma with spontaneous metastasis. *Cancer Cell Int.* 10, 20.
- Clark, J.C.M., Dass, C.R., and Choong, P.F.M. (2009). Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J. Surg.* 79, 327–336.
- Claus, S., Mayer, N., Aubert-Foucher, E., Chajra, H., Perrier-Groult, E., Lafont, J., Piperno, M., Damour, O., and Mallein-Gerin, F. (2012). Cartilage-Characteristic Matrix Reconstruction by Sequential Addition of Soluble Factors During Expansion of Human Articular Chondrocytes and Their Cultivation in Collagen Sponges. *Tissue Eng. Part C-Methods* 18, 104–112.
- Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B., Schuler, N., Courbeyrette, R., Thuret, J.-Y., Ma, Z., Derbois, C., Nevers, M.-C., Volland, H., et al. (in revision). A novel histone variant H2A.J accumulates in senescent human cells with persistent DNA damage and promotes inflammatory gene expression. *Mol. Cell*.
- Cornelissen, M., Thierens, H., and Deridder, L. (1990). DOSE-DEPENDENT AND TIME-DEPENDENT RADIATION INHIBITION OF RNA AND GLYCOSAMINOGLYCAN SYNTHESIS IN EMBRYONIC CARTILAGE - AN INVITRO STUDY. *Int. J. Radiat. Biol.* 57, 1007–1016.
- Cornelissen, M., Thierens, H., and De Ridder, L. (1993a). Radiation effects on the matrix synthesis in non-ossifying embryonic cartilage in vitro: a functional and morphological study. *Tissue Cell* 25, 343–350.
- Cornelissen, M., Thierens, H., and de Ridder, L. (1993b). Effects of ionizing radiation on the size distribution of proteoglycan aggregates synthesized by chondrocytes in agarose. *Scanning Microsc.* 7, 1263–1267; discussion 1267–1268.
- Cruet-Hennequart, S., Drougard, C., Shaw, G., Legendre, F., Demoor, M., Barry, F., Lefaix, J.-L., and Galéra, P. (2015). Radiation-induced alterations of osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS One* 10, e0119334.
- Damron, T.A., Zhang, M.L., Pritchard, M.R., Middleton, F.A., Horton, J.A., Margulies, B.M., Strauss, J.A., Farnum, C.E., and Spadaro, J.A. (2009). MICROARRAY CLUSTER ANALYSIS OF IRRADIATED

GROWTH PLATE ZONES FOLLOWING LASER MICRODISSECTION. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *74*, 949–956.

Das, R.H.J., Jahr, H., Verhaar, J. a. N., van der Linden, J.C., van Osch, G.J.V.M., and Weinans, H. (2008). In vitro expansion affects the response of chondrocytes to mechanical stimulation. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *16*, 385–391.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* *4*, 1798–1806.

De Craemer, D., Thierens, H., Cornelissen, M., Beele, H., Lepercque, S., and de Ridder, L. (1989). The effects of ionizing radiation on the glycosaminoglycan synthesis in embryonic cartilage in vitro. *Cytotechnology* *2*, 19–25.

DeLaney, T.F., Liebsch, N.J., Pedlow, F.X., Adams, J., Weyman, E.A., Yeap, B.Y., Depauw, N., Nielsen, G.P., Harmon, D.C., Yoon, S.S., et al. (2014). Long-term results of Phase II study of high dose photon/proton radiotherapy in the management of spine chordomas, chondrosarcomas, and other sarcomas. *J. Surg. Oncol.* *110*, 115–122.

Delanian, S., and Lefaix, J.-L. (2007). Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin. Radiat. Oncol.* *17*, 99–107.

Demizu, Y., Fujii, O., Nagano, F., Terashima, K., Jin, D., Mima, M., Oda, N., Takeuchi, K., Takeda, M., Ito, K., et al. (2015). Unexpected radiation laryngeal necrosis after carbon ion therapy using conventional dose fractionation for laryngeal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *45*, 1076–1081.

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Lafont, J., Denoix, J.-M., Audigié, F., Mallein-Gerin, F., et al. (2014). Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2414–2440.

Desai, N., Durante, M., Lin, Z.W., Cucinotta, F., and Wu, H. (2005). High LET-induced H2AX phosphorylation around the Bragg curve. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR* *35*, 236–242.

van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* *509*, 439–446.

Djouad, F., Delorme, B., Maurice, M., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Canovas, F., Charbord, P., Noël, D., and Jorgensen, C. (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R33.

Durante, M. (2014). New challenges in high-energy particle radiobiology. *Br. J. Radiol.* *87*, 20130626.

Durante, M., and Galès, S. (2014). Chapter I - Hadrontherapy. In *Nuclear Physics for Medicine - NuPECC Report*.

Durantel, F., Balanzat, E., Cassimi, A., Chevalier, F., Ngonon-Ravache, Y., Madi, T., Pouilly, J.-C., Ramillon, J.-M., Rothard, H., Ropars, F., et al. (2016). Dosimetry for radiobiology experiments at GANIL. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.*

Duval, E., Leclercq, S., Elissalde, J.-M., Demoor, M., Galéra, P., and Boumédiène, K. (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum.* *60*, 3038–3048.

- Ferrandon, S., Magné, N., Battiston-Montagne, P., Hau-Desbat, N.-H., Diaz, O., Beuve, M., Constanzo, J., Chargari, C., Poncet, D., Chautard, E., et al. (2015). Cellular and molecular portrait of eleven human glioblastoma cell lines under photon and carbon ion irradiation. *Cancer Lett.* *360*, 10–16.
- Ferrari, A., Sala, P.R., Fasso, A., and Ranft, J. FLUKA: A Multi-Particle Transport Code. Geneva CERN 2005 - 405 P.
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* *1*, 2315–2319.
- Freyria, A.-M., Ronzière, M.-C., Cortial, D., Galois, L., Hartmann, D., Herbage, D., and Mallein-Gerin, F. (2009). Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type I or type II collagen scaffolds. *Tissue Eng. Part A* *15*, 1233–1245.
- Friedrich, T., Scholz, U., Elsasser, T., Durante, M., and Scholz, M. (2013). Systematic analysis of RBE and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *54*, 494–514.
- Fuji, H., Nakasu, Y., Ishida, Y., Horiguchi, S., Mitsuya, K., Kashiwagi, H., and Murayama, S. (2011). Feasibility of proton beam therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base. *Skull Base Off. J. North Am. Skull Base Soc.* *Al 21*, 201–206.
- Fürweger, C., Hajek, M., Vana, N., Kodym, R., and Okayasu, R. (2007). Cellular signal transduction events as a function of linear energy transfer (LET). *Radiat. Prot. Dosimetry* *126*, 418–422.
- Gadjanski, I., Spiller, K., and Vunjak-Novakovic, G. (2012). Time-Dependent Processes in Stem Cell-Based Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Stem Cell Rev. Rep.* *8*, 863–881.
- Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C.W., Dijkstra, S.D., van Rijswijk, C.S., Krol, A.D., Taminiâu, A.H.M., and Bovée, J.V.M.G. (2008). The clinical approach towards chondrosarcoma. *The Oncologist* *13*, 320–329.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *133*, 1710–1715.
- Grabham, P., Hu, B., Sharma, P., and Geard, C. (2011). Effects of ionizing radiation on three-dimensional human vessel models: differential effects according to radiation quality and cellular development. *Radiat. Res.* *175*, 21–28.
- Groesser, T., Chang, H., Fontenay, G., Chen, J., Costes, S.V., Barcellos-Hoff, M.H., Parvin, B., and Rydberg, B. (2011). Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions. *Int. J. Radiat. Biol.* *87*, 696–710.
- Grosshans, D.R., Zhu, X.R., Melancon, A., Allen, P.K., Poenisch, F., Palmer, M., McAleer, M.F., McGovern, S.L., Gillin, M., DeMonte, F., et al. (2014). Spot scanning proton therapy for malignancies of the base of skull: treatment planning, acute toxicities, and preliminary clinical outcomes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *90*, 540–546.
- Hasegawa, A., Koto, M., Takagi, R., Fujikawa, A., Morikawa, T., Kamada, T., and Tsujii, H. (2011). Carbon Ion Radiotherapy for Malignant Head-and-Neck Tumors. (Lyon, France: International Affairs Section, NIRS, Japan),.
- Henrotin, Y., Kurz, B., and Aigner, T. (2005). Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *13*, 643–654.

- Hiranuma, H., Jikko, A., Iwamoto, M., and Fuchihata, H. (1996). Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone* 18, 233–238.
- Holliday, E.B., Mitra, H.S., Somerson, J.S., Rhines, L.D., Mahajan, A., Brown, P.D., and Grosshans, D.R. (2015). Postoperative proton therapy for chordomas and chondrosarcomas of the spine: adjuvant versus salvage radiation therapy. *Spine* 40, 544–549.
- Hong, E.H., Lee, S.J., Kim, J.S., Lee, K.H., Um, H.D., Kim, J.H., Kim, S.J., Kim, J.I., and Hwang, S.G. (2010). Ionizing Radiation Induces Cellular Senescence of Articular Chondrocytes via Negative Regulation of SIRT1 by p38 Kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 1283–1295.
- Horton, J.A., Bariteau, J.T., Loomis, R.M., Strauss, J.A., and Damron, T.A. (2008). Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 291, 283–292.
- Houard, X., Goldring, M.B., and Berenbaum, F. (2013). Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, 375.
- Hug, E.B., Fitzek, M.M., Liebsch, N.J., and Munzenrider, J.E. (1995). Locally challenging osteo- and chondrogenic tumors of the axial skeleton: results of combined proton and photon radiation therapy using three-dimensional treatment planning. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31, 467–476.
- Hug, E.B., Lored, L.N., Slater, J.D., DeVries, A., Grove, R.I., Schaefer, R.A., Rosenberg, A.E., and Slater, J.M. (1999). Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. *J. Neurosurg.* 91, 432–439.
- Hug, E.B., Sweeney, R.A., Nurre, P.M., Holloway, K.C., Slater, J.D., and Munzenrider, J.E. (2002). Proton radiotherapy in management of pediatric base of skull tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52, 1017–1024.
- Hugenberg, S.T., Myers, S.L., and Brandt, K.D. (1989). Suppression of glycosaminoglycan synthesis by articular cartilage, but not of hyaluronic acid synthesis by synovium, after exposure to radiation. *Arthritis Rheum.* 32, 468–474.
- Imai, R., Kamada, T., Tsuji, H., Maruyama, K., Matsumoto, K., and Tsujii, H. (2011). Carbon Ion Radiotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcoma. (Lyon, France: International Affairs Section, NIRS, Japan),.
- Jensen, A.D., Münter, M.W., and Debus, J. (2011). Review of clinical experience with ion beam radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 84 *Spec No 1*, S35–S47.
- Jikko, A., Hiranuma, H., Iwamoto, M., Kato, Y., Okada, Y., and Fuchihata, H. (1996). Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat. Res.* 146, 93–99.
- Jingu, K., Tsujii, H., Mizoe, J.-E., Hasegawa, A., Bessho, H., Takagi, R., Morikawa, T., Tonogi, M., Tsuji, H., Kamada, T., et al. (2012). Carbon ion radiation therapy improves the prognosis of unresectable adult bone and soft-tissue sarcoma of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 82, 2125–2131.
- Kagawa, K., Murakami, M., Hishikawa, Y., Abe, M., Akagi, T., Yanou, T., Kagiya, G., Furusawa, Y., Ando, K., Nojima, K., et al. (2002). Preclinical biological assessment of proton and carbon ion beams at Hyogo Ion Beam Medical Center. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 54, 928–938.
- Kamada, T., Tsujii, H., Tsuji, H., Yanagi, T., Mizoe, J., Miyamoto, T., Kato, H., Yamada, S., Morita, S., Yoshikawa, K., et al. (2002). Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in bone and soft tissue sarcomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 4466–4471.

- Kamada, T., Tsujii, H., Blakely, E.A., Debus, J., De Neve, W., Durante, M., Jäkel, O., Mayer, R., Orecchia, R., Pötter, R., et al. (2015). Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *Lancet Oncol.* *16*, e93–e100.
- Kim, D.W., Seo, S.W., Cho, S.K., Chang, S.S., Lee, H.W., Lee, S.E., Block, J.A., Hei, T.K., and Lee, F.Y. (2007). Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of grade II chondrosarcoma cells. *J. Orthop. Res.* *25*, 820–828.
- Koto, M., Hasegawa, A., Takagi, R., Fujikawa, A., Morikawa, T., Tsujii, H., and Kamada, T. (2011). Carbon Ion Radiotherapy for Skull Base and Pracervical Tumors. (Lyon, France: International Affairs Section, NIRS, Japan),.
- Laurent, C., Leduc, A., Pottier, I., Prevost, V., Sichel, F., and Lefaix, J.L. (2013). Dramatic Increase in Oxidative Stress in Carbon-Irradiated Normal Human Skin Fibroblasts. *Plos One* *8*.
- Le, Q.T., Fu, K.K., Kroll, S., Fitts, L., Massullo, V., Ferrell, L., Kaplan, M.J., and Phillips, T.L. (1997). Prognostic factors in adult soft-tissue sarcomas of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *37*, 975–984.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* *5*, 187–195.
- Legendre, F., Ollitrault, D., Hervieu, M., Baugé, C., Maneix, L., Goux, D., Chajra, H., Mallein-Gerin, F., Boumediene, K., Galera, P., et al. (2013). Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng. Part C Methods* *19*, 550–567.
- Linke, S.P., Clarkin, K.C., and Wahl, G.M. (1997). p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res.* *57*, 1171–1179.
- Little, J.B. (1994). Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiat. Res.* *140*, 299–311.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., and Jeggo, P.A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 662–669.
- Loeffler, J.S., and Durante, M. (2013). Charged particle therapy--optimization, challenges and future directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *10*, 411–424.
- Ma, C.M., Coffey, C.W., DeWerd, L.A., Liu, C., Nath, R., Seltzer, S.M., Seuntjens, J.P., and American Association of Physicists in Medicine (2001). AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med. Phys.* *28*, 868–893.
- Ma, H., Takahashi, A., Sejimo, Y., Adachi, A., Kubo, N., Isono, M., Yoshida, Y., Kanai, T., Ohno, T., and Nakano, T. (2015). Targeting of Carbon Ion-Induced G2 Checkpoint Activation in Lung Cancer Cells Using Wee-1 Inhibitor MK-1775. *Radiat. Res.* *184*, 660–669.
- Mah, L.-J., El-Osta, A., and Karagiannis, T.C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* *24*, 679–686.
- Maldonado, M., and Nam, J. (2013). The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed Res. Int.* *2013*, 284873.

- Malladi, P., Xu, Y., Chiou, M., Giaccia, A.J., and Longaker, M.T. (2006). Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C1139–C1146.
- Margulies, B.S., Horton, J.A., Wang, Y., Damron, T.A., and Allen, M.J. (2006). Effects of radiation therapy on chondrocytes in vitro. *Calcif. Tissue Int.* *78*, 302–313.
- Matsumoto, T., Iwasaki, K., and Sugihara, H. (1994). EFFECTS OF RADIATION ON CHONDROCYTES IN CULTURE. *Bone* *15*, 97–100.
- Mehrra, B.J., Avraham, T., Soares, M., Fernandez, J.G., Yan, A., Zampell, J.C., Andrade, V.P., Cordeiro, A.P., and Sorrento, C.M. (2010). p21(cip/WAF) is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. *Faseb J.* *24*, 4877–4888.
- Mezentsev, A., and Amundson, S.A. (2011). Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. *Radiat. Res.* *175*, 677–688.
- Miralbell, R., Lomax, A., Cella, L., and Schneider, U. (2002). Potential reduction of the incidence of radiation-induced second cancers by using proton beams in the treatment of pediatric tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *54*, 824–829.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y.W., and Murray, D. (2013). Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22409–22435.
- Mobasher, A., Matta, C., Zákány, R., and Musumeci, G. (2015). Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* *80*, 237–244.
- Monderer, D., Luseau, A., Bellec, A., David, E., Ponsolle, S., Saiagh, S., Bercegeay, S., Piloquet, P., Denis, M.G., Lodé, L., et al. (2013). New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *93*, 1100–1114.
- Moussavi-Harami, F., Mollano, A., Martin, J.A., Ayoob, A., Domann, F.E., Gitelis, S., and Buckwalter, J.A. (2006). Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *346*, 379–385.
- Muhonen, A., Säämänen, A.-M., Peltomäki, T., and Happonen, R.-P. (2006). The effect of irradiation and hyperbaric oxygenation (HBO) on extracellular matrix of the condylar cartilage after mandibular distraction osteogenesis in the rabbit. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* *35*, 79–87.
- Munzenrider, J.E., and Liebsch, N.J. (1999). Proton therapy for tumors of the skull base. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgenes. Al* *175 Suppl 2*, 57–63.
- Musumeci, G., Szyclinska, M.A., and Mobasher, A. (2015). Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol. Histopathol.* *30*, 1–12.
- Nawa, G., Ueda, T., Mori, S., Yoshikawa, H., Fukuda, H., Ishiguro, S., Funai, H., and Uchida, A. (1996). Prognostic significance of Ki67 (MIB1) proliferation index and p53 over-expression in chondrosarcomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *69*, 86–91.
- Newhauser, W.D., and Durante, M. (2011). Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 438–448.

- Nikoghosyan, A.V., Rauch, G., Münter, M.W., Jensen, A.D., Combs, S.E., Kieser, M., and Debus, J. (2010). Randomised trial of proton vs. carbon ion radiation therapy in patients with low and intermediate grade chondrosarcoma of the skull base, clinical phase III study. *BMC Cancer* *10*, 606.
- Noël, G., Feuvret, L., Ferrand, R., Boisserie, G., Mazon, J.-J., and Habrand, J.-L. (2004). Radiotherapeutic factors in the management of cervical-basal chordomas and chondrosarcomas. *Neurosurgery* *55*, 1252–1260; discussion 1260–1262.
- Nowakowski, V.A., Castro, J.R., Petti, P.L., Collier, J.M., Daftari, I., Ahn, D., Gauger, G., Gutin, P., Linstadt, D.E., and Phillips, T.L. (1992). Charged particle radiotherapy of paraspinal tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *22*, 295–303.
- Ollitrault, D., Legendre, F., Drougard, C., Briand, M., Benateau, H., Goux, D., Chajra, H., Poulain, L., Hartmann, D., Vivien, D., et al. (2014). BMP-2, Hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs Favor Neo-Cartilage Hyaline Matrix Formation in Chondrocytes. *Tissue Eng. Part C Methods*.
- Öncan, T., Demirağ, B., Ermutlu, C., Yalçinkaya, U., and Özkan, L. (2013). Effect of low-dose irradiation on structural and mechanical properties of hyaline cartilage-like fibrocartilage. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* *47*, 127–133.
- van Oosterwijk, J.G., de Jong, D., van Ruler, M., Hogendoorn, P.C.W., Dijkstra, P.D.S., van Rijswijk, C.S.P., Machado, I., Llombart-Bosch, A., Szuhai, K., and Bovee, J. (2012). Three new chondrosarcoma cell lines: one grade III conventional central chondrosarcoma and two dedifferentiated chondrosarcomas of bone. *Bmc Cancer* *12*, 10.
- Ostashevsky, J.Y. (1989). A model relating cell survival to DNA fragment loss and unrepaired double-strand breaks. *Radiat. Res.* *118*, 437–466.
- Panganiban, R.-A.M., Snow, A.L., and Day, R.M. (2013). Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 15931–15958.
- Park, H.J., Griffin, R.J., Hui, S., Levitt, S.H., and Song, C.W. (2012). Radiation-Induced Vascular Damage in Tumors: Implications of Vascular Damage in Ablative Hypofractionated Radiotherapy (SBRT and SRS). *Radiat. Res.* *177*, 311–327.
- Pateder, D.B., Eliseev, R.A., O’Keefe, R.J., Schwarz, E.M., Okunieff, P., Constine, L.S., Puzas, J.E., and Rosier, R.N. (2001). The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate. *Radiat. Res.* *155*, 847–857.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol. CB* *10*, 886–895.
- Perez, J., Decouvelaere, A.V., Pointecouteau, T., Pissaloux, D., Michot, J.P., Besse, A., Blay, J.Y., and Dutour, A. (2012). Inhibition of chondrosarcoma growth by mTOR inhibitor in an in vivo syngeneic rat model. *PLoS One* *7*, e32458.
- Pfander, D., Cramer, T., Schipani, E., and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J. Cell Sci.* *116*, 1819–1826.
- Pommier, P., Sunyach, M.-P., Hu, Y., Amsalem, E., Claude, L., Moncort-Boulch, D., Toutenu, P., and Balosso, J. (2010). [Radiotherapy for sarcoma: hadrontherapy, for whom and what for?]. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 657–672.

- Puck, T.T., and Marcus, P.I. (1955). A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE: THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *41*, 432–437.
- Rieken, S., Habermehl, D., Nikoghosyan, A., Jensen, A., Haberer, T., Jäkel, O., Münter, M.W., Welzel, T., Debus, J., and Combs, S.E. (2011). Assessment of early toxicity and response in patients treated with proton and carbon ion therapy at the Heidelberg ion therapy center using the raster scanning technique. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *81*, e793–e801.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* *192*, 547–556.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Roig, A.I., Hight, S.K., Minna, J.D., Shay, J.W., Rusek, A., and Story, M.D. (2010). DNA damage intensity in fibroblasts in a 3-dimensional collagen matrix correlates with the Bragg curve energy distribution of a high LET particle. *Int. J. Radiat. Biol.* *86*, 194–204.
- Romanov, V.S., Pospelov, V.A., and Pospelova, T.V. (2012). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochem. Biokhimiia* *77*, 575–584.
- Rombi, B., Ares, C., Hug, E.B., Schneider, R., Goitein, G., Staab, A., Albertini, F., Bolsi, A., Lomax, A.J., and Timmermann, B. (2013). Spot-scanning proton radiation therapy for pediatric chordoma and chondrosarcoma: clinical outcome of 26 patients treated at paul scherrer institute. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *86*, 578–584.
- Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M.J., and Monnat, R.J. (2002). Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6971–6978.
- Saintigny, Y., Cruet-Hennequart, S., Hamdi, D.H., Chevalier, F., and Lefaix, J.-L. (2015). Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage. *Radiat. Res.* *183*, 135–146.
- Sato, T., Niita, K., Matsuda, N., Hashimoto, S., Iwamoto, Y., Noda, S., Ogawa, T., Iwase, H., Nakashima, H., Fukahori, T., et al. (2013). Particle and Heavy Ion Transport code System, PHITS, version 2.52. *J. Nucl. Sci. Technol.* *50*, 913–923.
- Sawajiri, M., and Mizoe, J. (2003). Changes in bone volume after irradiation with carbon ions. *Radiat. Environ. Biophys.* *42*, 101–106.
- Sawajiri, M., Mizoe, J., and Tanimoto, K. (2003). Changes in osteoclasts after irradiation with carbon ion particles. *Radiat. Environ. Biophys.* *42*, 219–223.
- Sawajiri, M., Nomura, Y., Bhawal, U.K., Nishikiori, R., Okazaki, M., Mizoe, J., and Tanimoto, K. (2006). Different effects of carbon ion and gamma-irradiation on expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in MC3T3-E1 osteoblast cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* *142*, 618–624.
- Sawajiri, M., Takinami, S., Uchida, T., Nomura, Y., Mizoe, J., Banik, S., and Tanimoto, K. (2007). Expression of MMP-13 in osteoblast cells and rat tibia after exposure to gamma rays or accelerated carbon ions. *Phys. Med.* *23*, 73–79.
- Schardt, D., Elsässer, T., and Schulz-Ertner, D. (2010). Heavy-ion tumor therapy: Physical and radiobiological benefits. *Rev. Mod. Phys.* *82*, 383–425.

- Schaue, D., Kachikwu, E.L., and McBride, W.H. (2012). Cytokines in Radiobiological Responses: A Review. *Radiat. Res.* 178, 505–523.
- Schettino, G., Johnson, G.W., Marino, S.A., and Brenner, D.J. (2010). Development of a method for assessing non-targeted radiation damage in an artificial 3D human skin model. *Int. J. Radiat. Biol.* 86, 593–601.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., and Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15, 2865–2876.
- Schmid, T.E., Dollinger, G., Hable, V., Greubel, C., Zlobinskaya, O., Michalski, D., Molls, M., and Röper, B. (2010). Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20 MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 95, 66–72.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
- Schulz-Ertner, D., Jäkel, O., and Schlegel, W. (2006). Radiation therapy with charged particles. *Semin. Radiat. Oncol.* 16, 249–259.
- Schulz-Ertner, D., Nikoghosyan, A., Hof, H., Diding, B., Combs, S.E., Jäkel, O., Karger, C.P., Edler, L., and Debus, J. (2007). Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 67, 171–177.
- Sedelnikova, O.A., Nakamura, A., Kovalchuk, O., Koturbash, I., Mitchell, S.A., Marino, S.A., Brenner, D.J., and Bonner, W.M. (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* 67, 4295–4302.
- Sowa, M.B., Chrisler, W.B., Zens, K.D., Ashjian, E.J., and Opresko, L.K. (2010). Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 687, 78–83.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 4, 529–536.
- Storch, K., Eke, I., Borgmann, K., Krause, M., Richter, C., Becker, K., Schrock, E., and Cordes, N. (2010). Three-Dimensional Cell Growth Confers Radioresistance by Chromatin Density Modification. *Cancer Res.* 70, 3925–3934.
- Su, Y.R., Meador, J.A., Geard, C.R., and Balajee, A.S. (2010). Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Exp. Dermatol.* 19, E16–E22.
- Suit, H., DeLaney, T., Goldberg, S., Paganetti, H., Clasie, B., Gerweck, L., Niemierko, A., Hall, E., Flanz, J., Hallman, J., et al. (2010). Proton vs carbon ion beams in the definitive radiation treatment of cancer patients. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 95, 3–22.
- Suzuki, K., Nakashima, M., and Yamashita, S. (2010). Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue. *Radiat. Res.* 174, 415–423.
- Takahashi, T., Mizobuchi, H., Toda, M., Maeda, A., Mizuno, S., Ogawa, Y., Yoshida, S., and Yamamoto, H. (2003). Metabolic effects of X-ray irradiation on adult human articular chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* 11, 631–634.
- Tchetina, E.V., Kobayashi, M., Yasuda, T., Meijers, T., Pidoux, I., and Poole, A.R. (2007). Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of

- MMP-13 and collagenase activity: implications for development and arthritis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 26, 247–258.
- Thompson, L.H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 751, 158–246.
- Thoms, B.L., Dudek, K.A., Lafont, J.E., and Murphy, C.L. (2013). Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 65, 1302–1312.
- Toda, M., Takahashi, T., Kobayashi, T., Seguchi, H., Ogawa, Y., Yoshida, S., and Yamamoto, H. (2002). The role of apoptotic resistance in irradiated adult articular chondrocytes. *Int. J. Mol. Med.* 9, 349–352.
- Tsujii, H., and Kamada, T. (2012). A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 42, 670–685.
- Tuan, J., Vischioni, B., Fossati, P., Srivastava, A., Vitolo, V., Iannalfi, A., Fiore, M.R., Krengli, M., Mizoe, J.E., and Orecchia, R. (2013). Initial clinical experience with scanned proton beams at the Italian National Center for Hadrontherapy (CNAO). *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 54 Suppl 1, i31–i42.
- Tubiana, M., Averbek, D., Bourguignon, M., Bourhis, J., Cassiman, J.-J., Cosset, J.M., Favaudon, V., Gardès-Albert, M., Girinski, T., Gourmelon, P., et al. (2008). Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales (Hermann/Médecine).
- Uhl, M., Mattke, M., Welzel, T., Oelmann, J., Habl, G., Jensen, A.D., Ellerbrock, M., Haberer, T., Herfarth, K.K., and Debus, J. (2014). High control rate in patients with chondrosarcoma of the skull base after carbon ion therapy: first report of long-term results. *Cancer* 120, 1579–1585.
- Ulivi, V., Giannoni, P., Gentili, C., Cancedda, R., and Descalzi, F. (2008). p38/NF- κ B-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 104, 1393–1406.
- Upton, A., and Bond, V. (1980). NCRP Report No. 064 - Influence of Dose and Its Distribution in Time on Dose-Response Relationships for Low-LET Radiations.
- Varnum, S.M., Springer, D.L., Chaffee, M.E., Lien, K.A., Webb-Robertson, B.J.M., Waters, K.M., and Sacksteder, C.A. (2012). The Effects of Low-Dose Irradiation on Inflammatory Response Proteins in a 3D Reconstituted Human Skin Tissue Model. *Radiat. Res.* 178, 591–599.
- Wagner, T.D., Kobayashi, W., Dean, S., Goldberg, S.I., Kirsch, D.G., Suit, H.D., Hornicek, F.J., Pedlow, F.X., Raskin, K.A., Springfield, D.S., et al. (2009). Combination short-course preoperative irradiation, surgical resection, and reduced-field high-dose postoperative irradiation in the treatment of tumors involving the bone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73, 259–266.
- Wakatsuki, M., Magpayo, N., Kawamura, H., and Held, K.D. (2012). Differential Bystander Signaling Between Radioresistant Chondrosarcoma Cells and Fibroblasts After X-Ray, Proton, Iron Ion and Carbon Ion Exposures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84, E103–E108.
- Waters, K.M., Stenoien, D.L., Sowa, M.B., von Neubeck, C., Chrisler, W.B., Tan, R.M., Sontag, R.L., and Weber, T.J. (2013). Annexin A2 Modulates Radiation-Sensitive Transcriptional Programming and Cell Fate. *Radiat. Res.* 179, 53–61.
- Weber, U., and Kraft, G. (2009). Comparison of carbon ions versus protons. *Cancer J. Sudbury Mass* 15, 325–332.

- Weber, D.C., Badiyan, S., Malyapa, R., Albertini, F., Bolsi, A., Lomax, A.J., and Schneider, R. (2015). Long-term outcomes and prognostic factors of skull-base chondrosarcoma patients treated with pencil-beam scanning proton therapy at the Paul Scherrer Institute. *Neuro-Oncol.*
- Willey, J.S., Long, D.L., Vanderman, K.S., and Loeser, R.F. (2013). Ionizing radiation causes active degradation and reduces matrix synthesis in articular cartilage. *Int. J. Radiat. Biol.* 89, 268–277.
- Wilson, R.R. (1946). Radiological use of fast protons. *Radiology* 47, 487–491.
- Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 11, 393–410.
- Woodward, and White (1986). *Br. J. Radiol.* 59, 1216.
- Yanagi, T., Kamada, T., Tsuji, H., Imai, R., Serizawa, I., and Tsujii, H. (2010). Dose-volume histogram and dose-surface histogram analysis for skin reactions to carbon ion radiotherapy for bone and soft tissue sarcoma. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 95, 60–65.
- Yoshida, M., Yasuda, T., Hiramitsu, T., Ito, H., and Nakamura, T. (2008). Induction of apoptosis by anti-CD44 antibody in human chondrosarcoma cell line SW1353. *Biomed. Res.-Tokyo* 29, 47–52.
- Yunis, R., Albrecht, H., Kalanetra, K.M., Wu, S.Q., and Rocke, D.M. (2012). Genomic characterization of a three-dimensional skin model following exposure to ionizing radiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 53, 860–875.
- Ziegler, J.F., Biersack, J.P., and Littmark, U. (1984). The Stopping and Range of Ions in Solids,“ vol. 1 of series ”Stopping and Ranges of Ions in Matter. (Pergamon Press, New York),.

ANNEXE : FIGURES SUPPLEMENTAIRES

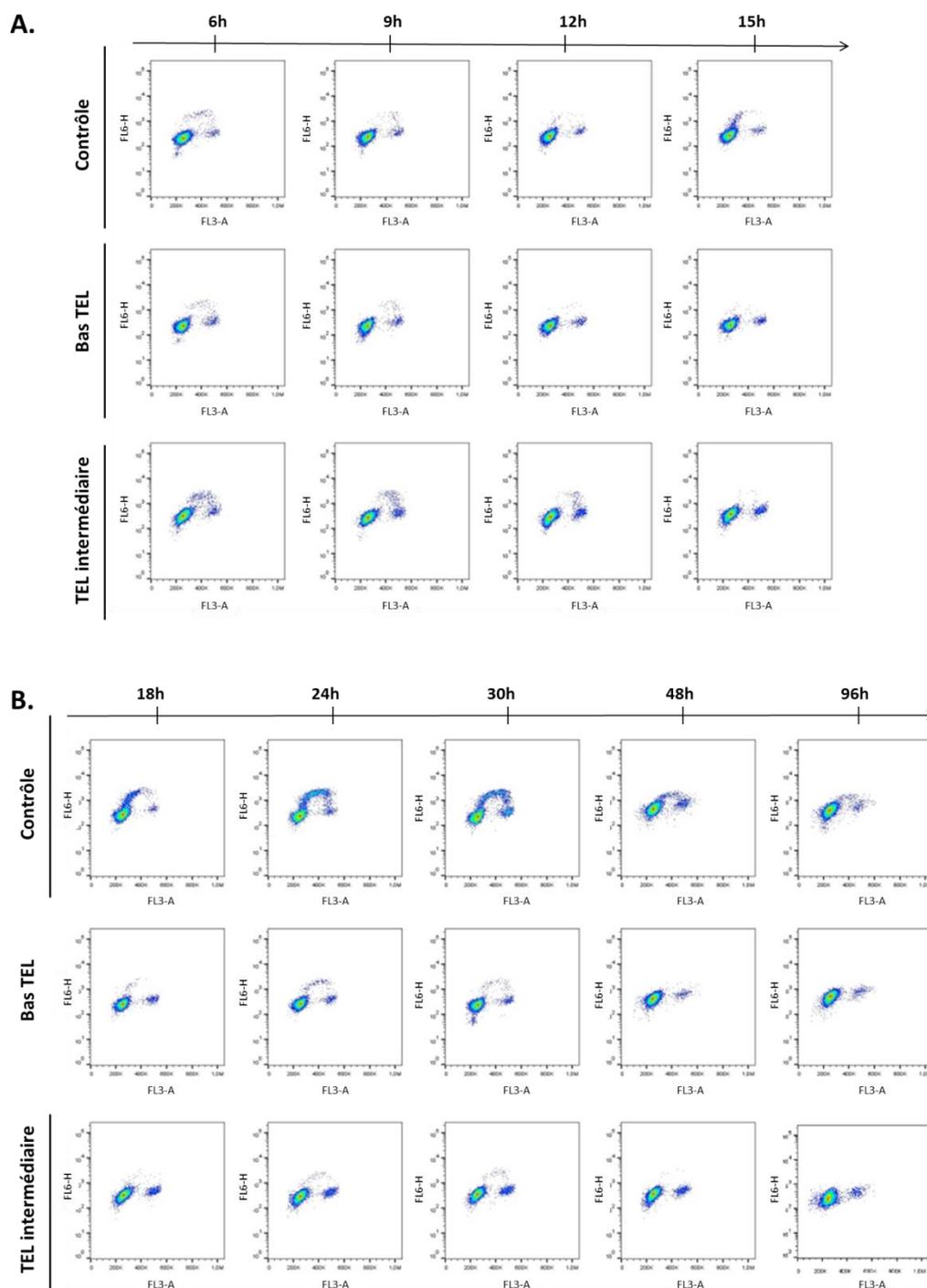


Figure suppl 1: Analyse du cycle cellulaire des CAH (D2) post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physiologique (marquage EdU)

Les cellules irradiées à confluence sont remises en culture pendant 6h à 96h. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux suite à un marquage à l'EdU et l'IP. Cette figure représente les plots obtenus après analyse au FACS aux temps indiqués (heures post-irradiation). L'abscisse (FL6-H) représente la fluorescence EdU et l'axe des ordonnées (FL3-A) correspond au marquage à l'IP (une seule expérience).

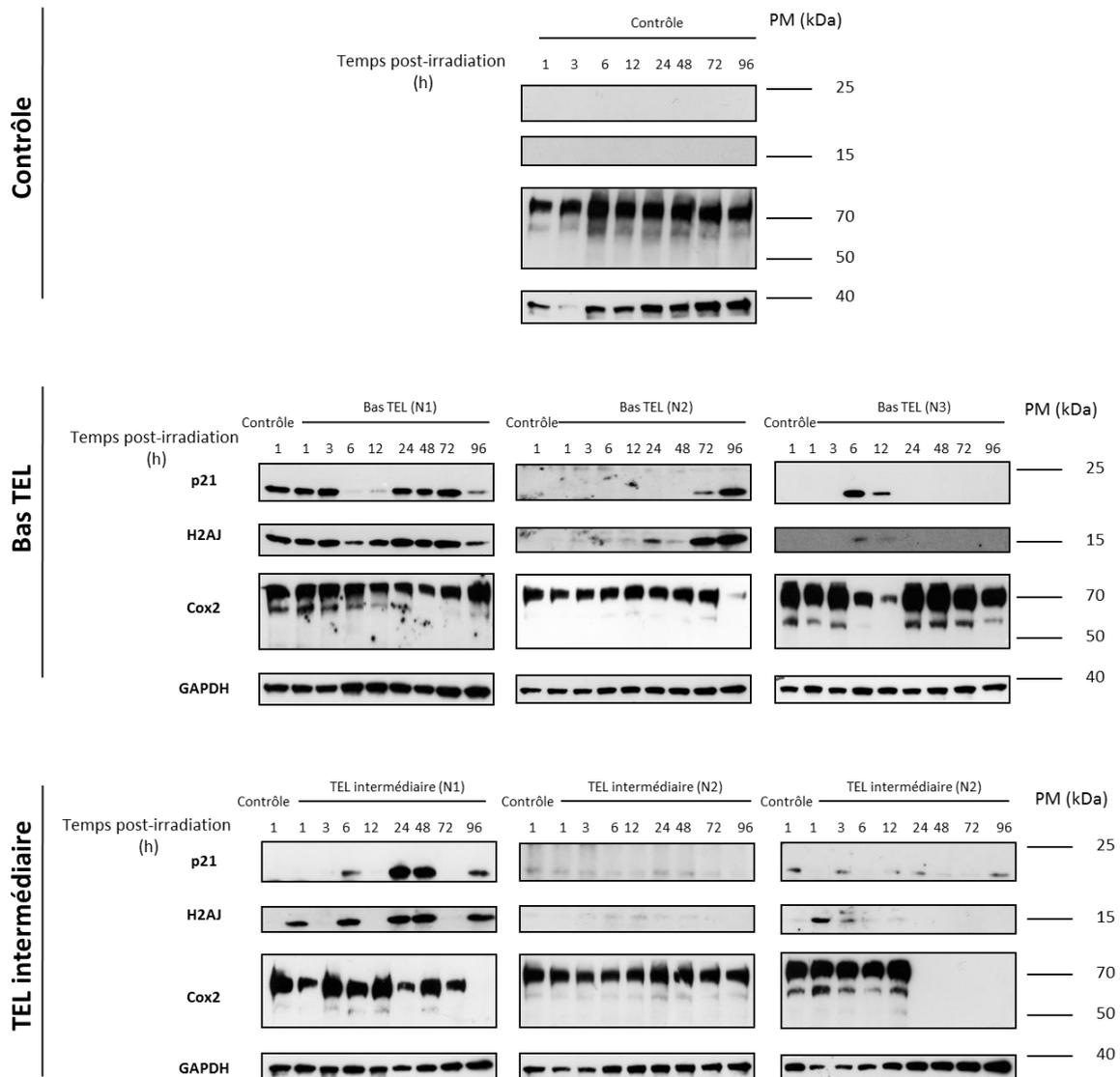


Figure suppl 2: Analyse western blot dans les M3DCa

L'expression de protéines d'intérêt dans la sénescence radio-induite du cartilage, H2AJ, COX-2 et p21 a été analysée dans les M3DCa entre 1h et 96h post-irradiation en bas TEL (panneau du milieu) ou en TEL intermédiaire (panneau du bas). Le contrôle non irradié est représenté dans le panneau du haut. La protéine GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

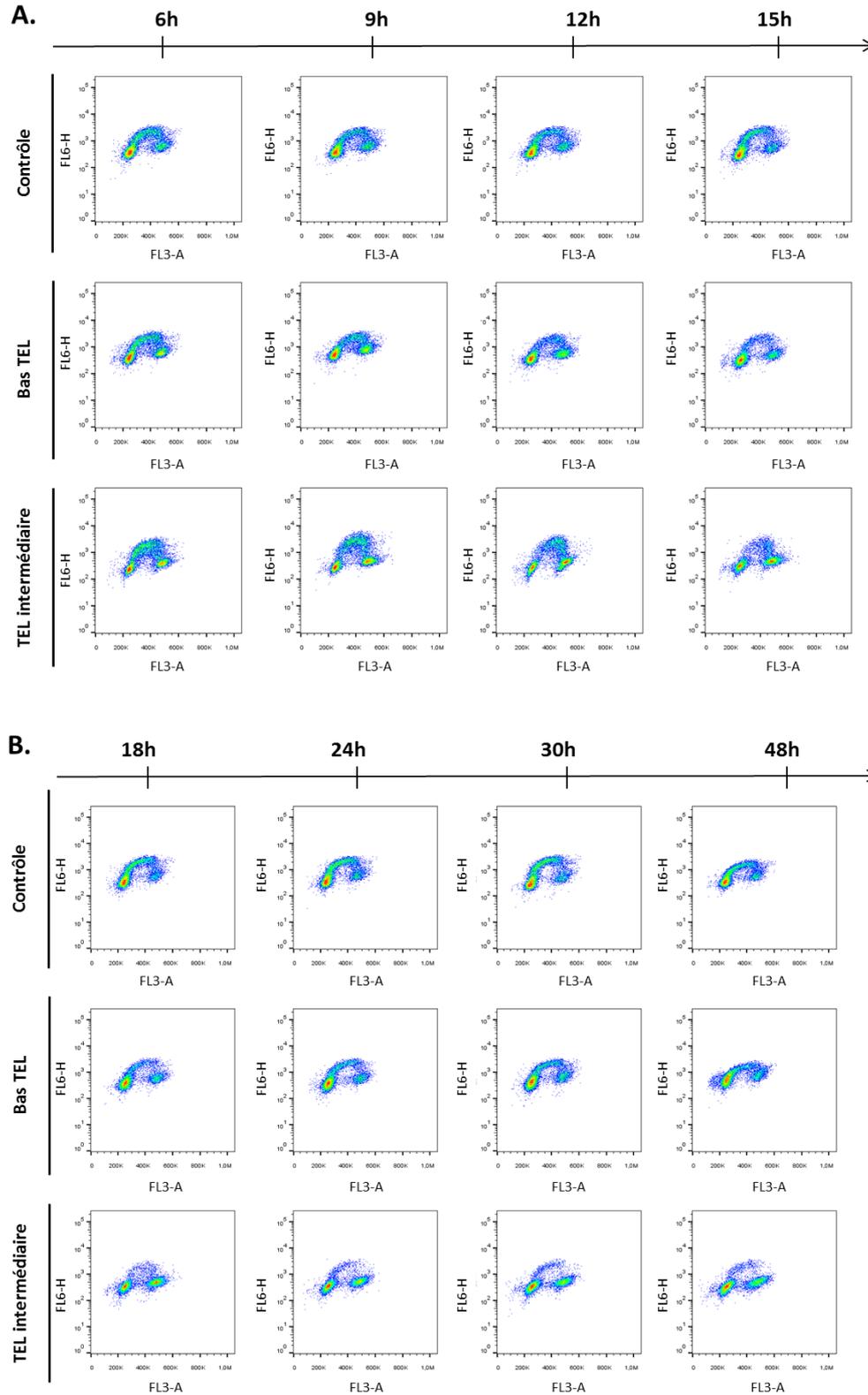


Figure suppl 3: Analyse du cycle cellulaire dans la lignée SW1353 post-irradiation (bas TEL et TEL intermédiaire) en culture 2D physioxique (marquage EdU)

Les cellules irradiées sont remises en culture pendant 6h à 96h. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux suite à un marquage à l'EdU et l'IP. La fluorescence émise par l'IP est représentée en abscisse (FL3-A) et la fluorescence de l'EdU en ordonnées (FL6-H).

LISTE DE PUBLICATIONS

Articles de revue internationale :

Hamdi DH, Chevalier F, Groetz JE, Durantel F, Thuret JY, Mann C, Saintigny Y. “*Comparable senescence induction in 3D human cartilage model by exposure to therapeutic doses of X-rays or C-ions*”. IJROBP (particle therapy special issue). Accepté le 3 février 2016. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.02.014

Hamdi DH, Barbieri S, Chevalier F, Groetz JE, Legendre F, Demoor F, Galéra P, Lefaix JL, Saintigny Y. “*In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact*”. BMC Cancer. 2015 Aug 8;15:579. doi: 10.1186/s12885-015-1590-5

Saintigny Y, Cruet-Hennequart S, **Hamdi DH**, Chevalier F, Lefaix JL. “*Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage*”. Radiat Res. 2015 Feb;183(2):135-46. doi: 10.1667/RR13928.1.

Chevalier F, **Hamdi DH**, Saintigny Y, Lefaix JL. “*Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects*”. Mutat Res Rev Mutat Res. 2015 Jan-Mar;763:280-93. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.11.008.

Présentation de poster :

Hamdi DH, Chevalier F, Lefaix JL, Saintigny Y. “*Analysis of targeted effects of ionizing radiations on reconstructed human healthy cartilage and chondrosarcoma*”

Radiation Research Society annual meeting, Las Vegas, USA, September 2014

Journées scientifiques de l'école doctorale de cancérologie, Roskoff, France, May 2014

Hamdi DH, Lefaix JL, Saintigny Y. “*In vitro engineering of a human 3D cartilage's model for conventional radiotherapy and hadrontherapy studies*”

International Workshop « Young Investigators » Radiobiology applied to Oncology, Lesponne, France, 3 au 6 avril 2013

International Summer Course « From 2D biology to engineered 3D medical solutions », Vipava, Slovénie, 23 au 31 août 2013

Communications orales :

Second DSV PhD Students Meeting, Porquerolles, France, 13 au 15 octobre 2013

CIMAP PhD Students Meeting, Caen, France, 2013-2014

REVIEW

Impact of Therapeutic Irradiation on Healthy Articular Cartilage

Yannick Saintigny,^{a,1} Séverine Cruet-Hennequart,^{a,b} Dounia Houria Hamdi,^a François Chevalier^a
and Jean-Louis Lefaix^a

^a LARIA – IRCM – DSV – Commissariat à l’Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Caen, France; and ^b EA4652 - Microenvironnement Cellulaire et Pathologie, Université Caen Basse-Normandie, Caen, France

Saintigny, Y., Cruet-Hennequart, S., Hamdi, D. H., Chevalier, F. and Lefaix, J.-L. Impact of Therapeutic Irradiation on Healthy Articular Cartilage. *Radiat. Res.* **183**, 135–146 (2015).

Radiation-induced complications in bone and cartilage are of increasing concern due to potential long-term effects in cancer survivors. Healthy articular cartilage may be exposed to radiation during either chondrosarcoma treatment or in-field radiotherapy of tumors located in close proximity to articulation. Cartilage exposed to radiation undergoes bone differentiation and senescence, which can lead to painful and disabling sequelae that can impair patient quality of life. An understanding of the biological processes involved in healthy cartilage response to radiotherapy may not only optimize the delivery of therapeutic radiation but also reduce the risk of long-term sequelae in irradiated cartilage. Over the last few decades, radiobiology studies have focused primarily on signaling and repair of DNA damage pathways induced by ionizing radiation in immortalized cells under conditions dramatically different from human homeostasis. This research needs to be continued and broadened, since the range of normal tissue responses to radiation exposure is still not fully understood, despite being recognized as the major limiting factor in the rupture of tissue homeostasis after radiotherapy. Human articular cartilage is an avascular tissue with low intracellular oxygen levels and is comprised of a single cell lineage of chondrocytes embedded in a highly dense and structured extracellular matrix. These relatively unique features may impact inherent cell radiation sensitivity and suggests that canonical cell responses to ionizing radiation may not be applicable to articular cartilage. Despite the number of studies in this field, radiation-induced modifications of chondrocyte proteome remain unclear because of the dramatic variability in reported experimental conditions. In this review, we propose to introduce cartilage tissue physiology and microenvironment concepts, and then present a comprehensive synthesis of cartilage radiation biology. © 2015

by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Healthy tissue preservation and patient recovery with minimal sequelae are key end points in modern approaches to radiation therapy of cancer. Radiation-induced complications in bone and growing cartilage remain a considerable concern due to the subsequent potentially significant morbidity in both pediatric and adult patients (1–3). Such complications have led to a renewed interest in the radiosensitivity of cartilage and bone. Chondrosarcoma is a malignant skeletal tumor with cartilaginous differentiation (making it distinct from other primary skeletal tumors). Chondrosarcoma is considered to be chemo- and radiation-resistant, and these tumors require high-dose irradiation especially in chondrosarcoma that are inoperable or only partially resected. Furthermore, radiation treatment in pediatric patients remains an established adjuvant therapy to surgical excision for soft tissue sarcomas and is an alternative to surgery for Ewing’s sarcoma. High-dose irradiation on healthy cartilage surrounding tumors may lead to severe complications that impair patient quality of life, such as the premature closure of the active growth plate and subsequent defects in bone formation and growth of the adolescent skeleton (4).

Normal linear growth of the skeleton is mediated through the process of endochondral ossification that occurs at epiphyseal growth plates. The transforming growth factor-beta family (TGF- β), fibroblast growth factor family (FGF) and insulin-like growth factor (IGF) are now considered to be key regulators of chondrocyte proliferation, while other factors such as bone morphogenetic proteins (BMPs) and thyroid hormone regulate terminal differentiation. Despite the importance of these factors, parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) has emerged as a central regulator of chondrocyte differentiation rate, controlling the transition from proliferating to hypertrophic chondrocytes (5–7). Disruption of these regulatory mechanisms may be associated with profound disturbances in skeletal growth and development.

Preventing radiation-induced complications has led to a renewed interest in understanding the specific effects of

¹ Address for correspondence: LARIA, Commissariat à l’Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Bd Henri Becquerel, BP 55027, 14076 Caen cedex 05, France; e-mail: yannick.saintigny@cea.fr.

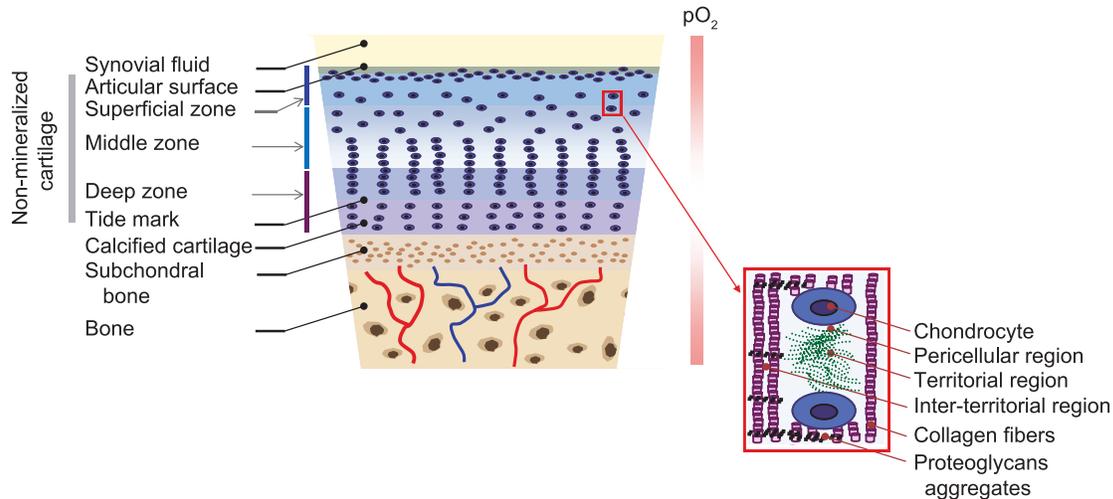


FIG. 1. Human articular cartilage. From cartilage surface to bone (97), the superficial zone (10% of the total cartilage height) contains fine collagen fibrils with tangential orientation, low proteoglycan and elongated chondrocytes with the same orientation as collagen fibrils. The middle zone, which represents 60% of the total cartilage height, is shaped by proteoglycans and thicker collagen fibrils organized into layers with low cellularity. The deep zone contains the largest collagen fibrils and the highest aggrecan content. Chondrocytes are aligned perpendicular to the articular surface with the lowest pO₂. The layer of calcified cartilage and the subchondral bone represent relatively thin strata supporting tissue below hyaline articular cartilage.

irradiation on cartilage. Although there has been an increase in published articles on chondrocyte radiosensitivity over the last few decades, we found less than 60 articles on chondrocyte irradiation both *in vitro* and *in vivo*, and of these only a few articles were primarily about irradiation of adult human articular chondrocytes of primary cell cultures or from degenerated cartilage. Therefore, most of the cartilage models presented are difficult to compare owing to: 1. the heterogeneous biological end points and/or sensitivity levels of the methods used; 2. low kilo- versus mega-voltage X-ray irradiation conditions; 3. the number of short-term studies after single high doses compared to studies done several weeks after fractionated irradiations; and 4. the low number of patient based studies compared to *in vivo* or *in vitro* experiments.

In this review, we explore the physiology of healthy and mature articular cartilage and the consequences of medical irradiation.

ONE CARTILAGE DOES NOT FIT ALL JOINTS

A wide variety of cartilages and cartilage-like tissues has been found both in vertebrates and invertebrates and has been classified on the basis of the relative amount of extracellular matrix, cell density and other specific components (8). In mammals, three classic types of cartilage have been histologically identified based on the relative contribution and distribution of fibers within the extracellular matrix: 1. hyaline cartilage (articular cartilage), which is the typical cartilage; 2. elastic cartilage (outer ear cartilage), which contains additional elastin fibers; and 3. fibrocartilage (meniscus), which contains regions of organized fibrous tissue within the extracellular matrix (9).

Hyaline cartilage is the most studied cartilaginous tissue, due to its developmental importance in laying down scaffold for most of the bones, and the fact that cartilage is retained at the joint interfaces and is the primary tissue affected in arthritis. It is a specialized, avascular, aneural connective tissue that provides covering for the osseous components of diarthrodial joints (10), and serves as a load-bearing material, that both absorbs impact and is capable of sustaining shearing forces. The unique properties of hyaline cartilage are related to the composition and structure of its extracellular matrix, which is a well-hydrated network of proteoglycans, glycosaminoglycans, glycoproteins (aggrecan complex) and cartilage-specific collagens (10). Although it does not directly absorb the load placed on the joint, cartilage deforms during joint loading. As the load is removed from the joint, water that was squeezed out during loading is attracted back in by the highly negatively charged, hydrophilic aggrecan (9, 10). This tissue allows the frictionless motion of the joint, in which it absorbs and dissipates load. Hyaline cartilage homeostasis can functionally be defined as the condition where a normal matrix composition deals with mechanical stress without structural or cellular damage. Articular cartilage has a highly organized structure composed of four zones: superficial, intermediate, radial and calcified cartilage (Fig. 1) (9).

Mature cartilage is composed of a dense extracellular matrix and a sparse population of differentiated chondrocytes but with phenotypes differing in the superficial, middle, deep and calcified zones (11). However, recent studies have shown that adult human articular cartilage contains cells expressing putative stem cell and progenitor markers CD90 and CD166 (12) with the capacity to

differentiate into mature articular chondrocytes, not only at the superficial zone of articular cartilage, but also in deeper zones (Fig. 1) suggesting that mesenchymal stem cells (MSCs) persist in mature cartilages and represent up to 3.5% of the constituent cells (13) and contribute to the local repair of micro-lesions (14).

In summary, mature articular cartilage is an avascular tissue composed mainly of dense extracellular matrix and chondrocytes, whose key physiological roles are to enable frictionless motion and absorb load.

ARTICULAR CARTILAGES ARE MADE OF CHONDROCYTES EMBEDDED IN EXTRACELLULAR MATRIX: TWO INTERDEPENDENT COMPONENTS FOR HOMEOSTASIS

Cartilage has been defined as a dense and elastic connective tissue, which is part of the skeletal system that is different from mineralized bone, both in function and histological composition. Cartilage is an internal support tissue with a high proportion of fibrous proteins and mucopolysaccharide (8). Cartilage is formed during development, through defined phases including cell differentiation, condensation of undifferentiated mesenchymal cells (15), cartilage anlage, protocartilage formation and cartilage/bone differentiation (16, 17). This simplified model should not minimize our appreciation of the complexity of cartilage maturation. Cartilage development involves a series of multifaceted and strictly regulated events, encompassing condensation of mesenchymal chondroprogenitor cells, differentiation into chondrocytes, cell proliferation and the patterning of chondrifying tissues into skeletal structures. Moreover, during the process of endochondral ossification, embryonic precartilage serves as an initial anlage element and then is ultimately replaced by invading osteoblasts to form bone (9).

The Extracellular Matrix: More than a Simple Protein Bulk

A part of the extracellular matrix of cartilage is composed of hyaline macromolecules organized to give tensile strength and rigidity. These allow cartilage to resist stresses that endow it with compressive stiffness, elastic properties and lubrication at its surface. Molecular components are highly ordered from the cartilage surface to the deepest layers (Fig. 1) and provide the chondrocyte-specific microenvironment. The nature of the extracellular matrix in adult articular cartilage depends on chondrocyte location. Chondrocytes are surrounded by a pericellular matrix covered by a territorial matrix. These two matrix layers bind chondrocytes to the interterritorial matrix and protect against potential cartilage injuries (Fig. 1). The interterritorial matrix fills the cell-free matrix space and occupies the greatest volume in cartilage. Chondrocytes are anchored to the extracellular matrix by proteoglycans and membrane proteins such as syndecan or glypicans (14). Moreover,

mature chondrocytes produce abundant extracellular proteins such as collagen (60% of dry weight, 80% from type II), proteoglycans (5–10%, including aggrecan) and non-collagenous proteins (9, 10, 14). Furthermore, 65–80% of the extracellular matrix is composed of water, and its dry weight represents only 20–40% of cartilage volume. Interactions between the extracellular matrix and mature chondrocytes increase with chondrogenesis progression. In fact, cell-to-cell interactions by adhesion molecules such as N-cadherin and N-CAM are involved in cellular condensation and subsequent chondrogenesis (18, 19). The extracellular matrix is also involved in the regulation of chondrogenesis through binding, storage and release of soluble factors. For example, most FGFs bind to heparan sulfate proteoglycans and bind to FGFRs in the context of heparan sulfate proteoglycans to trigger signal transduction. Analysis of mice lacking sulfate-modifying factor 1 (Sumf1) has suggested that the desulfation of proteoglycans regulates chondrocyte proliferation and differentiation by limiting FGF signaling (19). The extracellular matrix is an extremely organized microenvironment ordered in multiple layers (Fig. 1) produced and regulated by embedded chondrocytes. Cartilage irradiation would impair such homeostasis.

Chondrocytes: From Mesenchymal Stem Cells to Endochondral Ossification

Chondrocytes of adult articular cartilage are large, round cells that produce mainly type II collagen and aggrecan, which are the two major phenotypic markers of articular cartilage (14). Differentiated chondrocytes in mature articular cartilage are not organized in columns, as those found in the growth plate of long bones. These cells show neither division nor apoptotic activity in healthy cartilage. Therefore, adult articular cartilage has a low turnover rate and a very limited ability for self-repair. Chondrocytes represent only 1–2% of the total cartilage volume (10). Since articular cartilage is avascularized, chondrocytes have a relatively hypoxic metabolism where nutrients and oxygen are supplied to the cells by diffusion from the synovial fluid and subchondral bone. From the most superficial to the deepest layers, oxygen gradient is estimated to be from 10% to 1%, respectively (14, 20).

Several growth differentiation and transcription factors are involved at different specific stages of cartilage development (21). The differentiation of MSCs into mature chondrocytes and in hypertrophic chondrocytes requires a very precise combination of these factors (14). The process of cell differentiation implies a constant change in the local microenvironment to guide the cells (22). The condensation of MSCs into chondrocytes is initiated by TGF- β 1 by stimulating fibronectin and N-cadherin synthesis to promote cell interactions and increase in extracellular matrix production (14). Members of the BMP family induce the differentiation into mature chondrocytes, as well as the

differentiation of proliferative chondrocytes into hypertrophic chondrocytes. In chondrocytes, TGF- β increases BMP-induced signaling, while BMP-2 levels are decreased by TGF- β induction (14).

A complex transcriptional network also governs the process of chondrogenesis to terminal differentiation. Sox9 has been the most extensively studied transcription factor involved in chondrogenesis. Expression of Sox9 begins at the mesenchymal chondroprogenitor stage and transactivates several genes specific to chondrocyte proliferation, including many cartilage extracellular matrix genes as *Col2a1* encoding type II collagen, and genes for extracellular matrix modification enzymes, membrane receptors and transporters (23, 24). Recently, a Sox9-specific consensus-binding motif was detected in the genome of chondrocytes displaying an interaction as a homodimer with an inverted DNA repeat motif (23). Thus, Sox9 is both required and sufficient for chondrocyte differentiation. Furthermore, Sox5 and Sox6 have been found to act in redundancy with each other to enhance Sox9 functions (24). The transcription factor (ATF)/cyclic AMP response element binding protein (CREB) family and the AP1 family member c-Fos are also required to maintain the proliferative capacity of early chondrocytes (19). Hypertrophic maturation of chondrocytes requires Runt domain family transcription factors (Runx2 and Runx3), as well as a decrease in the expression and/or activity of Sox proteins. Multiple hormones also play a role in chondrogenesis, especially during chondrocyte hypertrophy as the parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), triiodothyronine (T3) or Indian hedgehog (Ihh) (25).

Furthermore, recent studies have established that epigenetic mechanisms are involved in chondrogenesis. For instance, the histone deacetylase HDAC4 has been shown to prevent premature chondrocyte hypertrophy by inhibiting the activity of Runx2/3 and Mef2c/d transcription factors, suggesting that histone modification influences the process of endochondral bone formation (19, 26). Moreover, DNA methylation could also be involved in the regulation of cartilage-specific genes. For example, the demethylation of two CpG sites in the *COL10A1* promoter have been shown to be correlated with induction of the *COL10A1* gene during chondrogenic differentiation of human MSCs (27).

Mature cartilage homeostasis is mostly regulated by the NAD-dependent protein deacetylase SirT1 by controlling expression of aggrecan or collagen type II (28). However, SirT1 may also act in anti-inflammatory processes by regulating expression of various inflammatory-responsive genes and mediating chondrocyte survival through its association with cytochrome C to control apoptosome assembly (28, 29).

MicroRNAs (miRNAs) play key roles in diverse regulatory pathways, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, and many other physiological and pathological processes. However, while the precise roles of miRNAs in cartilage biology are largely unknown,

several published studies have suggested a possible role in cartilage development (30, 26). In dicer-null mice, a reduced proliferating pool of chondrocytes was observed, and the expression of several miRNAs, including miR-10b and miR-196 was detected during cartilage maturation. Moreover, a recent study showed that miR-9 regulation was involved in inhibition of cell proliferation and survival in chondrogenic progenitors and articular chondrocytes (31). In a recent review, more than 25 miRNAs were implicated in various steps of chondrogenesis, including chondrocytogenesis, chondrogenic differentiation or chondrocyte proliferation (32).

In summary, mature articular chondrocytes are heavily regulated cells involved in multiple pathways for maintaining cartilage homeostasis. Exposure of such regulated but very low self-renewable tissue during radiation therapy may lead to permanent defects that could restrict cartilage motion.

Crosstalk between Chondrocytes and Extracellular Matrix

The mechanisms that regulate chondrogenic differentiation include both autonomous (stem-cell intrinsic) and non-cell-autonomous (microenvironmental) components (22). Chondrocytes do not directly interact with each other but are linked to the extracellular matrix by surface receptors such as integrins. Moreover, extracellular matrix molecules, such as proteoglycans or fibulins, connective tissue growth factors (CTGF) and molecules with a disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) have also been shown to play a crucial role in chondrogenesis. In fact, cell-matrix interactions are plethoric, depending on the integrin receptors expressed by the cell and the composition of the surrounding extracellular matrix (22). Furthermore, chondrocyte anabolic and/or catabolic activities are directly affected by cellular microenvironment in several ways, including: 1. soluble factors (vitamins, hormones, cytokines, growth factors, inflammation and differentiation factors); 2. oxygen levels; 3. anchoring to the tridimensional matrix; and 4. mechanical stress (9, 10, 33). Altered microenvironments change metabolic activities of chondrocytes, ultimately leading to cartilage destruction or achondrocytic formation of extracellular matrix.

Mechanical properties of cartilage are dynamically altered during the progression of osteoarthritis due to imbalanced matrix turnover (greater matrix degradation versus synthesis) and noncartilaginous extracellular matrix formation (18, 33). Increase in local matrix stiffness due to extracellular matrix modifications appears to suppress chondrocytic activities of the cells. Recent studies show that chondrocytes sense the stiffness of the matrix and differentially respond to it by altering their phenotype, resulting in production of different types of extracellular matrix (33). Such an impact of matrix stiffness on modulating chondrogenic phenotype has been shown to occur through the regulation of the TGF- β signaling pathway (34). Moreover, the mechanosensitive

behavior of chondrocytes may explain that typical *in vitro* 2D culture results in chondrocytes dedifferentiation (35).

Chondrocytes elaborate, and then maintain the matrix components under normal, low-turnover conditions in which the glycosaminoglycans or proteoglycans and other noncollagenous molecules can be replaced. These cells can produce cytokines, chemokines, alarmins, prostanoids and adipokines and express numerous cell surface receptors for cytokines and chemokines, as well as receptors involved in inflammatory and stress responses (9, 10). In spite of this apparently simple structure, articular cartilage is a complex tissue showing different matrix composition and cellular organization depending on the differentiation step or the physiology/pathology stage.

In summary, chondrocytes differentiation and proliferation are controlled by extracellular matrix but also some of their metabolic activities. Extracellular matrix degradation by radiation exposure may influence chondrocyte survival.

IRRADIATION OF MATURE ARTICULAR CARTILAGE: IMPACTS AND REPAIRS

Early studies have been undertaken to investigate the molecular mechanisms involved in radiation-induced growth arrest of bone, with emphasis on the effect of irradiation on the balance between anabolic and catabolic processes regulating extracellular matrix synthesis in chondrocytes. These studies have considered the effects of ionizing radiation on the amount of matrix synthesized postirradiation using metabolic labeling: [³H]proline for collagen neo-synthesis and [3H]glucosamine for glucosaminoglycans synthesis (36). Cornelissen (37) and De Craemer (38) described, using a model of tibia from chick embryo, that synthesis of the matrix of collagen and proteoglycan is a radiation-resistant process. A single dose of radiation up to 150 Gy had limited effect on *in vitro* matrix synthesis of embryonic cartilage, 3 days after irradiation, and no difference in lengthening of the irradiated tibiae compared with the nonirradiated one was observed (38). Moreover, immediate radiation effects on extracellular matrix synthesis were minimal after two days, while marked decrease in glycosaminoglycan synthesis was observed 4 and 7 days after irradiation (37). However, cartilage glycosaminoglycan synthesis was reduced compared to nonirradiated cartilage, 24 h after 10–500 Gy doses of radiation in a model of normal canine articular cartilage (39). Inhibition of chondrogenesis measured using cartilage nodule production and Alcian blue staining, was observed in the first two days after irradiation of embryonic limb bud cells (40). From these early studies, the effects of radiation exposure on matrix synthesis seem to differ depending on models and postirradiation times.

More recent studies have focused on the disturbance of the endochondral ossification, which seems to be the underlying problem causing aberrations in long bone

growth after radiotherapy. Endochondral ossification involves phenotypic changes in the proliferation and maturation of growth plate chondrocytes and in mineralization of the cartilaginous matrix. Epiphyseal growth plates of irradiated mice show disorganization of the columnar structure, loss of proliferative zone and chondrocytes undergoing premature terminal differentiation and cell death (41). Studies emphasize a critical role of PTHrP and Ihh, involved in chondrocyte differentiation rate and transition from proliferating to hypertrophic chondrocytes control (5–7, 42). In 2001, in an *in vitro* model of cartilage growth plate, Pateder and colleagues (43) reported that radiation inhibited the mRNA levels of PTHrP and PTHrP receptor without affecting other mitogenic growth factors, including FGF2 and TGF- β . They also proposed that the increase in cytosolic calcium levels after irradiation may be responsible for the deleterious effects of radiation on chondrocyte growth plate by suppression of PTHrP signaling. In addition, they measured proteoglycan synthesis 24 h after irradiation, and found that this extracellular matrix component was not significantly affected up to 20 Gy and was suppressed only at clinically irrelevant single doses of 100 Gy (43). These results suggest that deleterious effects of radiation exposure on the growth plate may be due to loss of proliferative signals rather than matrix synthesis disturbance. Furthermore, in their study, cell cycle analysis showed a dose-dependent accumulation of cells in G₀/G₁, suggesting that irradiation may channel chondrocytes into a more mature, differentiated phenotype. Increased alkaline phosphatase activity and expression of Ihh and FGF-2, associated with a decrease of PTHrP, 72 h after 10 Gy of irradiation further suggested that radiation exposure induced premature induction of chondrocyte maturation/differentiation (44, 45). These authors also proposed that an increase in type II collagen might be linked to radiation-induced changes in oxygen concentrations, leading to increase in prolyl-4-hydroxylase (P4h), an enzyme known to regulate collagen expression. Moreover, it has been suggested that oxygen-derived free radicals induced by irradiation (ROS) suppress proteoglycan synthesis (46, 47).

The effect of radiation exposure (single doses from 0–20 Gy) on proliferative chondrocytes was analyzed *in vitro* with a model of cartilage from rat costochondral growth plate (44). Alterations in proliferation, cellular differentiation, cell death and induction of apoptosis were described. These authors also reported that the PTHrP/Ihh proliferation/maturation pathway is involved in early recovery of growth plate chondrocytes after fractionated irradiation (48, 49). In fact, in those studies Damron and colleagues have produced an extensive and major contribution to the understanding of postirradiation growth cartilage fate and pediatric bone sequelae. However, these data are not necessarily relevant to mature articular cartilage where spatial distribution of cells is clearly different, and where differentiated chondrocytes are no longer proliferating cells.

Effect of Irradiation on Cartilage Maturation

Fuchihata *et al.* (50) developed a rabbit chondrocyte culture system in which sequential processes of differentiation can be reproduced, with immature chondrocytes, differentiated mature chondrocytes and hypertrophic chondrocytes, respectively, 4 days, 8 days and 15 days after seeding on type I collagen coated plates (51). Exposure to X rays from 1–10 Gy was shown to selectively disturb the metabolism of proteoglycan synthesis without affecting collagen II metabolism up to 10 days after irradiation (50). Irradiation at the immature stage caused an inhibition of proteoglycan synthesis in both growth plate and articular chondrocytes, while irradiation no longer influenced proteoglycan synthesis in either type when mature chondrocytes were irradiated. These results suggest that irradiation of growing cells can induce disturbance of endochondral bone formation and articular formation through abnormal proteoglycan metabolism. Chondrocytes irradiation not only inhibited proteoglycan synthesis but also enhanced proteoglycan degradation. Since no increase in MMP activity was observed, the authors suggested that proteoglycan degradation might be due to free radicals induced by irradiation (52). Since free radicals also suppress proteoglycan synthesis, irradiation effect on proteoglycan synthesis might also reflect effects of oxygen-derived free radicals (46). Moreover, a dose of 10 Gy of X rays on premature chondrocytes completely suppressed mineralization and terminal differentiation (51). Inhibition of calcium deposition in premature chondrocytes after irradiation was strongly associated with a decrease in alkaline phosphatase activity and type X collagen synthesis. Both inhibition of alkaline phosphatase activity and type X collagen synthesis could explain lower mineralization, since both play a role in initiating mineral deposition (53). The inhibitory effect of irradiation on mineralization is weaker when irradiation is applied to mature or hypertrophic chondrocytes, than to premature chondrocytes. Both mineralization and alkaline phosphatase activity were reduced in mature chondrocytes while type X collagen synthesis was unchanged. In hypertrophic chondrocytes, only alkaline phosphatase activity was inhibited while mineralization and type X collagen synthesis were not affected by radiation exposure. Overall, irradiation of the growth plate seems to impair not only cell replication but also terminal differentiation and mineralization. All together, these results show differential sensitivity of articular chondrocytes according to their differentiation stage at the time of irradiation. Articular chondrocytes have reached a high level of differentiation, while in the growth plate, chondrocytes exist at various stages of differentiation according to their localization in reserve zone, proliferative zone and hypertrophic zone. From these studies, growth plate chondrocytes sensitivity to low-LET radiation depends on their differentiation level, while articular chondrocytes are not as sensitive. Moreover, using chondrocytes from rabbit articular cartilage cultured

in monolayer or in pellets with matrix (three-dimensional culture), Matsumoto and colleagues show a direct effect of single dose X irradiation at either 2 or 10 Gy on both DNA and glycosaminoglycan synthesis (54). After 2 Gy exposure, DNA synthesis is temporarily suppressed while it is definitively suppressed at 10 Gy exposure. Furthermore, glycosaminoglycan synthesis is not affected by a single radiation dose at either 2 or 10 Gy, nor did glycosaminoglycan content decrease in the three-dimensional tube cultures. These results show that low-LET radiations affect chondrocytes proliferation and differentiation pathways differently, and that synthesis of extracellular matrix may be relatively more radioresistant than DNA synthesis (54). Cartilage irradiation with high-LET (RBE > 1) particle may dramatically increase biological effect even on articular differentiated chondrocytes.

Chondrocyte Survival and Repair Pathways upon Irradiation

The linear-quadratic formalism (LQ) cell survival modeling (LQ: $\text{Ln}S = \alpha d + \beta d^2$; S: survival; d: dose) provides a method to quantitatively describe the dose response to radiation exposure in terms of colony forming efficiency survival (CFE, clonogenic survival) where the α/β ratio is used to estimate the effects of radiation on various tissues and compare various dose and fractionation schemes (55). The initial slope of cell survival curves and the effectiveness at low doses is determined by alpha, while beta represents the increasing contribution from cumulative damages, presumably due to the interaction of two or more lesions induced by separate ionizing radiations. The α/β ratio represents the dose at which the two terms contribute equally to the total effect of a given radiation dose. However, it is now well known that the regular LQ model fit of clonogenic survival should be limited to doses between 1–6 Gy. Thus, doses not included in this interval may not be accurately described by the LQ model and may compromise the surviving slope fit (56).

Very few studies have been published on survival of articular chondrocytes after ionizing radiation exposure. A pioneer study from Toda *et al.* shows a dose-dependent increase of apoptosis only in chondrocytes issued from degenerated cartilage (osteoarthritis) but not for nondegenerated chondrocytes (57). Apoptosis induction was not observed 48 h after gamma irradiation up to 10 Gy in these experimental conditions, while apoptosis was measured at 24 and 72 h after X irradiation in the model of growth plate rat chondrocytes (44). This discrepancy between chondrocyte from bone growth plate and articular cartilage emphasizes the necessary caution needed when it comes to comparing data from cartilage studies. The absence of apoptosis induction after irradiation of normal articular chondrocytes was then confirmed by other studies, which showed no or low apoptosis induction after gamma irradiation up to 5 Gy (58) or 10 Gy (59) or X irradiation up to 30 Gy (60, 61).

Interestingly, the conversion of LC3-I to LC3-II, a hallmark of mammalian autophagy, was also not induced in chondrocytes that were X-ray irradiated up to 10 Gy (62). Since clonogenic survival assays showed a strong dose-dependent effect after irradiation, we suggest that mitotic catastrophe might be involved in normal chondrocytes survival, rather than programmed cell death or autophagy.

A recent study has shown that p53 accumulation and phosphorylation (Ser-15), and p21 activation were measurable in articular chondrocytes after a 10 Gy dose of X rays. Moreover, induction of p16 activation of pRb and induction of senescence were found (62). Other investigators have shown, radiation exposure activates p38 in degenerated chondrocytes but not in normal chondrocytes (60). MAP kinases, such as p38 have been implicated in chondrocyte proliferation, cartilage matrix remodeling (synthesis and/or degradation) and cell death in adult articular cartilage (63). Taken together, these results suggest that it may be important to evaluate arthritic degree of cartilage localized in the radiation therapy field to prevent worsening of osteoarthritis.

Epigenetic Modification of Chondrocyte Genome after Irradiation

Epigenetic control mechanisms involve modifications of chromatin, such as DNA methylation and histone modifications. In normal articular chondrocytes, extracellular matrix metalloproteinases are not expressed and are silenced by DNA methylation. Furthermore, histone acetylation is involved in cartilage differentiation through Sox-9 and type II collagen expression regulation by histone deacetylase (64, 65). Interestingly, histone deacetylase activity decreased during dedifferentiation in a primary monolayer culture of articular chondrocyte and recovered during subsequent three-dimensional culture (65). Thus, arthritic chondrocytes harbor changes in DNA methylation after aging, as well as after exposure to inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α , leading to induction of several extracellular matrix-degrading metalloproteinase (66). However, very few studies have been conducted on the epigenetic regulation of healthy and mature articular cartilage [only 20 articles were found in a PubMed search from 1994–2014 with the following words: (chondrocyte NOT chondrosarcoma NOT osteoarthritis NOT osteoarthritic NOT chondrogenesis) AND epigenetic]. While epigenetic processes have been established during chondrogenesis (19, 64) or arthritis (26, 67), no available data was found about epigenetic alterations in normal articular chondrocytes after ionizing radiation exposure, except for a global hypomethylation induced by a putative decreased expression of DNMT1, DNMT3a/3b, MeCP2 and MBD2 found in multiple human tissues and primary cells. Smits *et al.* reported that fractionated radiation therapy, associated or not with chemotherapy, may increase such persistent hypomethylation with age-, sex- and tissue-specific modulations (68).

Oxidative Stress Induced in Mature Articular Cartilage by Radiation Exposure

Hypoxia is known to decrease the effectiveness of radiation therapy. Radiation exposure causes DNA damage either by direct ionization or indirectly by interaction with radicals as reactive oxygen species (ROS) formed by ionization of water surrounding DNA. Articular cartilage is an environment with very low oxygen levels where chondrocytes are well adapted, obtaining 95% of their energy solely from glycolysis (69, 70). Moreover, cell location into cartilage along the oxygen gradient defines a range of physiological oxygen tensions (Fig. 1), which may be linked to a comparable range of radiation-induced ROS (71). Such histological organization may alter radiation-induced oxidative stress and may change the amount and quality of cell damage for each layer of the cartilage. Another cause of cellular radiation resistance can be the induction of oxygen-sensitive signaling pathways, such as hypoxia-inducible transcription factor family (HIFs) or mammalian target of rapamycin (mTOR). Regulation of transcription factor FoxO is also involved in controlling chondrocyte cell death induced by oxidative stress (72) and osteoarthritis induction (73). In addition, FoxO may be involved in cartilage radioresistance by controlling MnSOD activity (73). Interestingly, FoxO protein expression shows a comparable pattern to pO₂ distribution in cartilage (Fig. 1) (73). Furthermore, recent studies show that oxidative stress can: 1. activate HSP70, a major regulator of chondrocyte homeostasis and inflammation (74); 2. stimulate nuclear protein 1 (Nupr1), involved in gene transcription, which regulates matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) expression (75); and 3. increase ERK and p38 phosphorylation (76). These results demonstrate novel regulations of oxidative stress in chondrocytes from articular cartilage. Oxidative stress also inhibits IGF-1-stimulated Akt phosphorylation (76) leading to low Akt activation in stressed chondrocytes. These pathways affect many biological processes, including mitosis, apoptosis and angiogenesis (77). Moreover, a recent study showed that ROS levels increase significantly after irradiation and accumulate in primary articular chondrocytes (62). Oxidative damage to DNA can directly contribute to stress-induced senescence, which can occur from diverse stimuli including ionizing radiation or chronic inflammation (78). Moreover, radiation-induced increase in the intracellular ROS level alters/modifies intracellular ionic homeostasis and reduces chondrocyte extracellular matrix production (79, 80). Furthermore, it was recently shown that high levels of intracellular ROS may exceed chondrocyte enzymatic antioxidant defenses and lead to mitochondrial dysfunction (81).

Senescence of Irradiated Chondrocytes

In addition to apoptosis, radiation exposure can induce cellular senescence characterized by a permanent arrest of the cell cycle. Senescence is a process whereby cell

proliferation is impaired but cell viability is maintained with altered functions. In contrast to quiescent cells that may resume proliferation in response to physiological stimuli, senescence is irreversible (82, 83). Senescence is linked to various phenotypes including β -galactosidase expression, telomere maintenance defect and metabolic modifications. However, radiation-induced cell senescence is certainly more complex than a simple mitosis arrest related to telomere shortening, especially in mainly quiescent primary cells such as articular chondrocytes (84). The molecular mechanisms of radiation-induced cell senescence are driven by the triumvirate ATM-p53-p21 (85) and may be modulated by wild-type p53-inducible phosphatase-1 protein (Wip1) (86). Thus, cells that enter radiation-induced senescence usually contain DNA damage-associated foci γ -H2AX and show almost permanent induction of p16 and Rb protein. Permanent high expression of Rb protein negatively regulates transcription factor E2F, which is involved in transcription of S-phase-specific genes (85). Furthermore, cells undergoing radiation-induced cell senescence secrete factors such as pro-inflammatory cytokines or extracellular matrix metalloproteinases (87).

A recent study demonstrated a link between ROS induction, ERK and p38 kinase activation and induction of senescence after articular chondrocytes were exposed to 10 Gy γ rays (62). In this rabbit model, the authors showed that SIRT1, a nicotinic adenine dinucleotide- (NAD) dependent deacetylase known to be involved in aging processes, is a target of p38. Furthermore, induction of senescence is associated with induction of articular chondrocyte dedifferentiation, as measured by decrease in mRNA and protein expression of both type II collagen and Sox9 (62, 23). Moreover, oxidative stress in chondrocytes accelerates telomere shortening and induces senescence (88). Accumulation of senescent cells in cartilage after radiation exposure may be responsible for radiation-induced cartilage attrition and osteoarthritis.

Cartilage Extracellular Matrix Damages upon Radiation Exposure

Radiation exposure induces an active degradation of cartilage, a reduced proteoglycan synthesis and more generally a decreased matrix production (40, 39). Lowered Akt activation in irradiated chondrocytes is also involved in decreased matrix synthesis. X-ray irradiation with 20 Gy has been shown to decrease, in a time-dependent manner, glycosaminoglycan and type II collagen production (89). Increasing X-ray dose to 50 Gy or 100 Gy dramatically reduces extracellular matrix components in 14 or 7 days, respectively, in mature cartilage (89, 90). Type II collagen reduction in extracellular matrix after X-ray irradiation was shown to be associated with induction of type I collagen, especially into pericellular spaces (Fig. 1) of chondrocytes (91). These dramatic disruptions of fibril organization induce a loss of mechanical properties in mature cartilage

(91) and cause a functional decline of cartilage health, contributing to rising arthropathy in patients treated with radiation (36, 92). Furthermore, it has been recently shown that irradiation of rabbit knee with a total dose of 5 Gy in 1 Gy fractions per day does not affect short- or middle-term cartilage mechanical properties, however, structural changes such as chondrocyte clustering were observed (93). While the structure of extracellular molecule aggregates synthesized after chondrocyte irradiation is comparable to control, irradiation causes alterations in the size distributions of these aggregates (36, 90). Recently, a 2 Gy X-ray irradiation of a 3D model of porcine articular cartilage (explant) was shown to reduce stiffness in both the superficial zone and throughout the entire thickness of the tissue. This stiffness reduction is linked to a large release of glycosaminoglycans from irradiated explant 24 h after irradiation. The glycosaminoglycan content was 55% lower in irradiated explants compared to controls 7 days after such exposure, and consequently, the irradiated explants were unable to recover from the initial loss (94). This acute loss of glycosaminoglycans may be a major pathway of active degradation of cartilage after irradiation (36). Accordingly, radiation-induced cartilage degradation may induce or accelerate osteoarthritis.

Inflammation of Cartilage after Irradiation

Irradiated cells increase secretion of inflammatory cytokines such as IL-6 as a consequence of persistent DNA damages signaling (95, 96). Furthermore, oxidative stress is probably involved in the induction of inflammatory mediators in chondrocytes, such as cytokines and metabolic factors Cox-2, Sox-9, mPGES-1 and sPLA2, which contribute to dysregulation of chondrocyte function (97). A recent study showed that radiation-induced production of pro-inflammatory cytokines and induction of ERK/MAPK and JNK/SAPK pathways is linked to the p53 status of the cells (98). Chondrocytes have been shown to also produce both inflammatory mediators and receptors that may drive to cartilage pathogenesis by connecting catenin-related cascade to IL-1 β upstream and Sox-9 and NF- κ B downstream (97, 99). In addition, PGC-1 α and FoxO3a limit oxidative stress by controlling AMP-activated protein kinase (AMPK) activity to block pro-catabolic responses in chondrocytes (100). The inflammatory environment of the cartilage could ultimately lead to the degradation of normal extracellular matrix and synthesis of achondrocytic extracellular matrix (33). The pro-inflammatory cytokine PGE2 was reported to be slightly induced in normal chondrocytes after irradiation (60). However, the PGE2 induction by radiation exposure is higher in degenerated chondrocytes and may be explained by their inflammatory background (9). In light of a more recent study, increase of inflammatory cytokines might be associated with radiation-induced senescence in articular chondrocytes (62).

UNCONVENTIONAL EXPOSURE OF THE CARTILAGE: HADRONTHERAPY WITH PROTONS OR CARBON IONS

Models used in radiation therapy or radiobiology were initially developed from data collected after photon irradiation. Emerging protocols of radiation therapy with protons or light particle, such as carbon ions, in advanced medical facilities have widely changed the way of thinking about local tumor control and impact on healthy tissues. For example, proton therapy offers the advantage of a minimal exit dose after energy deposition in the target volume, thus, better sparing of critical structures in the vicinity of the tumor. Moreover, carbon ion radiation therapy is an attractive treatment modality that combines the physical advantages of protons, excepting for an exit fragmentation tail, with a higher radiobiological effectiveness (101–103). Such technologies should reduce frequency and severity of radiation morbidity. However, the vast number of combinations of radiation quality and tissue biological status makes it challenging to build a relevant model for articular cartilage exposure during unconventional radiotherapy. Therefore, it is necessary to carefully sort out data from the literature to produce a consistent outcome.

Particle therapy in the form of proton therapy produces scattered or secondary particles that may increase the risk of sequelae incidence both for out-of-field and in-field tissues. While the out-of-field risks for proton therapy were found to be comparable to conventional radiotherapy, exposure of nontarget tissue in the in-field region may potentially have negative effects resulting in long-term toxicities. Unconventional radiation therapy of chondrosarcomas using mixed photon–proton or proton only protocols has been reported by several authors to induce severe late effects in about 10% of patients (104–106). Unfortunately, no *in vitro* or preclinical studies have yet been published about healthy articular cartilage exposed to proton radiation.

Although carbon ions exhibit favorable physical and biological properties, investigations into the effects of carbon ion radiotherapy on normal tissue have been negligible, raising some concerns about potential damage to healthy tissues (107, 101). Only a few studies have been done to investigate the effects of carbon ion irradiation on cartilage in the context of chondrosarcoma treatment (2, 108–110). For example, using the Wistar rat model, Sawajiri and colleagues compare the effect of flash high doses (15, 22.5 and 30 Gy) carbon ions exposure to γ radiation on bone and cartilage metabolism (108, 109, 111). According to these studies from a single laboratory, irradiation with high doses of carbon ions might not only affect osteoblast metabolism but also chondrocytes through reduction of MMP-13 expression, suppressing cartilage maturation (2).

Based on the information from the limited number of studies discussed in this review, unconventional radiation therapy may induce unexpected effects on cartilage metabolism and fate compared to conventional radiation

therapy, which may lead to unexpected joint sequelae. As new modalities expand the range of technologies available for radiation therapy, *in vitro* and preclinical radiation biology studies will become necessary for assessing treatment safety.

CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Normal adult articular cartilage is an avascular tissue with low pO_2 composed of quiescent chondrocytes embedded in a very low-turnover extracellular matrix to provide an efficient gliding motion during joint movement. Such heavily controlled tissue homeostasis by chondrocytes may be impaired by genotoxic stress such as ionizing radiation, leading to cartilage degradation and degenerative diseases. Treatment of radiation-induced injuries in normal tissues presents a key challenge since some aspects of radiation pathophysiology in cartilage are not completely understood. Persistent radiation-induced changes in extracellular matrix metabolism could deteriorate cartilage mechanical properties after irradiation, by extracellular matrix degradation and/or terminal differentiation/senescence of chondrocytes.

As an avascular tissue, healthy articular cartilage may be normally exposed to a very low level of endogenous oxidative stress and consequently possess minimal repair capacity. Irradiated chondrocytes may not undergo complete cell damage repair, resulting in impaired ability to maintain cartilage health, extracellular matrix remodeling and subsequent pathogenesis. Apoptosis remains an unlikely explanation for cartilage degradation since *in vivo* irradiated cartilage does not show major chondrocyte death. However, a radiation-induced senescent phenotype may explain observed functional deficits.

New protocols of conventional radiation therapy, such as intensity-modulated radiation therapy (IMRT), CyberKnife® or arc therapy with photon radiation at high dose rates, or emerging hadrontherapy facilities of proton or light particle delivered with pencil beam scanning, should allow the medical community and patients to expect better tumor control and lower morbidity, improving survival as well as quality of life, both during and after treatment. However, improved safety of these treatments will require further efforts to explore and apply radiation biology concepts. Relevant molecular mechanistic investigations, and preclinical and clinical studies should be designed and developed to achieve this purpose. *In vitro* models of 3D culture of primary human chondrocytes with physiological pO_2 (physioxia) should be established and then treated with current or future medical beam (particle, energy, dose rate and dose). Xenograft of such 3D models in immunocompromised mice would then be an appropriate strategy for developing preclinical studies.

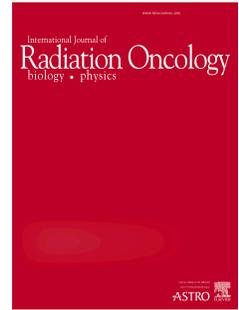
REFERENCES

1. Delanian S, Lefaix JL. Mature bone radionecrosis: from recent physiopathological knowledge to an innovative therapeutic action. *Cancer Radiother* 2002; 6:1–9. (article in French)
2. Sawajiri M, Takinami S, Uchida T, Nomura Y, Mizoe J, Banik S, et al. Expression of MMP-13 in osteoblast cells and rat tibia after exposure to gamma rays or accelerated carbon ions. *Phys Med* 2007; 23:73–9.
3. Delanian S, Chatel C, Porcher R, Depondt J, Lefaix J-L. Complete restoration of refractory mandibular osteoradionecrosis by prolonged treatment with a pentoxifylline-tocopherol-clodronate combination (PENTOCLO): a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 80:832–9.
4. Eifel PJ, Donaldson SS, Thomas PR. Response of growing bone to irradiation: a proposed late effects scoring system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31:1301–7.
5. Kronenberg HM. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:1–13.
6. Provot S, Nachtrab G, Paruch J, Chen AP, Silva A, Kronenberg HM. A-raf and B-raf are dispensable for normal endochondral bone development, and parathyroid hormone-related peptide suppresses extracellular signal-regulated kinase activation in hypertrophic chondrocytes. *Mol Cell Biol* 2008; 28:344–57.
7. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273:613–22.
8. Cole AG. A review of diversity in the evolution and development of cartilage: the search for the origin of the chondrocyte. *Eur Cell Mater* 2011; 21:122–9.
9. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J-P, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22:351–84.
10. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:4197–211.
11. Hughes LC, Archer CW, ap Gwynn I. The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater* 2005; 9:68–84.
12. Ozbey O, Sahin Z, Acar N, Ozcelik FT, Ozenci AM, Koksoy S, et al. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage. *Acta Histochem* 2014; 116:763–70.
13. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1522–32.
14. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840:2414–40.
15. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8:309–34.
16. Cole AG, Hall BK. Cartilage differentiation in cephalopod molluscs. *Zoology* 2009; 112:2–15.
17. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 2000; 22:138–47.
18. Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C, Enomoto-Iwamoto M. Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013; 99:192–202.
19. Michigami T. Current understanding on the molecular basis of chondrogenesis. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014; 23:1–8.
20. Demoor M, Maneix L, Ollitrault D, Legendre F, Duval E, Claus S, et al. Deciphering chondrocyte behaviour in matrix-induced autologous chondrocyte implantation to undergo accurate cartilage repair with hyaline matrix. *Pathol Biol (Paris)* 2012; 60:199–207.
21. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006; 97:33–44.
22. Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R33.
23. Oh C, Lu Y, Liang S, Mori-Akiyama Y, Chen D, de Crombrughe B, et al. SOX9 regulates multiple genes in chondrocytes, including genes encoding ECM proteins, ECM modification enzymes, receptors, and transporters. *PLoS One* 2014; 9:e107577.
24. Akiyama H, Lefebvre V. Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab* 2011; 29:390–5.
25. Studer D, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 2012; 24:118–35; discussion 135.
26. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthr Res Soc* 2012; 20:339–49.
27. Zimmermann P, Boeuf S, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis Rheum* 2008; 58:2743–53.
28. Oppenheimer H, Gabay O, Meir H, Haze A, Kandel L, Liebergall M, et al. 75-kd sirtuin 1 blocks tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2012; 64:718–28.
29. Dvir-Ginzberg M, Reich E. Chopping off the chondrocyte proteome. *Biomarkers* 2014; 2:1–7.
30. Hong E, Reddi AH. MicroRNAs in chondrogenesis, articular cartilage, and osteoarthritis: implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18:445–53.
31. Song J, Kim D, Chun C-H, Jin E-J. MicroRNA-9 regulates survival of chondroblasts and cartilage integrity by targeting protogenin. *Cell Commun Signal* 2013; 11:66.
32. Wu C, Tian B, Qu X, Liu F, Tang T, Qin A, et al. MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (Review). *Int J Mol Med* 2014; 34:13–23.
33. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed Res Int* 2013; 2013:284873.
34. Allen JL, Cooke ME, Alliston T. ECM stiffness primes the TGF β pathway to promote chondrocyte differentiation. *Mol Biol Cell* 2012; 23:3731–42.
35. Das RH, Jahr H, Verhaar JA, van der Linden JC, van Osch GJ, Weinans H. In vitro expansion affects the response of chondrocytes to mechanical stimulation. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16:385–91.
36. Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L. Effects of ionizing radiation on cartilage: emphasis on effects on the extracellular matrix. *Scanning Microsc* 1996; 10:833–40.
37. Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L. Dose- and time-dependent radiation inhibition of RNA and glycosaminoglycan synthesis in embryonic cartilage: an in vitro study. *Int J Radiat Biol* 1990; 57:1007–16.
38. De Craemer D, Thierens H, Cornelissen M, Beele H, Lepercque S, de Ridder L. The effects of ionizing radiation on the glycosaminoglycan synthesis in embryonic cartilage in vitro. *Cytotechnology* 1989; 2:19–25.
39. Hugenberg ST, Myers SL, Brandt KD. Suppression of glycosaminoglycan synthesis by articular cartilage, but not of hyaluronic acid synthesis by synovium, after exposure to radiation. *Arthritis Rheum* 1989; 32:468–74.
40. Garrison JC, Uyeki EM. The effects of gamma radiation on

- chondrogenic development in vitro. *Radiat Res* 1988; 116:356–63.
41. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1994; 126:1611–23.
 42. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273:663–6.
 43. Pateder DB, Eliseev RA, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Okunieff P, Constine LS, et al. The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate. *Radiat Res* 2001; 155:847–57.
 44. Margulies BS, Horton JA, Wang Y, Damron TA, Allen MJ. Effects of radiation therapy on chondrocytes in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006; 78:302–13.
 45. Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Bariteau JT, Damron TA, Spadaro JA, et al. Restoration of growth plate function following radiotherapy is driven by increased proliferative and synthetic activity of expansions of chondrocytic clones. *J Orthop Res* 2006; 24:1945–56.
 46. Bates EJ, Johnson CC, Lowther DA. Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1985; 838:221–8.
 47. Bates EJ, Lowther DA, Johnson CC. Hyaluronic acid synthesis in articular cartilage: an inhibition by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 132:714–20.
 48. Horton JA, Bariteau JT, Loomis RM, Strauss JA, Damron TA. Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291:283–92.
 49. Damron TA, Zhang M, Pritchard MR, Middleton FA, Horton JA, Margulies BM, et al. Microarray cluster analysis of irradiated growth plate zones following laser microdissection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:949–56.
 50. Jikko A, Hiranuma H, Iwamoto M, Kato Y, Okada Y, Fuchihata H. Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat Res* 1996; 146:93–9.
 51. Hiranuma H, Jikko A, Iwamoto M, Fuchihata H. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone* 1996; 18:233–8.
 52. Panasyuk A, Frati E, Ribault D, Mitrovic D. Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:157–67.
 53. Kato Y, Shimazu A, Iwamoto M, Nakashima K, Koike T, Suzuki F, et al. Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:6522–6.
 54. Matsumoto T, Iwasaki K, Sugihara H. Effects of radiation on chondrocytes in culture. *Bone* 1994; 15:97–100.
 55. Franken NAP, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, et al. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model. *Int J Oncol* 2013; 42:1501–15.
 56. Mayles P, Nahum A, Rosenwald JC. *Handbook of radiotherapy physics: theory and practice*. Boca Raton: CRC Press; 2007.
 57. Toda M, Takahashi T, Kobayashi T, Seguchi H, Ogawa Y, Yoshida S, et al. The role of apoptotic resistance in irradiated adult articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 2002; 9:349–52.
 58. Moussavi-Harami F, Mollano A, Martin JA, Ayoob A, Domann FE, Gitelis S, et al. Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346:379–85.
 59. Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, et al. Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 2007; 25:820–8.
 60. Takahashi T, Mizobuchi H, Toda M, Maeda A, Mizuno S, Ogawa Y, et al. Metabolic effects of X-ray irradiation on adult human articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 2003; 11:631–4.
 61. Ogawa Y, Takahashi T, Kobayashi T, Kariya S, Nishioka A, Ohnishi T, et al. Apoptotic-resistance of the human osteosarcoma cell line HS-Os-1 to irradiation is converted to apoptotic-susceptibility by hydrogen peroxide: a potent role of hydrogen peroxide as a new radiosensitizer. *Int J Mol Med* 2003; 12:845–50.
 62. Hong E-H, Lee S-J, Kim J-S, Lee K-H, Um H-D, Kim J-H, et al. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. *J Biol Chem* 2010; 285:1283–95.
 63. Beier F, Loeser RF. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J Cell Biochem* 2010; 110:573–80.
 64. Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J* 2013; 15:1–10.
 65. Huh YH, Ryu J-H, Chun J-S. Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2007; 282:17123–31.
 66. Roach HI, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthr Cartil* 2007; 15:128–37.
 67. Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012; 18:109–18.
 68. Smits KM, Melotte V, Niessen HEC, Dubois L, Oberije C, Troost EGC, et al. Epigenetics in radiotherapy: where are we heading? *Radiother Oncol* 2014; 111:168–77.
 69. Bywaters EGL. The metabolism of joint tissues. *J Pathol Bacteriol* 1937; 44:247–68.
 70. Rosental O, Wagoner B. Studies in the metabolism of articular cartilage. I. Respiration and glycolysis of cartilage in relation to its age. *J Cell Physiol* 1941; 17:221–33.
 71. Heywood HK, Lee DA. Low oxygen reduces the modulation to an oxidative phenotype in monolayer-expanded chondrocytes. *J Cell Physiol* 2010; 222:248–53.
 72. Akasaki Y, Alvarez-Garcia O, Saito M, Caramés B, Iwamoto Y, Lotz MK. FOXO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:3349–58.
 73. Akasaki Y, Hasegawa A, Saito M, Asahara H, Iwamoto Y, Lotz MK. Dysregulated FOXO transcription factors in articular cartilage in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014; 22:162–70.
 74. Bianchi A, Moulin D, Hupont S, Koufany M, Netter P, Reboul P, et al. Oxidative stress-induced expression of HSP70 contributes to the inhibitory effect of 15d-PGJ2 on inducible prostaglandin pathway in chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 2014; 76:114–26.
 75. Yammani RR, Loeser RF. Brief report: stress-inducible nuclear protein 1 regulates matrix metalloproteinase 13 expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:1266–71.
 76. Loeser RF, Gandhi U, Long DL, Yin W, Chubinskaya S. Aging and oxidative stress reduce the response of human articular chondrocytes to insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:2201–9.
 77. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:241–8.
 78. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte

- senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartilage* 2009; 17:971–9.
79. Gibson JS, Milner PI, White R, Fairfax TPA, Wilkins RJ. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflugers Arch* 2008; 455:563–73.
 80. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthr Cartilage* 2005; 13:643–54.
 81. Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard JM, Henrotin Y. Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthr Cartilage* 2008; 16:756–63.
 82. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585–621.
 83. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614–36.
 84. Panganiban R-AM, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14:15931–58.
 85. Vávrová J, Rezáčová M. The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57:41–6.
 86. Cha B-H, Lee J-S, Kim SW, Cha H-J, Lee S-H. The modulation of the oxidative stress response in chondrocytes by Wip1 and its effect on senescence and dedifferentiation during in vitro expansion. *Biomaterials* 2013; 34:2380–8.
 87. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YW, Murray D. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci* 2013; 14:22409–35.
 88. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res* 2011; 29:1114–20.
 89. Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L. Radiation effects on the matrix synthesis in non-ossifying embryonic cartilage in vitro: a functional and morphological study. *Tissue Cell* 1993; 25:343–50.
 90. Cornelissen M, Thierens H, de Ridder L. Effects of ionizing radiation on the size distribution of proteoglycan aggregates synthesized by chondrocytes in agarose. *Scanning Microsc* 1993; 7:1263–8.
 91. Muhonen A, Säämänen A-M, Peltomäki T, Happonen R-P. The effect of irradiation and hyperbaric oxygenation (HBO) on extracellular matrix of the condylar cartilage after mandibular distraction osteogenesis in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35:79–87.
 92. Willey JS, Long DL, Vanderman KS, Loeser RF. Ionizing radiation causes active degradation and reduces matrix synthesis in articular cartilage. *Int J Radiat Biol* 2013; 89:268–77.
 93. Öncan T, Demirağ B, Ermutlu C, Yalçinkaya U, Özkan L. Effect of low-dose irradiation on structural and mechanical properties of hyaline cartilage-like fibrocartilage. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2013; 47:127–33.
 94. Lindburg CA, Willey JS, Dean D. Effects of low dose X-ray irradiation on porcine articular cartilage explants. *J Orthop Res* 2013; 31:1780–5.
 95. Richardson RB. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea. *Aging* 2009; 1:887–902.
 96. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11:973–9.
 97. Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15:375.
 98. Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms. *J Pathol* 2014; 232:289–99.
 99. Hong E-H, Song J-Y, Lee S-J, Park I-C, Um H-D, Park JK, et al. Low-dose γ -radiation inhibits IL-1 β -induced dedifferentiation and inflammation of articular chondrocytes via blockage of catenin signaling. *IUBMB Life* 2014; 66:128–37.
 100. Zhao X, Petursson F, Viollet B, Lotz M, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α and FOXO3a mediate chondroprotection by AMP-activated protein kinase. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:3073–82.
 101. Durante M. New challenges in high-energy particle radiobiology. *Br J Radiol* 2014; 87:20130626.
 102. Jensen AD, Münter MW, Debus J. Review of clinical experience with ion beam radiotherapy. *Br J Radiol* 2011; 84:S35–47.
 103. Tsujii H, Kamada T. A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42:670–85.
 104. Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, Rijswijk CS van, Krol AD, Taminiau AHM, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 2008; 13:320–9.
 105. Noël G, Habrand J-L, Jauffret E, de Crevoisier R, Dederke S, Mammarr H, et al. Radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and the cervical spine. Prognostic factors and patterns of failure. *Strahlenther Onkol* 2003; 179:241–8.
 106. Moteabbed M, Yock TI, Paganetti H. The risk of radiation-induced second cancers in the high to medium dose region: a comparison between passive and scanned proton therapy, IMRT and VMAT for pediatric patients with brain tumors. *Phys Med Biol* 2014; 59:2883–99.
 107. Yanagi T, Kamada T, Tsuji H, Imai R, Serizawa I, Tsujii H. Dose-volume histogram and dose-surface histogram analysis for skin reactions to carbon ion radiotherapy for bone and soft tissue sarcoma. *Radiother Oncol* 2010; 95:60–5.
 108. Sawajiri M, Mizoe J. Changes in bone volume after irradiation with carbon ions. *Radiat Environ Biophys* 2003; 42:101–6.
 109. Sawajiri M, Mizoe J, Tanimoto K. Changes in osteoclasts after irradiation with carbon ion particles. *Radiat Environ Biophys* 2003; 42:219–23.
 110. Sawajiri M, Nomura Y, Bhawal UK, Nishikiori R, Okazaki M, Mizoe J, et al. Different effects of carbon ion and gamma-irradiation on expression of receptor activator of NF- κ B ligand in MC3T3-E1 osteoblast cells. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142:618–24.
 111. Linkhart TA, Linkhart SG, Kodama Y, Farley JR, Dimay HP, Wright KR, et al. Osteoclast formation in bone marrow cultures from two inbred strains of mice with different bone densities. *J Bone Miner Res* 1999; 14:39–46.

Accepted Manuscript



Comparable senescence induction in 3D human cartilage model by exposure to therapeutic doses of X-rays or C-ions

Dounia Houria Hamdi, PharmD, François Chevalier, PhD, Jean-Emmanuel Groetz, PhD, Florent Durantel, MSc, Jean-Yves Thuret, PhD, Carl Mann, PhD, Yannick Saintigny, PhD.

PII: S0360-3016(16)00128-0

DOI: [10.1016/j.ijrobp.2016.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.02.014)

Reference: ROB 23434

To appear in: *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*

Received Date: 30 September 2015

Revised Date: 6 January 2016

Accepted Date: 3 February 2016

Please cite this article as: Hamdi DH, Chevalier F, Groetz J-E, Durantel F, Thuret J-Y, Mann C, Saintigny Y, Comparable senescence induction in 3D human cartilage model by exposure to therapeutic doses of X-rays or C-ions, *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* (2016), doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.02.014.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Title: Comparable senescence induction in 3D human cartilage model by exposure to therapeutic doses of X-rays or C-ions

Dounia Houria Hamdi¹ PharmD, François Chevalier¹ PhD, Jean-Emmanuel Groetz² PhD, Florent Durantel³ MSc, Jean-Yves Thuret⁴ PhD, Carl Mann⁴ PhD and Yannick Saintigny¹ PhD.

¹LARIA - IRCM - DSV - Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Caen, France

²UMR6249 - Université de Franche-Comté, Besançon, France

³CIMAP- DSM - Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Caen, France

⁴CEA, iBiTec-S, SBIGeM/CNRS-FRE3377 and I2BC/Université Paris-Sud and Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

Correspondance to: Yannick Saintigny, PhD., LARIA, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, CIMAP Bd Henri Becquerel BP 55027, 14076 Caen cedex 05, France. Tel: +33 (0)2 31 45 47 31. E-mail: yannick.saintigny@cea.fr.

Running title: Radiation-induced senescence of cartilage

Acknowledgement: This work was supported by DSV-CEA (AAP Radiobiologie, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Fontenay aux Roses, France) and Conseil Régional de Basse-Normandie (programme Emergence, Caen, France). DHH is supported by Irtelis Graduate Program (DSV-CEA) and "Ligue contre le cancer" fellowship. We thank A-M. Frelin-Labelme and V. Beaudouin for X-RAD dosimetry and CIMAP physicists E. Balanzat, Y. N'Gnono, and A. Cassimi for IRABAT heavy ions beam calibration and dosimetry (GANIL). We are also grateful to C.Bageot and Myriam Oger for assistance with IHC-p (pathology laboratory, CLCC François Baclesse), M. Guillamin for technical assistance with flow cytometry (UCBN), N. Elie for assistance with imaging (HIQ, UCBN) and B. Bernay at the Protegen Plateform (UCBN). We also thank J-L. Lefaix for critically revising the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Title: Comparable senescence induction in 3D human cartilage model by exposure to therapeutic doses of X-rays or C-ions

Running title: Radiation-induced senescence of cartilage

ACCEPTED MANUSCRIPT

Summary

The relative biological effectiveness of carbon ions compared to X-rays scored 2.6 in primary human articular chondrocytes cultured in 2D. This was correlated to a stronger cellular senescence induction (two-fold). This differential effect was not reflected in 3D cartilage model as both ionizing radiations induced comparable senescence. Carbon ions seem as safe as X-rays to articular cartilage in the context of radiation-therapy.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Abstract

Purpose: Particle therapy using carbon ions (C-ions) has been successfully used in the treatment of tumors resistant to conventional radiation-therapy. However, the potential side effects to healthy cartilage exposed to lower linear energy transfer (LET) ions in the beam track prior the tumor, have not been evaluated. The aim of this study was to assess the extent of damage following C-ions irradiation in a 3D cartilage model close to human homeostasis.

Methods and Materials: Primary human articular chondrocytes from a healthy donor were cultured in a collagen scaffold to construct a physioxic 3D cartilage model. Monolayer 2D culture was used as a reference. Cells were irradiated with a single dose of monoenergetic C-ions beam with a linear energy transfer of approximately 30 keV/ μm . This LET corresponds to the entrance channel of C-ions in the shallow healthy tissues before the spread-out Bragg peak (~ 100 keV/ μm) during hadrontherapy protocols. The same dose of X-rays was used as a reference. Survival, cell death and senescence assays were performed.

Results: As expected, in 2D culture, C-ions were more efficient than X-rays in reducing cell survival with a relative biological effectiveness of 2.6. This was correlated with a stronger radiation-induced senescence (two-fold) but not to higher cell death induction. Interestingly, this differential effect was not reflected in 3D. Indeed, both ionizing radiations induced comparable rate of senescence induction in 3D.

Conclusions: The higher biological effectiveness of C-ions compared to low-LET radiations taken into account in treatment planning systems might be misevaluated using 2D culture experiments. Radiation-induced senescence is an important factor of potential cartilage attrition. The present data should encourage the scientific community to use relevant models and beams to improve the use of charged particles with a better safety for patients.

Introduction

Particle therapy with carbon ions (C-ions) has many advantages over conventional radiotherapy (photons), owing to their better ballistic with a decreased irradiated volume of normal healthy tissue in the beam track. Furthermore, these shallow tissues are irradiated with particles of intermediate linear energy transfer (LET ~30 keV/ μ m), upstream from the spread-out Bragg peak (~100 keV/ μ m). However, due to its complexity and cost, such treatment is today mainly limited to cancers close to radiosensitive tissues and/or radioresistant tumors like chondrosarcoma or osteosarcoma (1). Indeed, chondrosarcoma is a malignant bone tumor with cartilaginous differentiation described as chemo- and radiation-resistant. Hadron-therapy using protons or C-ions has been successfully used to treat low- and intermediate-grade chondrosarcoma (2). However, the risk assessment of sequelae of healthy tissue like hyaline cartilage and second malignancies in the beam track of charged particles is not entirely predicted (3).

Moreover, if side effects and sequelae following conventional therapeutic irradiation have been relatively well described, cellular mechanisms especially in mesenchyme derived cells are still poorly understood. Studying such mechanism is even more necessary for C-ions irradiations considering the tendency to hypo-fractionated treatments leading to higher doses deposited in healthy tissues (4). It has been hypothesized that senescence induced by cancer therapy is implicated in organ deterioration in patients surviving cancer leading to a poor quality of life (5). Hyaline articular cartilage can be side-exposed to ionizing radiations (IRs) which might induce bone differentiation and senescence (6). The senescence of chondrocytes has been defined as the “age-dependent deterioration of chondrocytes following intrinsic and extrinsic factors” (7). Consequently, these cells develop a senescent secretory phenotype which induces loss of differentiated functions leading to painful osteoarthritis that may cause a major prejudice to the survivor’s quality of life. Several proteins are of interest according to their function in cartilage homeostasis and/or differentiation. The cycline-dependent kinase inhibitor (CKI) p21 has been associated with cellular senescence in different cell lines (8) and plays a major role in the regulation of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues (9). Furthermore, H2A.J has been recently described as a novel histone variant accumulating in human senescent cells (10) and cyclooxygenase-2 protein (COX-2) has been associated with chondrocyte differentiation (11). These markers are thus relevant in the analysis of radiation-induced senescence.

The relative biological effectiveness (RBE) is an important parameter for the evaluation of the clinical prescribed dose to the tumor and the maximal admitted dose to healthy tissues. However, the RBE values used in the clinics are mainly extracted from data of cell survival, performed in 2D culture and normoxia ($pO_2=20\%$). These conditions are dramatically different from human homeostasis on the contrary of 3D models which can mime more physiological conditions. Indeed, starting from the study of D. Brenner's lab at Colombia University (2005) on bystander signaling in 3D engineered human epidermis (12), numerous published experiments have included 3D models to study the differential response of tissues to ionizing radiations of different LETs (13–19). Moreover, 3D culture was shown to confer relative radio-resistance to cells in 3D model of breast epithelial cells (20) probably due to chromatin modification (21). Besides, cellular clues like adhesion, apical/basal orientation, mechanical tension and soluble factors diffusion are radically different in 3D culture compared to monolayer culture, explaining these differential behavior to radiation exposure (22).

The purpose of this study was to assess senescence induction in human cartilage as a direct response to C-ions irradiation, in the context of a chondrosarcoma treatment, in comparison with X-rays. To do so, we used human articular chondrocytes (HAC) cultured in a 3D cartilage model (3DCaM) (23) and 2D classical culture as a control. Due to a higher LET, we assumed that C-ions would induce more senescence compared to X-rays. However, we showed no higher effectiveness of C-ions compared to X-rays in this 3DCaM, on the contrary of 2D culture. On the basis of these endpoints, C-ions seem to be as safe as X-rays for articular cartilage fate, during cancer treatment. This evaluation method could be used in the future to estimate the risk of sequelae in healthy tissues during particle therapy.

Methods and Materials

Cell culture, irradiation and dosimetry:

Data reported in this manuscript have been collected from commercially available cells used in compliance with the Helsinki Declaration. Primary HAC from a healthy Caucasian male donor (#402K-05a) were purchased from CellSystems (Troisdorf, Germany) and maintained in a chondrocyte growth medium (CellSystems). HAC were amplified in culture flasks and passaged not more than four times before irradiation or cell seeding in 3D. For 3D experiments, HAC were grown seven days in collagen scaffolds as previously described (23, 24) to obtain a 3DCaM.

Confluent HAC in 2D and 3DCaM were irradiated in physioxia (2% O₂). We used 75 to 95 MeV/u monoenergetic C-ions of D1 IRABAT high-energy scanning beam line at the Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL, Caen, France), depending on beam availability. Cells were irradiated in an upright position in 12.5 cm² culture flasks (2D) or polypropylene tubes (3DCaM), filled with medium as described before (24). Due to the scaffold thickness (2 mm), LET distribution was assessed through two calculation codes based on the Monte-Carlo method (13) showing less than 10% difference in the thickness of the scaffold (supplementary Fig. 1). A dose rate of 1 Gy/min (at least 15 seconds of radiation exposure) was used. Dose homogeneity was estimated prior irradiation by ions track detection on CR39 detector by CIMAP (Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique) as recently described (25).

For X-rays irradiation, we used X-RAD® iR-225 research X-rays generator (225 kV, 13 mA) from PXi (North Branford, USA) with a dose rate of 2 Gy/min as described before (24). Cells were irradiated horizontally in 12.5 cm² culture flasks (2D) or 96-well plates (3DCaM).

Data are expressed in function of the absorbed dose (Gy), unless otherwise stated (4). The single dose of 2 Gy was chosen except for survival curves and sham-treated samples were handled in the same conditions without being irradiated. In this report, we referred to X-rays as low-LET radiation and C-ions as intermediate-LET. All experiments and post-irradiation cultures were performed in physioxia.

Cell survival, cell death and senescence assays:

Following irradiation in 2D, HAC were trypsinized and seeded in 6-well plates (survival assays), T25 culture flasks (cytometry) or Nunc™ slide flasks (SA-β-Gal assay), and this was considered as the initial time of the kinetic (t₀).

Survival assays were assessed as described previously (24). Briefly, 12 to 16h following irradiation, cells were counted and plated in six well plates at low density (100 or 1000 cells) then left untreated for 12 days in physioxia. Only colonies of 50 cells or more were scored and data were fitted to the linear quadratic equation. D_{10} (lethal dose for 10% survival), D_{37} (lethal dose for 37% survival) and SF_2 (surviving fraction after a 2 Gy irradiation) values were determined from the fitted curve.

HES classical staining was performed as previously described (24) on paraffin-embedded, transversally cut 8 μ m sections of 3DCaM and pictures were taken using Aperio scanscope CS scanner (Leica, Nussloch Germany).

Cell toxicity was assessed on culture medium using Toxilight™ (Lonza, Basel, Switzerland), a bioluminescent cytotoxicity assay designed to quantitatively measure the release of Adenylate Kinase (AK) from damaged cells, as described before (24). Briefly, 20 μ L of thawed cell culture supernatants (2D or 3D) were mixed to 100 μ L/well of freshly prepared AK working solution and incubated for 5 min at room temperature before measurement. Digitonin detergent was used as a positive control and data were collected in RLU (Relative Light Unit).

Apoptosis induction was evaluated in 2D by flow cytometry (sub- G_1 fraction) using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, 100 μ M) (Life technologies, Carlsbad, CA) and propidium iodide (PI) following manufacturer's instructions and using FlowJo analyzing software (Ashland, USA).

Senescence was assessed in 2D as described before (26) using SA- β -gal assay (Promega, Madison, WI).

Western blotting:

Cell lysis and western blotting were performed as described before (24). Briefly, cells (2D and 3D) were disrupted using glass beads (100 μ m diameter) and lysis buffer containing Laemmli buffer at 4°C. For 3DCaM, the entire extracted sample was loaded on precast 4-20% SDS-PAGE gels (Thermoscientific, Waltham, USA) and was transferred to a nitrocellulose membrane. For 2D samples, around 0.15 million cells were used. COX-2 (#12282), p21 (#2947), caspase-3 (#9662) antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA), GAPDH (#11335232) from Thermoscientific and H2A.J was developed and provided by Dr C. Mann's lab. Detections were assessed on X-ray films (GE healthcare) using the ECL method.

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (La Jolla, CA) and statistical testing is detailed in the legend of figures.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Results

Survival of HAC following X-rays and C-ions irradiation in 2D:

We first explored the differential effect of C-ions and X-rays on cell survival. Clonogenic survival assay showed, as expected, a strong dose-dependent effect for both IRs (Figure 1, Table1). Extrapolated D_{10} , D_{37} and SF_2 corresponded to 4.1 Gy, 1.8 Gy and 33.3% for X-rays, while 1.6 Gy, 0.7 Gy and 6.3% were scored for C-ions, respectively, inferring a RBE of 2.6. In particle therapy with heavy ions, the RBE-weighted absorbed dose (GyRBE) refers to a dose that is clinically isoeffective to X-rays (3). In this study, the samples were irradiated with a physical dose of 2 Gy corresponding to 5.2 GyRBE (C-ions), a value close to the clinical dose used in hypofractionated particle therapy protocols (4).

Description of the 3DCaM:

The impact of 3D environment on cellular response to IRs was then analyzed using a model (3DCaM) developed for cartilage reconstruction and radiation-biology studies (23, 24). We first checked the cell distribution into the scaffold. Seven days following seeding, HAC were distributed homogeneously inside the 3D model (Fig. 2A). Then, we confirmed chondrocyte redifferentiation by measuring COX-2 expression. Indeed, COX-2 expression has been previously associated with chondrocyte differentiation via p38 activation/NF- κ B recruitment (11). In 2D, a time-dependent loss of COX-2 expression was measured as a marker of cell dedifferentiation (Fig. 2B). Seven days following cell seeding in the scaffold, chondrocytes recover COX-2 expression, meaning a sustainable cell re-differentiation.

Differential senescence induction in 2D HAC and 3DCaM following X-rays and C-ions irradiation:

Depending on radiation quality, irradiation dose or cell type, IR can induce several types of cell death (27). Necrosis and apoptosis were analyzed in 2D HAC with no significant induction until 96h following irradiation (supplementary Fig 2). In the 3DCaM, cellular toxicity analysis showed no sign of IR-induced necrosis until 96h following irradiation (supplementary Fig. 3A). Moreover, the analysis of caspase-3 protein expression either in 2D or 3DCaM following irradiation didn't show any sign of radiation-induced apoptosis (supplementary Fig. 4 3B). Together, these data suggest that X-rays and C-ions didn't induce cell death both in 2D HAC and in 3DCaM.

Senescence has been suggested as a potential mechanism to explain low-LET induced cartilage attrition and osteoarthritis in clinic (6). We investigated the differential senescence induction of C-ions versus X-rays in 3DCaM and 2D HAC. For 2D HAC, SA- β -gal assay was used as a senescence marker. Indeed, despite assay's limitations it is, to date, the most widely used senescence marker (26). Moreover, it has been previously described as a good indicator of cellular senescence in articular chondrocytes following X-rays irradiation, in association with other markers (28). The percentage of SA- β -gal positive cells scored $18.5\% \pm 2.9\%$, $32.5\% \pm 4.3\%$ and $57.8\% \pm 0.4\%$ in sham-treated, X-rays and C-ions irradiated samples, respectively (Fig. 3A). This result suggests that C-ions ions were twice more effective in inducing senescence compared to X-rays. Interestingly, this value is quite similar to the extrapolated RBE from survival curves.

As SA- β -gal assay was not feasible in the 3DCaM, we selected a combination of three proteins involved in senescence signaling for cell fate monitoring. The expression of COX-2, p21, and H2A.J proteins was analyzed from 1h to 96h following sham-treatment or irradiation. All western blot data's stemming from three independent experiments are represented in supplementary figure 4. For each sample, a positive score (+) was assigned to protein expression if upregulated (for p21 and H2A.J) or downregulated (for COX-2). The whole analysis is represented in supplementary figure 5. Surprisingly, experimental data display no correlation between senescence induced by radiation as measured here (both radiation qualities) and the time of occurrence post-irradiation. Indeed, each 3DCaM can be considered as an independent sample which would imply the stochastic induction of early-stages of senescence within hours following exposure to radiations. Consequently, the percentage of senescent (+/++/+++ or non-senescent models) was based on the protein scoring described above regardless of the time of induction as show in Figure 4. The y-axis represents the percentage of 3DCaM with a specific protein expression pattern related to the total of analyzed samples, in the indicated group. Grey histograms (+ and ++) correspond to 3DCaM expressing one or two senescence markers. The proportion of samples expressing one or two senescence markers is higher in the irradiated groups (X-rays and carbon ions) compared to sham treated group. Furthermore, if we consider only the strongest scoring (+++), irradiation of 3DCaM induced senescence in 0% of sham-treated, 8.3% of X-rays or 8.3% of C-ions irradiated samples (Fig. 3B). Thus, according to these results, a single dose of C-ions (~ 30 keV/ μ m) seemed to induce no more harmful effects than X-rays in 3DCaM, on the contrary of 2D culture data's.

Discussion

The purpose of this study was to assess the putative senescence of healthy articular cartilage reconstructed *in vitro* (3DCaM) following therapeutic C-ions irradiation compared to the same physical dose of X-rays. Monolayer 2D culture of HAC was used as a control.

Very few studies have been published on the survival of HAC after IR exposure (6). Data analysis of D₁₀ survival following X-rays irradiation (4.1 Gy) shows a rather higher value than described before (2.7 Gy) (29). This might be due to a differential oxygen tension in culture media. Indeed, our cells are cultured and treated under cartilage physiological oxygen tension (pO₂= 2%) instead of atmosphere oxygen tension (pO₂ = 20%) as previously proposed (29). Moreover, a putative inter-individual variability in radiosensitivity between human cell donors may explain partly such a discrepancy between studies. The RBE (D₁₀) calculated from our data (2.6) is rather smaller than the one found with normal human fibroblasts (3.29) in our laboratory using the same irradiation facility (30). However, it is in the range of a previously published database consisting in 855 *in vitro* survival experiments following ions and photon irradiation (31).

Interestingly, X-rays and C-ions irradiation were not able to induce neither necrosis nor apoptosis both in 2D and 3D culture. This result is similar to previous studies using X-rays in primary rabbit articular chondrocytes (28) or *ex vivo* culture of porcine and human (32) articular cartilage which supports the relative radiation-resistance of chondrocytes regardless of radiation quality. Indeed, necrosis results typically from a high magnitude of stress following either apoptosis or cellular senescence. Depending on cell lines, it can be triggered by low or very high doses of ionizing radiation (27). Moreover, human mesenchymal cells (precursors of chondrocytes), on the contrary of arthritic chondrocytes, don't undergo radiation-induced apoptosis probably due to the efficient activation of the DNA damage response pathways (6, 33).

Furthermore, our results showed that C-ions irradiation induced twice more SA-β-Gal positive cells in 2D compared to X-rays (Fig. 3A) which explains, at least partly, the higher effectiveness of C-ions compared to X-rays in reducing cell survival in 2D (Fig. 1) and extensively defined before (34).

However, the higher effectiveness of C-ions compared to X-rays described above has not been reproduced in 3D culture conditions.

Chondrosenescence has been described as a hypertrophic cell cycle arrest associated with a loss of differentiation. Hypertrophic arrest, on the contrary of quiescence (G₀ arrest) is a cell cycle arrest beyond the

restriction point (G₁ or G₂) in the presence of activation of mitogenic pathways. It is usually associated with high levels of CKIs like p21 and can be caused by contact inhibition or DNA damage for example (34). To evaluate the potential radiation-induced senescence in 3DCaM, we analyzed the expression of three proteins of interest; p21 (CKI) responsible for the maintenance of cell cycle arrest (8), the histone H2A.J recently discovered as accumulating in senescent cells (10) and COX-2 protein associated with the differentiation of chondrocytes (11). We showed here, that irradiation of 3DCaM induced an overexpression of p21 and H2A.J proteins, combined with downregulation of COX-2 in nearly 8% of the samples (if we consider only the highest scoring +++). These results show a comparable senescence induction in an *in vitro* 3D model of human cartilage after a single dose of low- or intermediate-LET radiation (detailed model described in Fig. 4). Hence, biological effects measured in 2D cultures, such as the higher effectiveness of C-ions compared to X-rays, might be over-exaggerated compared to the reality of clinics, especially concerning healthy tissues and primary cell analysis. Thus, this study is the first report investigating the differential impact of C-ions versus X-rays in human articular cartilage using a 3DCaM which could be useful to assess the RBE of therapeutic beams in healthy tissues and tumors.

In our study, we monitored cellular senescence until 96 hours following irradiation which corresponds to the early stage of the phenomenon and could explain the relatively low measured percentage (8%). A major furtherance could be to extend the kinetic to weeks post-irradiation in order to assess the long term senescence induction following C-ions and X-rays irradiation. Moreover, the study of the alteration of osteogenesis and chondrogenesis in human mesenchymal stem cells by C-ions beams in this collagen scaffold could be useful to evaluate the extent of bone/joints defects observed after radiotherapy as it has been performed previously using X-rays (33).

References

1. Durante M, Galès S. Chapter I - Hadrontherapy. In: *Nuclear Physics for Medicine - NuPECC report.*; 2014.
2. Tsujii H, Mizoe J-E, Kamada T, *et al.* Overview of clinical experiences on carbon ion radiotherapy at NIRS. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 2004;73 Suppl 2:S41–49.
3. Newhauser WD, Durante M. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2011;11:438–448.
4. Kamada T, Tsujii H, Blakely EA, *et al.* Carbon ion radiotherapy in Japan: an assessment of 20 years of clinical experience. *Lancet Oncol.* 2015;16:e93–e100.
5. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 2014;509:439–446.
6. Saintigny Y, Cruet-Hennequart S, Hamdi DH, *et al.* Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage. *Radiat. Res.* 2015;183:135–146.
7. Mobasher A, Matta C, Zákány R, *et al.* Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas.* 2015;80:237–244.
8. Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochem. Biokhimiia.* 2012;77:575–584.
9. Mehrara BJ, Avraham T, Soares M, *et al.* p21(cip/WAF) is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. *Faseb J.* 2010;24:4877–4888.
10. Contrepolis K, Coudereau C, Benayoun B, *et al.* A novel histone variant H2A.J accumulates in senescent human cells with persistent DNA damage and promotes inflammatory gene expression. *Mol. Cell.* in revision.
11. Ulivi V, Giannoni P, Gentili C, *et al.* p38/NF- κ B-dependent expression of COX-2 during differentiation and inflammatory response of chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 2008;104:1393–1406.
12. Belyakov OV, Mitchell SA, Parikh D, *et al.* Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:14203–14208.
13. Mezentsev A, Amundson SA. Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. *Radiat. Res.* 2011;175:677–688.
14. Schmid TE, Dollinger G, Hable V, *et al.* Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20 MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 2010;95:66–72.
15. Su YR, Meador JA, Geard CR, *et al.* Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Exp. Dermatol.* 2010;19:E16–E22.
16. Suzuki K, Nakashima M, Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue. *Radiat. Res.* 2010;174:415–423.

17. Varnum SM, Springer DL, Chaffee ME, *et al.* The Effects of Low-Dose Irradiation on Inflammatory Response Proteins in a 3D Reconstituted Human Skin Tissue Model. *Radiat. Res.* 2012;178:591–599.
18. Waters KM, Stenoien DL, Sowa MB, *et al.* Annexin A2 Modulates Radiation-Sensitive Transcriptional Programming and Cell Fate. *Radiat. Res.* 2013;179:53–61.
19. Yunis R, Albrecht H, Kalanetra KM, *et al.* Genomic characterization of a three-dimensional skin model following exposure to ionizing radiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 2012;53:860–875.
20. Sowa MB, Chrisler WB, Zens KD, *et al.* Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2010;687:78–83.
21. Storch K, Eke I, Borgmann K, *et al.* Three-Dimensional Cell Growth Confers Radioresistance by Chromatin Density Modification. *Cancer Res.* 2010;70:3925–3934.
22. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension - how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* 2012;125:3015–3024.
23. Legendre F, Ollitrault D, Hervieu M, *et al.* Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2013;19:550–567.
24. Hamdi DH, Barbieri S, Chevalier F, *et al.* In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact. *BMC Cancer.* 2015;15:579.
25. Durantel F, Balanzat E, Cassimi A, *et al.* Dosimetry for radiobiology experiments at GANIL. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* 2016.
26. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, *et al.* Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 2009;4:1798–1806.
27. Panganiban R-AM, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:15931–15958.
28. Hong EH, Lee SJ, Kim JS, *et al.* Ionizing Radiation Induces Cellular Senescence of Articular Chondrocytes via Negative Regulation of SIRT1 by p38 Kinase. *J. Biol. Chem.* 2010;285:1283–1295.
29. Moussavi-Harami F, Mollano A, Martin JA, *et al.* Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;346:379–385.
30. Laurent C, Leduc A, Pottier I, *et al.* Dramatic Increase in Oxidative Stress in Carbon-Irradiated Normal Human Skin Fibroblasts. *Plos One.* 2013;8.
31. Friedrich T, Scholz U, Elsasser T, *et al.* Systematic analysis of RBE and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 2013;54:494–514.
32. Willey JS, Long DL, Vanderman KS, *et al.* Ionizing radiation causes active degradation and reduces matrix synthesis in articular cartilage. *Int. J. Radiat. Biol.* 2013;89:268–277.
33. Cruet-Hennequart S, Drougard C, Shaw G, *et al.* Radiation-induced alterations of osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS One.* 2015;10:e0119334.

34. Blagosklonny MV. Cell senescence: hypertrophic arrest beyond the restriction point. *J. Cell. Physiol.* 2006;209:592–597.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure legends**Table 1:** Radiation survival curve characteristics for HAC in 2D.

The data from two experiments (duplicate) were fitted to the linear quadratic model (LQ model) and the indicated parameters were determined from the fitted curve, as previously described (24).

Figure 1: survival curves of HAC following X-rays and C-ions irradiation in 2D.

HAC were sham-treated or irradiated with the indicated doses of X-rays (square) or C-ions (triangle). The curves (dotted for X-rays, full line for C-ions) represent the surviving fractions of HAC fitted to the linear quadratic model. Results are mean (\pm SEM) of 2 independent experiments in duplicate.

Figure 2:

A: Top: A Representative image of paraffin-embedded, HES colored 8 μ m section of a 3DCaM shows a homogenous cell distribution in the 3D scaffold. Bottom: magnified images from top image. The collagen fibers are colored in pale red and the cells, indicated with dotted arrows, in violet.

B: Western blot analysis of COX-2 protein in HAC shows a cell dedifferentiation during amplification in 2D and cell differentiation in the 3D model. GAPDH was used as a loading control.

Figure 3: IR induced senescence in 2D HAC and 3DCaM.

A: Cells were sham-treated or irradiated with X-rays or Carbon ions in 2D culture. SA- β -gal testing was performed 96h following t_0 . Data are presented as mean \pm SEM of two independent experiments in duplicate after counting at least 200 cells/sample, (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with Tukey post-test compared to sham-treated sample).

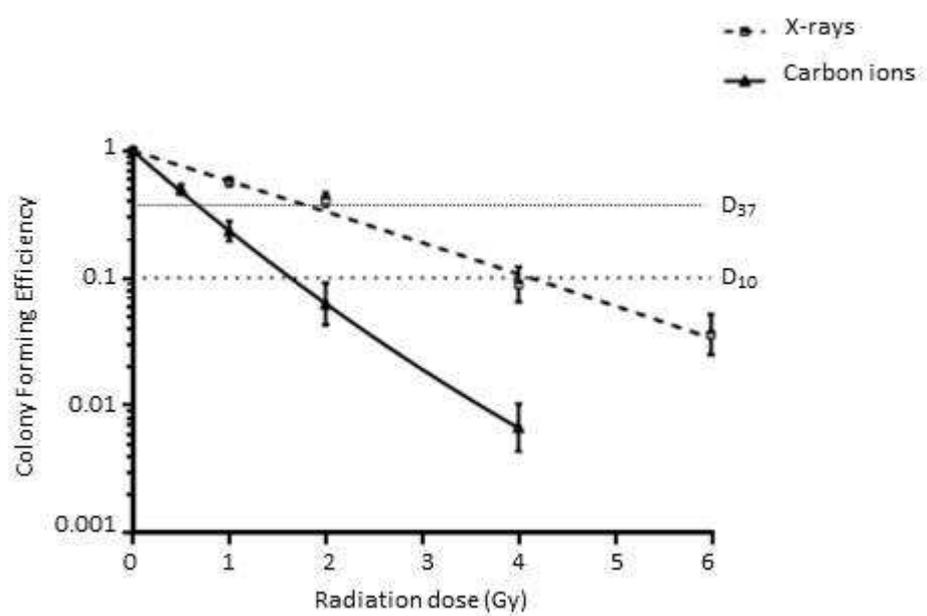
B: Cells were sham-treated or irradiated with X-rays or Carbon ions in 3D culture and collected 1 to 96h following t_0 . The western blot analysis of H2A.J, p21 and COX-2 proteins was used for the scoring of senescence induction in the samples. Data are presented as a percentage of senescent (+/+/+/+) or non-senescent models regardless of the time post-treatment. The y-axis represents the percentage of 3DCaM with a specific protein

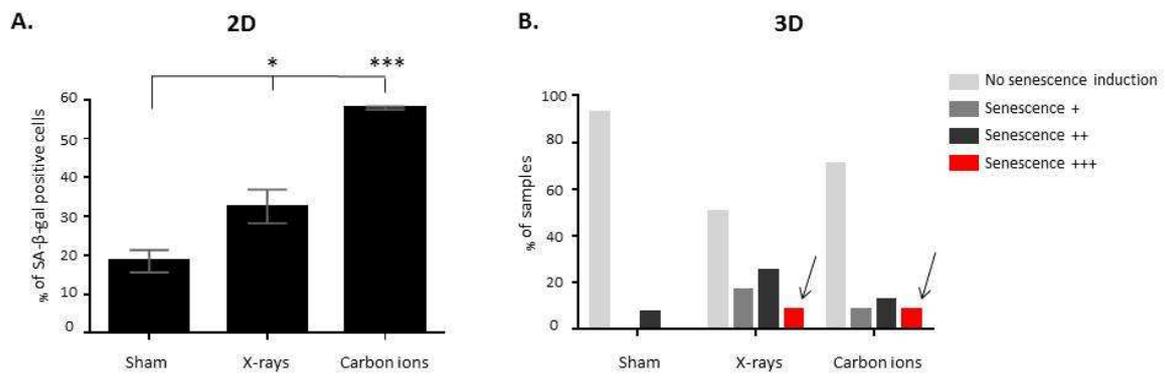
expression pattern related to the total of analyzed samples in the indicated group (total of 14 samples for the sham-treated group, 24 samples for X-rays irradiated group and 24 samples for carbon ions irradiated group). "No senescence induction" corresponds to H2A.J negative samples. "Senescence +" relates to samples expressing H2A.J only. "Senescence ++" corresponds to samples expressing H2A.J and either p21 induction or COX-2 downregulation. "Senescence +++" corresponds to samples expressing H2A.J and both p21 induction and COX-2 downregulation. The whole qualitative analysis is represented in supplementary figures 4 and 5.

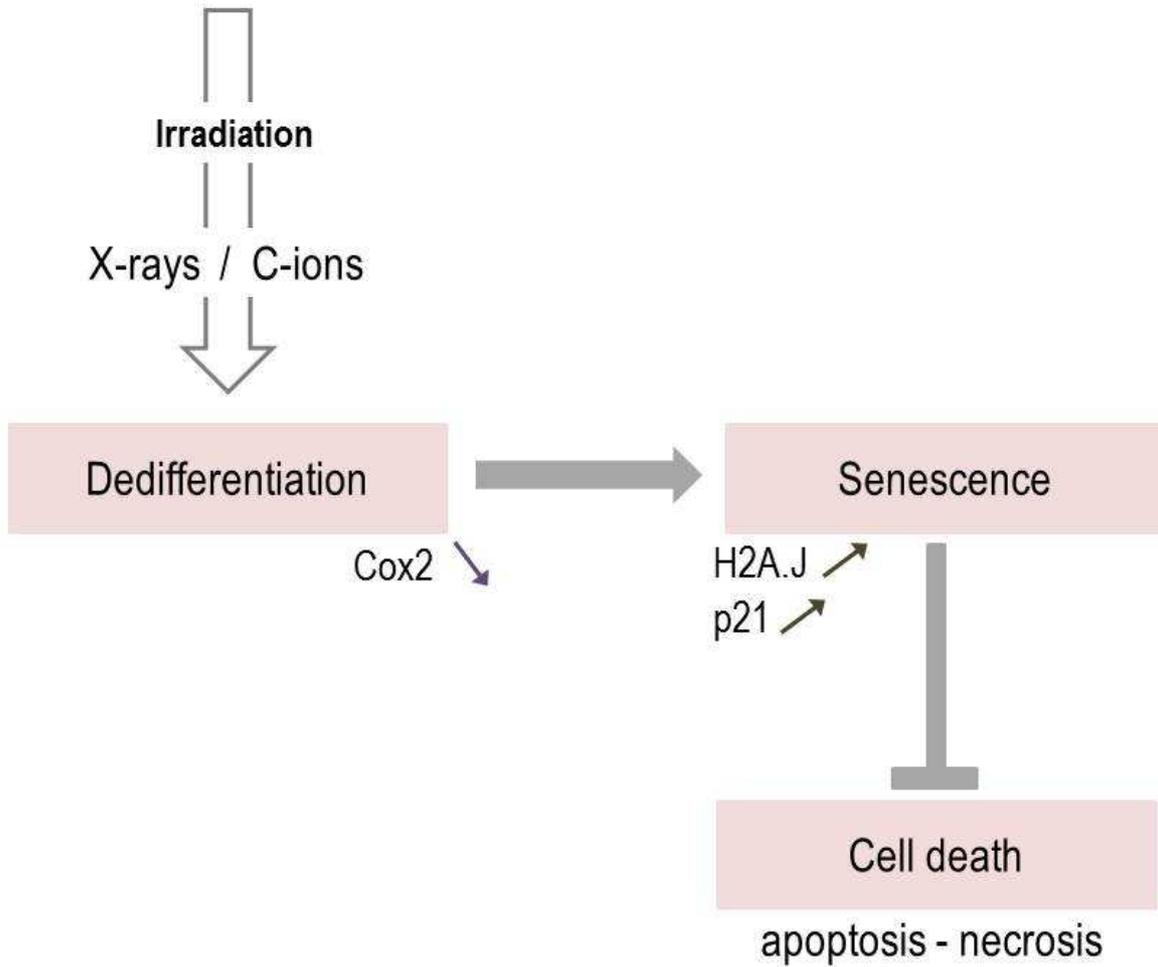
Figure 4: Model of radiation-induced chondrosenescence. Irradiation of 3DCaM with X-rays or C-ions induced p21 and H2A.J proteins upregulation associated with a downregulation of COX-2. This phenotype was associated with a radiation-induced senescence and loss of differentiation. The induction of senescence is most probably responsible for cell death resistance.

Table 1: Radiation survival curve characteristics for HAC cells cultured in 2D.

Radiation quality	Energy	LET (keV/ μ m)	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	R ²	D ₁₀ (Gy)	RBE ₁₀	D ₃₇ (Gy)	RBE ₃₇	SF ₂ (%)
X-rays	225 kV	< 1	0.542 \pm 0.118	0.004 \pm 0.022	0.723	4.1	/	1.8	/	33.3
Carbon ions	75-95 MeV/a	~ 33	1.512 \pm 0.205	-0.064 \pm 0.057	0.794	1.6	2.6	0.7	2.6	6.3





**3D cartilage model
(3DCaM)**

ACCEPTED

RESEARCH ARTICLE

Open Access



In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma: a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact

Dounia Houria Hamdi¹, Sofia Barbieri^{1,2}, François Chevalier¹, Jean-Emmanuel Groetz³, Florence Legendre⁴, Magali Demoor⁴, Philippe Galera⁴, Jean-Louis Lefaix¹ and Yannick Saintigny^{1*}

Abstract

Background: The benefit of better ballistic and higher efficiency of carbon ions for cancer treatment (hadron-therapy) is asserted since decades, especially for unresectable or resistant tumors like sarcomas. However, hadron-therapy with carbon ions stays underused and raises some concerns about potential side effects for patients. Chondrosarcoma is a cartilaginous tumor, chemo- and radiation-resistant, that lacks reference models for basic and pre-clinical studies in radiation-biology. Most studies about cellular effects of ionizing radiation, including hadrons, were performed under growth conditions dramatically different from human homeostasis. Tridimensional *in vitro* models are a fair alternative to animal models to approach tissue and tumors microenvironment.

Methods: By using a collagen matrix, standardized culture conditions, physiological oxygen tension and a well defined chondrosarcoma cell line, we developed a pertinent *in vitro* 3D model for hadron-biology studies. Low- and high-Linear Energy Transfer (LET) ionizing radiations from GANIL facilities of ~ 1 keV/ μm and 103 ± 4 keV/ μm were used respectively, at 2 Gy single dose. The impact of radiation quality on chondrosarcoma cells cultivated in 3D was analyzed on cell death, cell proliferation and DNA repair.

Results: A fair distribution of chondrosarcoma cells was observed in the whole 3D scaffold. Moreover, LET distribution in depth, for ions, was calculated and found acceptable for radiation-biology studies using this kind of scaffold. No difference in cell toxicity was observed between low- and high-LET radiations but a higher rate of proliferation was displayed following high-LET irradiation. Furthermore, 3D models presented a higher and longer induction of H2AX phosphorylation after 2 Gy of high-LET compared to low-LET radiations.

Conclusions: The presented results show the feasibility and usefulness of our 3D chondrosarcoma model in the study of the impact of radiation quality on cell fate. The observed changes in our tissue-like model after ionizing radiation exposure may explain some discrepancies between radiation-biology studies and clinical data.

Background

Emerging protocols of radiation-therapy (RT) with charged particles (protons or heavier ions than helium ions), in advanced medical facilities have widely changed the way of thinking about local tumor control and impact on healthy tissues. Indeed, charged particle-therapy (hadron-therapy) has the advantage of an excellent beam ballistic and a minimal exit dose after energy deposition

in the target volume, and hence better sparing of critical structures in the vicinity of the tumor [1]. Unlike photons, protons and heavy ions exhibit a depth-dose distribution profile characterized by the Bragg peak, a sharp rise in energy deposition at the end of their range with a steep dose falloff downstream. However, the ratio of dose at the Bragg peak to that in the entrance region is higher for heavy ions [2]. Furthermore, compared to photons and protons, heavy ions have a higher Linear Energy Transfer (LET). Because high-LET radiation is densely ionizing, the correlated DNA damages within one cell occur more often so that it becomes more difficult for the cell to repair the damage, leading to a markedly increased efficiency of cell

* Correspondence: yannick.saintigny@cea.fr

¹LARIA-IRCM-DSV-Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, CIMAP, GANIL, Bd Henri Becquerel, BP 55027, 14076 Caen, cedex 05, France

Full list of author information is available at the end of the article

killing. In addition, heavy ions have less dependency on cell cycle and oxygen tension. Indeed, a particle beam with a high-LET (LET $\sim 100 \pm 20$ keV/ μm) is required to meet an optimal biological effectiveness [1]. Thus, RT with heavy ions such as carbon ions represents an attractive radiation modality, which combines the physical advantages of protons, with a higher radiobiological effectiveness. Thanks to such improved biological effectiveness, these technologies are expected to reduce frequency and severity of radiation morbidity. However, the tremendous amount of combination of radiation quality (LET, energy, dose rate, dose) and tissue biological status (co-morbidity factors, genetic background, O₂ tension) does not simplify the building of a relevant model for exposure of healthy tissues or tumors during RT [3]. Therefore, it is necessary to develop new tools in order to optimize the use of hadron beams in cancer therapy either in the development of new instruments for beam control and dosimetry or in the understanding of the biological effects of hadrons on healthy tissue and various kinds of tumor.

Chondrosarcoma (CHS) is a malignant skeletal tumor with cartilaginous differentiation (dissimilar from other primary skeletal tumors) and represents the second most common primary bone tumor in adults, generally arising in the fourth decade. It is a heterogeneous group of tumors that have in common the production of chondroid matrix. Conventional CHS subgroup represents ~ 85 % of total cases and can be subdivided in low-grade (I), intermediate-grade (II) or high-grade (III) based on histology [4]. Primary treatment is surgical but, due to the location of tumors close to critical structures (abdomen, cranial and spinal nerves), the complete resection is rarely possible. Indeed, CHS is considered as a chemo- and radiation-resistant cancer, needing high dose RT in inoperable or incompletely resected tumors [2]. Hadron-therapy has been applied to the treatment of low- and intermediate-grade CHS at different locations, with very promising results [2, 5, 6]. However, prospective randomized trials comparing different RT modalities are still needed to validate the superiority of one treatment for a given indication. The understanding of the impact of low- versus high-LET beams on normal and tumor tissues is, then, important to enhance the knowledge and serve clinical use of hadrons.

To date, most current CHS animal models consist in the subcutaneous xenografting of CHS cell lines or human tumor tissue [7]. Three orthotopic CHS mouse models were published recently [8–10] using CHS human cell lines, but there is no transgenic mouse model for this disease. Considering the lack of radiation-biology studies on CHS, in contrast with the existence of a subset of medical data confirming the effectiveness of hadrons, and the absence of an *in vivo* reference model, we developed a new

CHS three-dimensional (3D) model in order to mimic *in vivo* microenvironment. Indeed, over the past sixty years, two-dimensional monolayer cells (2D) cultured in atmospheric oxygen tension (20 % O₂, referred as normoxia) have been considered as a gold standard in cell biology and more specifically in radiation-biology studies. However, the 3D environment [11] and oxygen tension [12] have a major impact on cellular response to ionizing radiations (IRs). Basic 3D cultures of CHS cells have been previously used for drug testing but chondrogenic properties of type I/III collagen [13], and physioxic culture conditions were not taken into account as demonstrated previously [14, 15]. Indeed, in a previous study, P. Galera's team proposed a new 3D cartilage model (3DCaM), relevant for arthritis analysis [15]. They used a 3D scaffold composed of cross-linked type -I and -III collagen, and successfully handled this matrix with Articular Chondrocytes (AC), isolated from human donors. As compared with conventional *in vitro* 2D culture, they showed the advantages of this 3D scaffold, in association with chondrogenic factors and physiological oxygen tension (2 % O₂, referred as physioxia), to allow cell re-differentiation and natural cartilage matrix synthesis. It should be noted that cartilage is the only avascular tissue of human body explaining the low O₂ tension of this tissue [16, 17].

Using the most characterized grade II CHS cell line (SW1353), a standardized chondrocyte medium, a chondrogenic factor (BMP-2), physiological oxygen tension (2 % O₂) and the same collagen scaffold [15, 18], we report here the first 3D CHS model (3DCM) applied to radiation-biology studies. We used two different IRs; accelerated ¹⁸O ion beam as a high-LET radiation, comparable to the LET of carbon ions beam delivered into the tumor volume (Spread-Out Bragg Peak, SOBP) during hadron-therapy [19], and X-rays as a low-LET radiation (control). We used a single 2 Gy dose and LET distribution profile of ions was calculated in order to ascertain a homogenous irradiation of 3DCM. Radiation-induced cell death was assessed with our 3DCM and canonical clonogenic assay in 2D culture as a reference. Ki67 proliferation index and gamma-H2AX kinetic were carried out to demonstrate the feasibility and the proof of usefulness of 3DCM in hadron-biology and the impact of radiation quality on proliferation and DNA double strand breaks (DSBs) repair.

Methods

Reagents and antibodies

SW1353 CHS cell line, human Articular Chondrocytes (AC) and the following culture media were purchased from CellSystems (Troisdorf, Germany); Chondrocyte Growth Medium w/o Phenol Red (#411PR-500), Chondrocyte Basal Medium w/o Phenol Red w/o FBS (#410PR-500) and Chondrocyte Growth Medium w/o Phenol Red w/o FBS

(#411FPR-500). Collagen scaffolds were bought from Symatase Biomateriaux (Chaponost, France), BMP-2 (Bone Morphogenic Protein-2) from R&D Systems (Minneapolis, USA), Toxilight™ assay from Lonza (Basel, Switzerland), Digitonin from Promega (Madison, USA), T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent), Halt Protease Inhibitors Cocktail 100 X, Halt Phosphatase Inhibitors single-use Cocktail 100 X, anti-GAPDH (#11335232), anti-rabbit HRP-coupled (#31460) and anti-mouse HRP-coupled (#31430) antibodies from Thermoscientific (Waltham, USA), anti-H2AX phosphoserine 139 (#05-636) and anti-Ki67 (#AB9260) antibodies, ECL classico/crescendo and Accutase™ from Merck Millipore (Darmstadt, Germany), DAB (Diaminobenzidine) from Life technologies (Carlsbad, USA).

Cell cultures

All the data reported in this manuscript have been collected from commercially available human healthy chondrocytes and CHS cells used in compliance with the Helsinki Declaration. CellSystems Company (Troisdorf, Germany) and its supplier, Cell Applications Company (San Diego, USA), follow bioethics guidelines to comply with the Helsinki Declaration.

The use of human cells by our Institute and Laboratory was approved by the French Ministry of Research under the CODECOH reference: DC-2008-228.

From Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 % FBS and antibiotics (100 U/mL of penicillin V, 100 µg/mL of streptomycin), cells were gradually adapted to a standardized Chondrocyte Growth Medium (#411PR-500). Cells were checked for Mycoplasma contamination and aliquots frozen for further experiments. During cell expansion (2D culture), cells were seeded at 1.3×10^4 cells/cm² in 75 cm² culture flasks and maintained at 37 °C in a humid atmosphere (95 % air, 5 % CO₂). Instead of trypsin, Accutase™ was used as a cell detachment reagent. SW1353 were passaged twice a week, not more than ten times.

For 3D experiments, SW1353 cells were grown in collagen scaffolds (Fig. 1) as described previously for Articular Chondrocytes (AC) [15, 18]. These scaffolds were prepared by Symatase Biomateriaux (Chaponost, France) and are composed of native type I collagen (90–95 %) and type III collagen (5–10 %) from calf skin. They were cross-linked using glutaraldehyde to increase their stability and sterilized with γ -irradiation [18, 20]. They were punched with a skin biopsy punch (Laboratoires Stiefel, France) as discs of 5 mm diameter and 2 mm thickness (which corresponds to a volume of 0.04 cm³). Their pore size is around 100 nm [18].

P. Galera's team model was adapted for radiation-biology experiments but instead of DMEM, we used a 3D Chondrocyte Medium (#411FPR-500) supplemented with 2 %

FBS. Briefly, cells were seeded onto the scaffold at 4×10^5 cells/scaffold in 96-well culture plates and incubated at 37 °C and 5 % CO₂. One hour later, 100 µL of the previous medium supplemented with BMP-2 (50 ng/mL) were added to the well and cells were incubated in physioxia (2 % O₂) in a Heracell™ 150i Tri-Gas Incubator, for 7 days to obtain a 3DCM. The medium was changed twice a week.

Cell cycle analysis

Cell cycle distribution analysis was performed in 2D culture. SW1353 cells were plated at subconfluency in T25 culture flasks then placed in the incubator for 6 h. Cells were then harvested and centrifuged at 800 rpm for 5 min. Cell pellet was washed in PBS, fixed in ethanol 75° then stored at 4 °C until analysis. Briefly, cells were centrifuged at 2000 rpm for 5 min, and the cell pellet resuspended in PBS before staining. The remaining pellet was gently resuspended in 500 µL DNA Prep Stain and 50 µL DNA Prep LPR (DNA Prep Reagent kit, Beckman Coulter). Samples were incubated in the dark for 15 min and a minimum of 1×10^4 cells per sample were analyzed using GALLIOS flow cytometer (Beckman Coulter, Pasadena, USA). FlowJo analyzing software (Ashland, USA) was used. Experiments were repeated four times and data expressed as mean \pm Standard Error on the Mean (S.E.M.).

Low-LET irradiation

Low-LET radiation exposure was performed, either at the CLCC (Centre de Lutte Contre le Cancer) François Baclesse (Caen, France) or at Cyceron facility (Caen, France). We used respectively, a Saturne 15 (15 MV, 6 mA, Siemens) medical linear accelerator producing X-rays or an X-RAD 225 Cx (225 kV, 13 mA, PXi) research X-rays generator intended to cellular and small animal irradiation. The X-RAD 225 Cx is characterized by a first half value layer of 0.9 mm of copper. X-rays of this beam produce low energy secondary electrons with dE/dX ranging from 0.26 to 2.25 keV/µm with a mean value of 1.65 keV/µm (instead of 0.2 keV/µm for MV beams). Absolute dosimetry of the irradiator was performed following AAPM TG-61 protocol [21] and the dose delivered to cellular samples was measured thanks to ionization chamber measurements and thermo luminescent dosimeters (TLD). Except for survival curves, the canonical single dose fraction in conventional radiotherapy of 2 Gy was used for all experiments at a 2 Gy/min dose rate.

Irradiation of 2D cells was performed as follows: cells were seeded 48 h prior to irradiation, at a density of 2.4×10^4 /cm² in 12.5 cm² culture flasks (BD Falcon™), so that they reach subconfluency at the time of irradiation. One day later, they were incubated in a Tri-Gas Incubator (2 % O₂) for physioxic irradiation

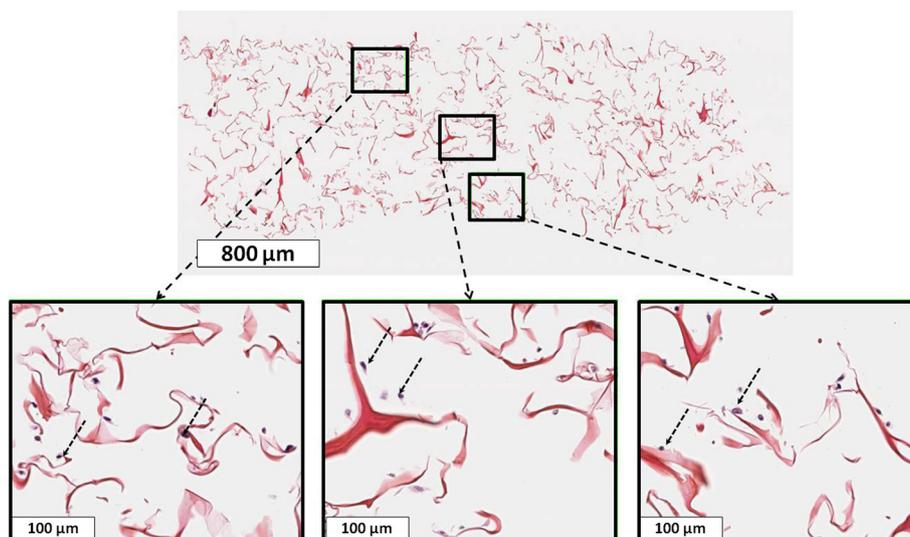


Fig. 1 Homogenous cell distribution in the 3D scaffold. Top: A representative image of a paraffin-embedded, HES colored 8 μm section of a 3DCM. Bottom: Magnified images (from top image) corresponding to the proximal (left), internal (middle) and distal (right) zones of the scaffold. The collagen fibers are colored in pale red and the cells, indicated with dotted arrows, in violet

environment. Immediately prior to irradiation, flasks were completely filled with 2D Chondrocyte Basal Medium (#410PR-500) previously balanced with 2 % O_2 , and then sealed in order to maintain a constant oxygen tension. Then, they were placed on a horizontal plate within the X-ray generator (Fig. 2a). Mock-irradiated cells were handled in the same conditions without being irradiated. Following irradiation, cells were maintained in the Tri-Gas Incubator (2 % O_2) in fresh Growth Medium previously balanced with 2 % O_2 for further cell survival experiments.

Irradiation of 3DCM was performed as follows: the 96-well plates containing the 3DCM were sealed with parafilm in order to maintain 2 % O_2 tension during irradiation and put on the horizontal plate within the X-ray generator (Fig. 2a). Mock-irradiated cells were handled in the same conditions without being irradiated. Following irradiation, medium was changed. Samples were collected at different time points, rinsed once in Dulbecco's PBS then stored either at -80°C for western blot analysis or formalin-fixed for immunohistochemistry-paraffin (IHC-p). Culture supernatant (100 μL) was also collected and stored at -80°C for cell toxicity assay.

High-LET irradiation

High-LET radiation exposure was performed using the D1 IRABAT high-energy scanning beam line at the Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL, Caen, France). The dosimetry and calibration beam was done by CIMAP (Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique) as previously described [22, 23]. Accelerated ^{18}O ions (50 MeV/a, < 0.1 nA)

were used at a dose rate of ~ 1 Gy/min which corresponded to a mean fluency of 1.22×10^5 ions/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$). A minimum of 30 s irradiation time was used in order to ensure a homogeneous dose on each sample. Except for survival curves, 2 Gy dose was used for all the samples.

Irradiation of 2D cells was performed as follows: cells were prepared similarly to X-ray irradiation protocol (see above). Subconfluent adherent cells were irradiated in an upright position at Room Temperature (Fig. 2b). Control flasks were mock-irradiated. Following irradiation, cells were maintained in the Tri-Gas Incubator (2 % O_2) in fresh Growth Medium previously balanced with 2 % O_2 for further cell survival experiments.

3DCM were maintained in a vertical position in a 2 mL polypropylene tube (Eppendorf®), with a sterile sample holder consisting of a glass cylinder as shown in Fig. 2b. The tube was filled with 3D Chondrocyte Medium previously balanced with 2 % O_2 and irradiated in an upright position. In this configuration, collagen scaffolds are laid-out against the polypropylene tube thanks to the sample holder. Following irradiation, medium was changed and samples collected similarly to low-LET irradiated samples.

LET distribution profile in the collagen scaffold

The assessment of the LET distribution profile for ^{18}O ions is only available through a calculation code, based on the Monte-Carlo method, which simulates the transport of particles and their interactions into matter. Two calculation codes were used, with the appropriate description of heavy ion physics: FLUKA (FLUktuierende KAskade) [24, 25] from CERN (European Organization for Nuclear Research) and INFN (Istituto Nazionale di

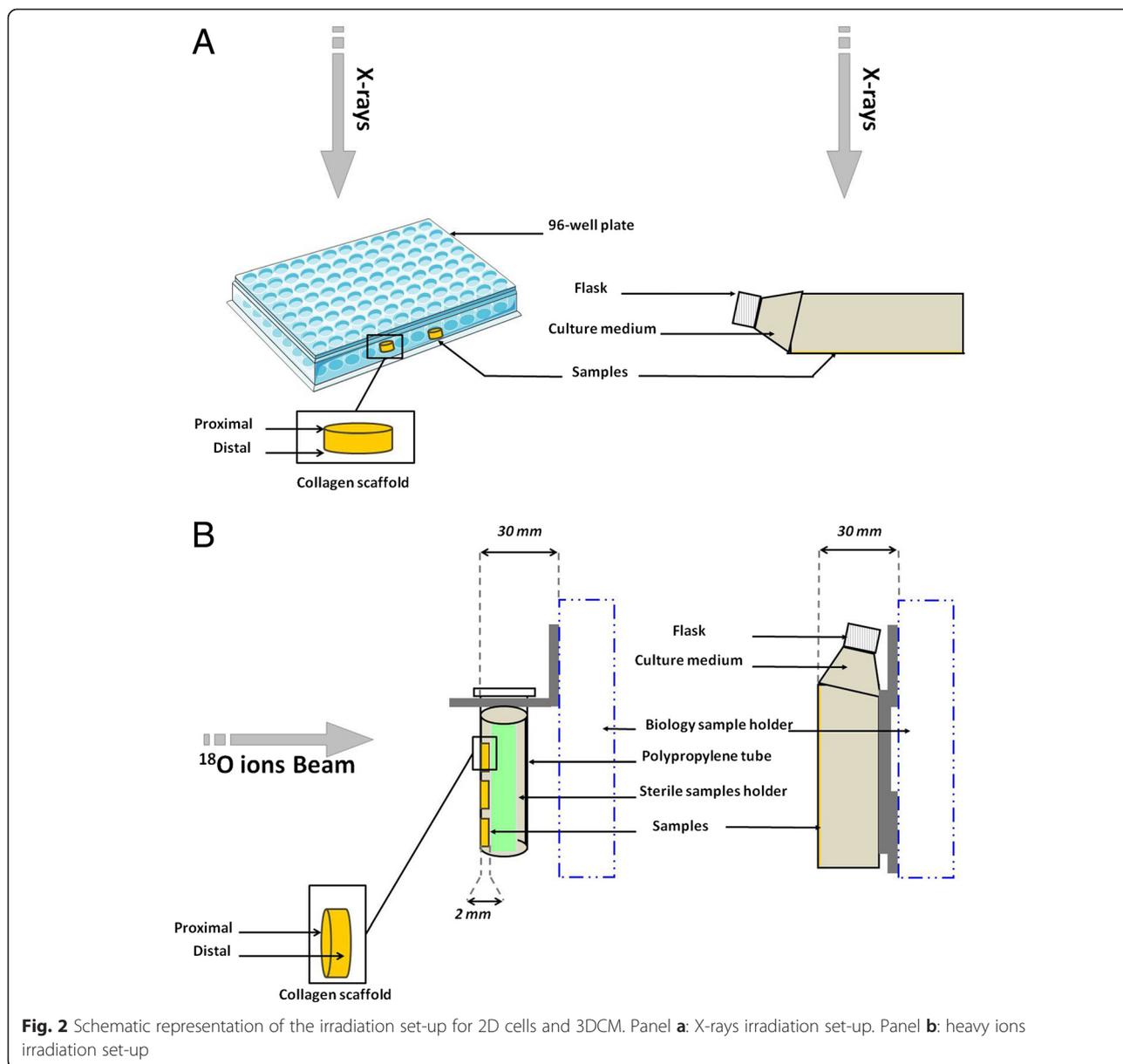


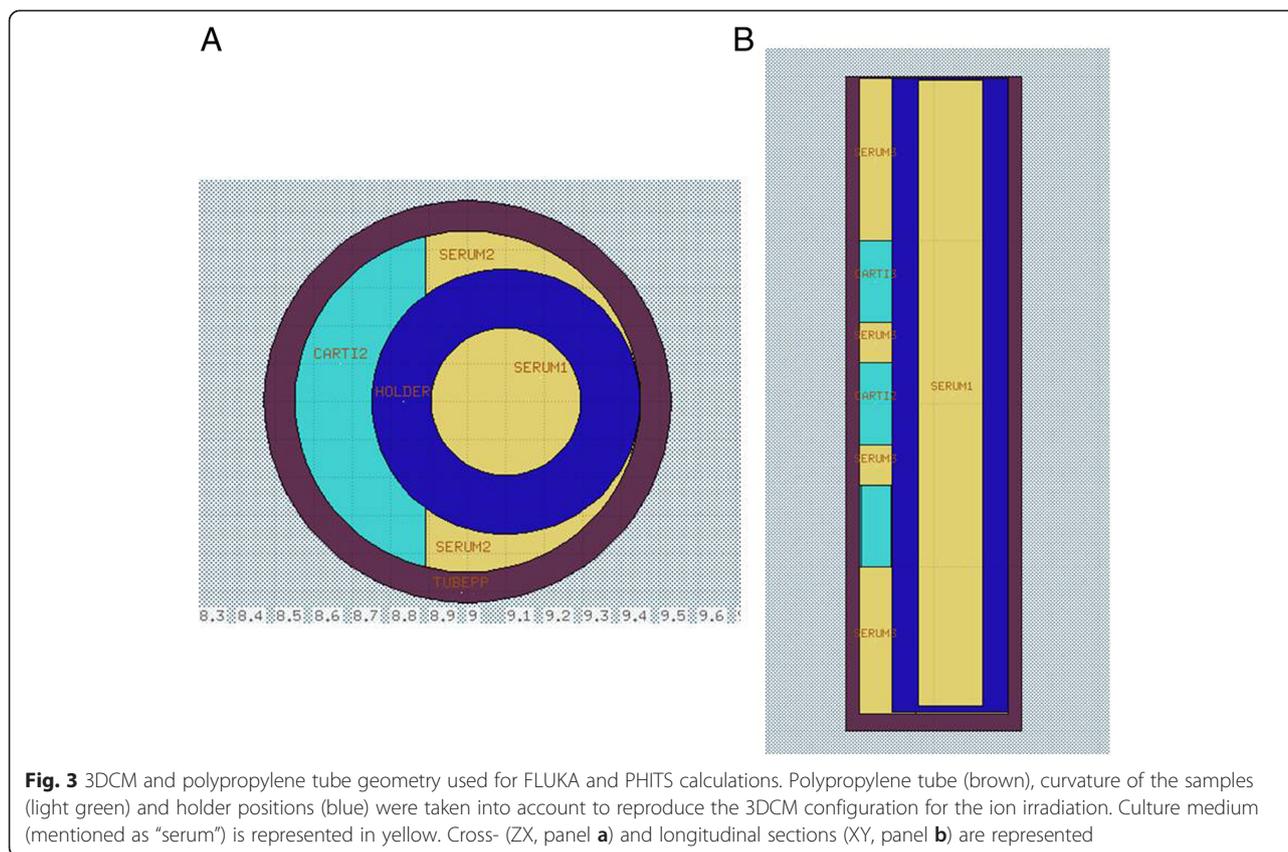
Fig. 2 Schematic representation of the irradiation set-up for 2D cells and 3DCM. Panel **a**: X-rays irradiation set-up. Panel **b**: heavy ions irradiation set-up

Fisica Nucleare) and PHITS (Particle and Heavy Ion Transport code System) [26] from JAERI (Japan Atomic Energy Research Institute). The irradiation beam line IRABAT was modeled, with its main features, such as splitter; iron window to produce X-rays for fluence estimation; mylar, gold and aluminium foils for ion distribution. A particular attention has been paid to reproduce the 3DCM configuration for the ion irradiation: polypropylene tube, curvature of the samples and holder position as shown in Fig. 3a and b. The same geometry was used for both Monte-Carlo codes. Energy cut-off, i.e. minimum energy for which a particle is tracked, was set to 1 keV. The LET distribution was calculated on the front side of the model (called proximal), on its rear side (called distal) and into the 3DCM model. In this study,

only the LET distribution of incident ions was calculated. The LET from other particles, such as alpha particles, protons, delta electrons, fragmentation nuclei, were not calculated. Further calculations will be performed to determine the contribution of these particles [27] to the total dose into the 3DCM model.

CFE: Colony Forming Efficiency (2D culture)

Clonogenic assessment in 2D was done by colony forming efficiency assay as previously described [28, 29]. Sub-confluent 2D cells were irradiated as described above. The cells were left untreated from 12 to 16 h post-irradiation, then trypsinized, counted and plated in six-well plates (BD Falcon™) at two densities (100 or 1000 cells). The cells were grown for 12 days without medium



change, then fixed and stained with crystal violet (3 % w/v in 20 % ethanol solution). Only colonies of 50 cells or more were scored. The experimental survival curve data were fitted to the linear quadratic equation [29]: $-\ln(S) = \alpha D + \beta D^2$. S is the surviving fraction at a given dose D . This calculation takes into account the mock-irradiated condition. α and β are constants determined by fitting the data to the model using the nonlinear regression program of the Prism software package (Graphpad Software, San Diego, CA). D_{10} (lethal dose for 10 % survival), D_{37} (lethal dose for 37 % survival) and SF_2 (surviving fraction after a 2 Gy irradiation) values were determined from the fitted curve. Experiments were performed in triplicate and repeated from 2 to 6 times according to beam time availability. α and β are expressed as mean \pm S.E.M.

Canonical Relative Biological Effectiveness (RBE) was calculated by dividing D_{10} of low-LET radiation by the corresponding parameter following high-LET irradiation. RBE was also calculated using D_{37} .

Cell toxicity assay

Cell toxicity was assessed on 3DCM culture medium using Toxilight™, a bioluminescent cytotoxicity assay designed to quantitatively measure the release of Adenylate Kinase (AK) from damaged cells. Manufacturer’s instructions

were followed. Briefly, in a 96-white well plate (Greiner bio-one®), 20 μ L of thawed cell culture supernatants were mixed to 100 μ L/well of freshly prepared AK working solution. Plates were incubated for 5 min at room temperature before measurement. Flexstation 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at the Proteogen platform of Université Caen Basse-Normandie (UCBN) was used and programmed to 1 s integrated reading of appropriate wells. Digitonin detergent was used as a positive control (65 pM) as recommended by the manufacturer. Data were collected in RLU (Relative Light Unit).

Immunohistochemistry-paraffin (IHC-p) staining

Formalin fixed 3DCM underwent a classical immunohistochemistry protocol (for paraffin sections), but manually performed to maintain scaffold integrity and avoid material loss. 3DCM were dehydrated in a graded series of ethanol on the first day and paraffin-soaked overnight. They were then paraffin-embedded in an upright position at the Pathology department of the CLCC François Baclesse. Eight μ m sections were cut with a microtome and mounted on Superfrost™ Plus microscope slides, precisely, to avoid counting the same cells. The slides were dried overnight at 37 °C and stored at room temperature.

IHC staining was carried out overnight in a humidified chamber using monoclonal antibody directed against Ki67 diluted to 1/100 in 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) in 0.5 % Tween PBS (TPBS). Then, 1 h incubation with HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (diluted to 1/100 in 1 % BSA in TPBS) was done. Sections were then revealed with DAB and mounted using Eukitt mounting medium. No antigen retrieval was performed and as control, a slide without primary antibody incubation was realized.

The slides were observed with a Vanox-S Olympus light microscope (Tokyo, Japan) using a 40x lens. For each time point, around 200 nuclei were counted by the same experimenter, choosing 2 to 3 fields per slide (on a total of 5–10 slides). Only clearly stained cells were scored as DAB positives. Mock-irradiated sample is expressed as mean \pm S.E.M from two independent experiments.

HES (Hematoxylin, Erythrosine, Safran) classical staining was also used to assess general organization of the collagen scaffold and cell distribution. Image acquisition was achieved, either with a Nikon Coolscope scanner (Tokyo, Japan) at the Pathology department of CLCC François Baclesse or Aperio Scanscope CS scanner (Leica biosystems, Nussloch, Germany) at HIQ platform of UCBN (Caen, France). Representative images were shown in the figures.

Cell lysis protocol and western blotting

3DCM were disrupted using the following cell lysis protocol at 4 °C. Glass beads of 100 μ m diameter (25 mg, Dominique Dutcher, Brumath, France) were added to a round-bottomed 2 mL Eppendorf tube and mixed with 40 μ L of a freshly prepared lysis buffer [T-PER (1 mL), NaCl (850 mM), Halt Protease Inhibitors Cocktail (2X v/v), EDTA (2X v/v), Halt Phosphatase Inhibitors single-use Cocktail (2X v/v)]. One sample was then quickly thawed and mixed with lysis buffer and glass beads at 4 °C for 15 min using a disruptor GENIE™ (Dominique Dutcher). This cell lysis step was followed by addition of 10 μ L Laemmli buffer (5X) and 5 min mix in the disruptor, to extract the proteins of the sample. This was followed by a protein denaturation step (sample heated twice at 100 °C for 5 min). After a quick centrifugation, 40 μ L of the supernatant were collected. The sample underwent a second cycle of protein extraction-denaturation and 10 μ L of extract were collected again. To estimate an extraction yield, the above protocol was performed twice on the same test sample, and the ratio of both extracts was calculated using ECL signal (the yield is expressed as mean \pm S.E.M from two experiments).

Half of the extracted sample (25 μ L) underwent SDS-Poly-Acrylamide 10 % Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and was transferred to a nitrocellulose membrane.

Membranes were blocked for 1 h in 5 % milk in 0.05 % tween-TBS (TTBS) and incubated overnight at 4 °C with anti-H2AX phospho-serine 139 (gamma-H2AX) or anti-GAPDH as a loading control, both diluted at 1/1000 in 1 % milk TTBS. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse secondary peroxidase-conjugated antibodies (1/5000 diluted in 1 % milk TTBS). Detections were assessed on X-ray films (GE healthcare) using the ECL method. Image J software was used to quantify the non-saturated signals. Data were expressed as relative amount of gamma-H2AX compared to GAPDH. Evaluation of RBE (E_{RBE}) was expressed as the relative amount of gamma-H2AX protein following high-LET irradiation divided by the same parameter post low-LET irradiation at the same time point.

Cell lysis and protein extraction using 2D cells were performed as described for 3DCM. Cell counting was used to adjust lysis and Laemmli buffer volumes. Around 0.25 million cells per sample were used to perform the western blot.

Results and discussion

SW1353 cells characterization

The therapeutic use of hadrons has mainly focused on low- and intermediate-grade CHS [2]. In this study, we focused on intermediate-grade (II) CHS as they show relative radioresistance to photons, a metastatic potential and high recurrence rate but still maintain a cartilage phenotype [30]. SW1353, JJ012 and CH3573 are currently the most characterized conventional grade-II CHS cell lines [31]. Among them, SW1353 is the most extensively used and is considered as the gold standard among other cells. Indeed, 142 articles were found in Pubmed library: [SW1353 OR HTB-94] compared to 39 articles for [JJ012] or 1 article for [CH3573].

SW1353 cells were adapted from DMEM to a full standardized medium then amplified in a standard cell incubator (20 % O₂ tension, normoxia). However, 3DCM were cultivated under 2 % oxygen tension in order to mimic human in situ microenvironment for cartilage [16, 17]. Such condition, referred here as physioxia, was then applied to 2D irradiations or experimental assays. Untreated SW1353 cells in 2D culture show a doubling time of 23 h and a usual cell cycle distribution with 42.2 % (\pm 0.9), 35.2 % (\pm 1.2) and 22.5 % (\pm 0.8) of cells collected in G₀/G₁, S-phase and G₂/M phase's, respectively (Additional file 1: Figure S1).

3DCM were prepared by seeding 4 \times 10⁵ cells in each scaffold and culturing them 7 days in physioxia as described before [15]. After 7 days of maturation, about 1.5 \times 10⁵ of the seeded cells did not attach into the scaffold and were discarded by PBS washing. Cell distribution of attached cells throughout the scaffold was then analyzed. A representative image of

a paraffin-embedded, transversally cut, HES colored slide of a 3DCM is shown in Fig. 1. The three magnified images (bottom) showed a homogenous cell distribution in the proximal (bottom, left), internal (bottom, middle) and distal (bottom, right) zones of the scaffold (Fig. 1). This was comparable with the cell distribution observed in 3DCaM seeded with AC using Scanning Electron Microscopy [15] or IHC and light microscopy [18]. Grade II CHS as SW1353 cell line show poor cellularity in histological sections [4]. Thus, under cell culture conditions described here, we were able to grow a homogeneous 3DCM miming an intermediate grade CHS tissue cellularity.

To evaluate the proliferation ratio of SW1353 cells in the 3DCM, we measured Ki67 index by IHC-p. Indeed, Ki67 index was previously described as a potential marker to assess tumor grade in CHS and determine the prognosis of patients with grade-II CHS [32]. This endpoint was also used to evaluate the impact of different drugs on CHS proliferation in a rat orthotopic CHS model [33]. Cell counting was done by a single experimenter and to assess intra-individual variability, the same slide was counted three times on different days with a resulting standard deviation of 2.4 % (Table 1). After seven days of culture into the collagen scaffold, the proliferation index of SW1353 cell line was 33 % \pm 4 % (Table 2). This value is rather higher than the average index previously found in a retrospective study [32] on human CHS biopsy (14.7 % \pm 4.4 % for grade-II tumors), although an extended custom range from 1.1 % to 50.2 % was described [32]. These discrepancies between human *in vivo* CHS and *in vitro* 3DCM may be explained by the cell line used but also by biopsy undefined genetic background and/or IHC technical issues. Furthermore, using primary human AC from two healthy male donors (38 and 51 years old), with non-apparent pathology, we prepared 3DCaM [15] with the same protocol described for the 3DCM. In comparison to 3DCM, a 2-fold inferior mean proliferation index was measured (17.5 % \pm 4.5 %) in our conditions (Table 3). Such difference of proliferation indexes of primary chondrocytes and CHS cell line is consistent with human cartilage physiology [14, 16].

Irradiation set up, dosimetry and LET distribution

X-rays clonogenic assay experiments were performed with a 225 kV irradiator and a 15 MeV accelerator. Survival

Table 1 Evaluation of the intra-individual counting variability of the Ki67 proliferation index in the 3DCM

Counting	Ki67 index (%)	Standard deviation (%)
Day 1	28.3	2.4
Day 2	33.1	
Day 3	30.8	

Table 2 Ki67 proliferation index (%) 96 and 168 h following low-LET or high-LET irradiation

Radiation quality	Time post-irradiation (hrs)		
	0	96	168
Low-LET	33 \pm 4	21	27
High-LET		45	43

curve characteristics were almost identical with both devices (standard deviation < 10 %), a result which was previously described with different cell lines [34]. Subsequently, collected data were pooled. As X-rays beams were vertical, 2D culture flasks and 3DCM culture plates were maintained horizontal (Fig. 2a). On the contrary, heavy ion scanning beam from IRABAT line (GANIL) is horizontal (Fig. 2b). Thus, 2D culture flasks and tubes bearing 3DCM were then maintained in an upright position (Fig. 2b). However, in both conditions, flasks and 3DCM were fully filled with medium and irradiated in physioxia. Except for survival curves, SW1353 cells as 2D cultures or 3DCM were irradiated with 2 Gy of either X-rays (low-LET) or ^{18}O ions (high-LET) radiation. These two conditions were chosen to mimic a canonical fraction of conventional radiotherapy (low-LET) versus a fraction of hadron-therapy with carbon ions (high-LET). Indeed, the LET of ^{18}O accelerated ions (50 MeV/a) used in this study is approximatively of 103 \pm 4 keV/ μm which is comparable to the LET of SOBP of a carbon ions therapeutic beam [19].

Unlike X-rays, heavy-ions have a rapid energy deposition profile at the end of the track (Bragg peak). Calculations of the LET of ^{18}O ions (50 MeV/a) for the proximal and distal zones and into the 3DCM were performed using FLUKA and PHITS calculation codes as described above. The corresponding values, shown in Table 4, are expressed as mean \pm standard error. Using FLUKA, the calculated LET in the proximal and distal zones were 85.91 \pm 0.38 and 109.82 \pm 0.57 keV/ μm , respectively. Using PHITS, the LET values of 96.27 \pm 0.32 and 122.97 \pm 0.67 keV/ μm were calculated in the proximal and distal parts, respectively. These data reveal a difference of around 17 % between these two zones, regardless of the calculation method. Such variability is not surprising, considering the collagen scaffold thickness (2 mm). In addition, the proximal/distal LET distribution profile, shown in Fig. 4a and b, is also related to

Table 3 Ki67 proliferation index (%) in the 3DCaM using two healthy male donors

	Ki67 proliferation index in the 3DCaM
Donnor 1 (38 years old)	13.0
Donnor 2 (51 years old)	22.0
Mean \pm S.E.M	17.5 \pm 4.5

Table 4 LET values of ^{18}O ions in the proximal and distal zones and into the 3DCM

Calculation code	LET (keV/ μm)		
	Proximal zone	Into the 3DCM	Distal zone
FLUKA	85.91 ± 0.38	99.87 ± 0.21	109.82 ± 0.57
PHITS	96.27 ± 0.32	107.24 ± 0.11	122.97 ± 0.67

the curvature of the 3DCM set by the holder, which is used to maintain the scaffold in an upright position (Fig. 2b, Fig. 3a and b). This curvature has led to a variation in the thickness of 3DCM related to path of the incident ions. However, despite the scaffold thickness and irradiation geometry, only 17 % difference in LET was observed between front and rear sides of the 3DCM. These distribution profiles for the proximal and distal zones were not observed with a simulated flat geometry (not shown here). Moreover, as shown in Table 4, the

mean LET into the 3DCM is 99.87 ± 0.21 keV/ μm (range 85–120 keV/ μm) using FLUKA, and 107.24 ± 0.11 keV/ μm (range 95–135 keV/ μm) using PHITS. Taken together, these simulation data show that cells are homogeneously irradiated by oxygen ions in this collagen scaffold, taking into account our irradiation geometry.

Cell survival and proliferation post-irradiation

First, we estimated the clonogenic capacities (CFE) of SW1353 cells in standard 2D culture conditions (Table 5 and Additional file 2: Figure S2), as canonically performed in radiation-biology studies [35]. Exposure of 2D cells to low-LET and high-LET radiations revealed characteristic surviving fractions (Table 5). The low-LET survival parameters followed the two-hit target linear quadratic model (Additional file 2: Figure S2). In contrast, high-LET survival curves followed the one-hit target linear quadratic model ($\beta = 0$) (Additional file 2: Figure S2). As shown in

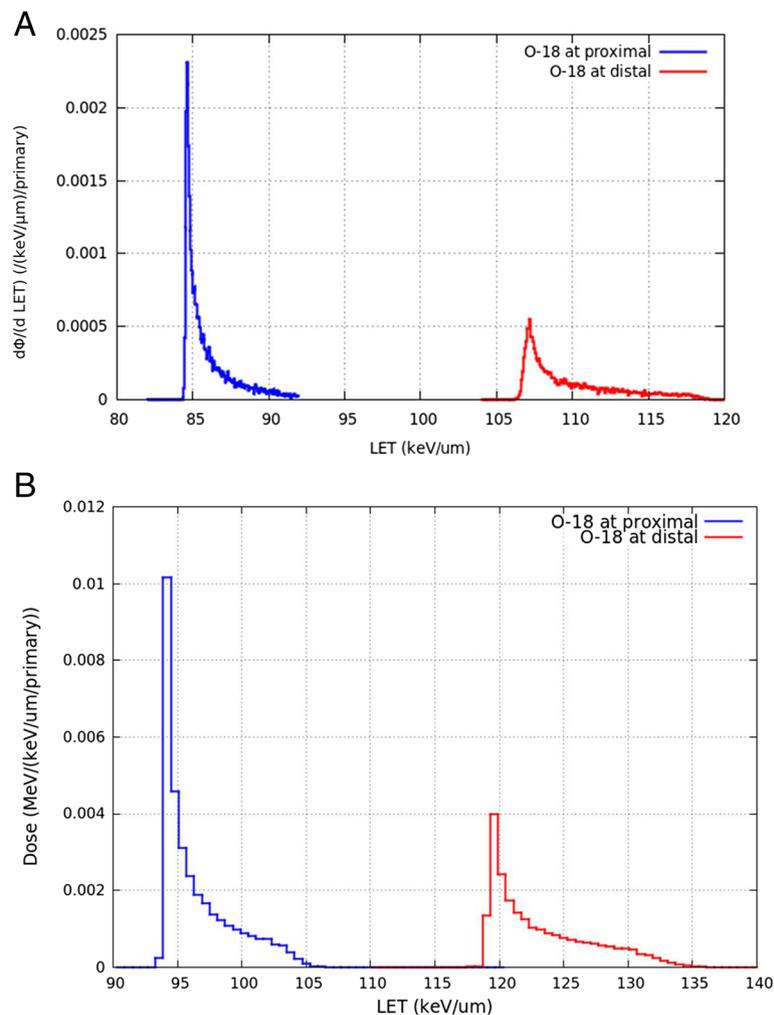


Fig. 4 LET distribution profile of ^{18}O ions in the proximal and distal zones of the 3DCM. FLUKA (panel a) and PHITS (panel b) calculation methods were used

Table 5 Radiation survival curve characteristics for SW1353 cells cultured in 2D

Radiation quality	Energy	LET (keV/ μm)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	R^2	D_{10} (Gy)	RBE_{10}	D_{37} (Gy)	RBE_{37}	SF_2 (%)
X-rays	15 MeV 225 kV	~ 1	0.145 ± 0.036	0.037 ± 0.005	0.900	6.2	/	3.6	/	64.6
^{18}O ion	50 MeV/a	103 ± 4	2.567 ± 0.217	0	0.804	0.9	6.8	0.4	9	<1

Table 5, the value of α -component was higher with high-LET irradiation ($2.567 \pm 0.217 \text{ Gy}^{-1}$) compared to low-LET irradiation ($0.145 \pm 0.005 \text{ Gy}^{-1}$), both with a satisfying goodness of fit ($R^2 = 0.900$ and $R^2 = 0.804$, respectively). Extrapolated D_{10} , D_{37} and SF_2 were respectively 6.2 Gy, 3.6 Gy and 64.6 % for X-rays, and 0.9 Gy, 0.4 Gy and less than 1 % for ^{18}O ions. Thus, not surprisingly, SW1353 in 2D culture were more resistant to low-LET radiation compared to high-LET. Canonical RBE calculation of ^{18}O ions survival relative to X-rays (2D culture) shows a ratio of 6.8 (D_{10}) whereas the ratio reach 9 when RBE is calculated from D_{37} (Table 5). These RBE values are concordant with a previous review of biological effectiveness of high-LET charged particles [19], considering a LET of $103 \pm 4 \text{ keV}/\mu\text{m}$.

Clonogenic capacities were not feasible using the 3DCM, so to estimate cellular characteristics within this model, cell death and proliferation were measured using adapted experimental strategies. Indeed, combined treatment of the mature 3DCM with collagenase and Accutase™ or trypsin did not allow cell extraction in order to perform clonogenic assay. Chondrosarcoma cell lines are known for producing extracellular matrix [7] which may explain the difficulty in extracting them from the scaffold. Cell death of SW1353 in 3DCM following irradiation was then assessed with the Toxilight™ cytotoxicity assay as described above. The viable cell fraction was estimated using the ratio of luminescence produced by irradiated sample relative to mock-irradiated sample. We do not highlight any cellular toxicity induction 48 or 96 h following a 2 Gy irradiation in the 3DCM (ratio from 0.9 to 1.0), regardless of the radiation quality (low- or high-LET), while ratio from 65 pM digitonin treatment used as positive control scored 5.5 (Table 6).

Proliferation index of SW1353 in 3DCM was measured by scoring Ki67 positive cells, as described above (Fig. 5, Table 2). The expression of human Ki67 protein is strictly associated with cell proliferation, present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2 and

mitosis) but absent from quiescent cells (G_0) [36]. However, it reflects the potential of cells to divide, but does not predict the actual division of these cells [37]. After 2 Gy of low- or high-LET radiation, this index was scored at day 4 and 7. We observed proliferation indexes of 21 % and 27 % in case of low-LET radiation, and 45 % and 43 % in case of high-LET, respectively (Table 1). This difference of proliferation index after low- or high-LET radiations may be explained by a higher number of cells arrested into the cell cycle (positive Ki67-cells arrested in G1, S, G2 or M phases) because of unrepaired clustered DNA damages. However, although these experiments will need to be deepened, we can hypothesize that there is still a fraction of cells in the irradiated 3DCM with a division potential. Indeed, it has been shown *in vivo* that such fraction of CHS cells in a quiescent step may contribute to the relative radioresistance of CHS to low-LET radiations [4].

Post-irradiation gamma-H2AX repair kinetic

Reproducible and effective protein extraction from the 3DCM was a technical challenge, as cellular protein extraction from collagen scaffold was not efficient using a standard protocol. Thus, we developed a new protocol using a cell disruptor system and specific glass beads, as described above. This protocol allows us to calculate an extraction yield of 94 % (± 4 %) from the quantification of western blot signal, showing the reproducibility and capacity of our protocol to extract and analyze low abundant proteins.

The phosphorylated form of the histone H2AX (gamma-H2AX) is implicated in the DSB signaling and repair processes specially after IR exposure [38, 39]. H2AX phosphorylation was thereby chosen to estimate post-irradiation repair kinetic of SW1353 cells in the 3DCM. To do so, western blot was performed on 3DCM following 1 h to 96 h of a 2 Gy dose of low- or high-LET radiation (Fig. 6 and Additional file 3: Figure S3). The gamma-H2AX positive probing (15 kD), was measured with a modulated intensity throughout the kinetic. Using GAPDH as loading control (Fig. 6a), we measured a 4-fold gamma-H2AX induction with low-LET radiation, 1 h post-irradiation compared to mock-irradiated sample in 3DCM (Fig. 6b). However, following this induction, low-LET irradiated samples display a decrease in gamma-H2AX expression and regain mock-irradiated level 6 h post-exposure. Such data show that low-LET induced DNA strand breaks seem to be repaired quickly in

Table 6 Cellular toxicity assay in 3DCM models following irradiation or digitonin treatment

	Mock (RLU)	Treated (RLU)	Ratio of luminescence relative to mock-treated sample
Digitonin 65 pM	4864	26490	5.5
Low-LET	7531	7193	1.0
High-LET	3313	2891	0.9

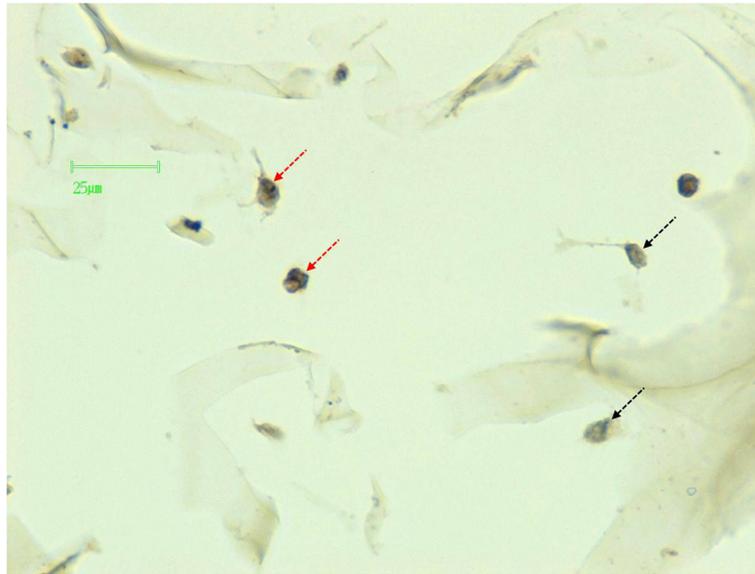


Fig. 5 Ki67 immunostaining in the 3DCM. A representative cross-section of IHC-p stained 3DCM, using an antibody directed against Ki67 protein. Positive cells are indicated with red dotted arrows and negative cells with black dotted arrows. Counting positive cells served to assess proliferation index in the 3DCM

3DCM as previously described for 2D cell culture [38]. Proliferation-associated gamma-H2AX phosphorylation may explain the second wave of gamma-H2AX induction between 12 h and 72 h after low-LET exposure [40, 41].

On the contrary, following high-LET irradiation, gamma-H2AX induction still increases after 1 h post-irradiation to reach a maximal at 12 h with a 10-fold

induction compared to the mock-irradiated sample (Fig. 6b). The gamma-H2AX expression then decreases slowly. This higher induction could be explained by the fact that high-LET radiations trigger more complex DNA damages that are harder to repair, compared to low-LET radiation as it has been already shown [42–44]. However, with 3DCM we show here that such higher gamma-H2AX

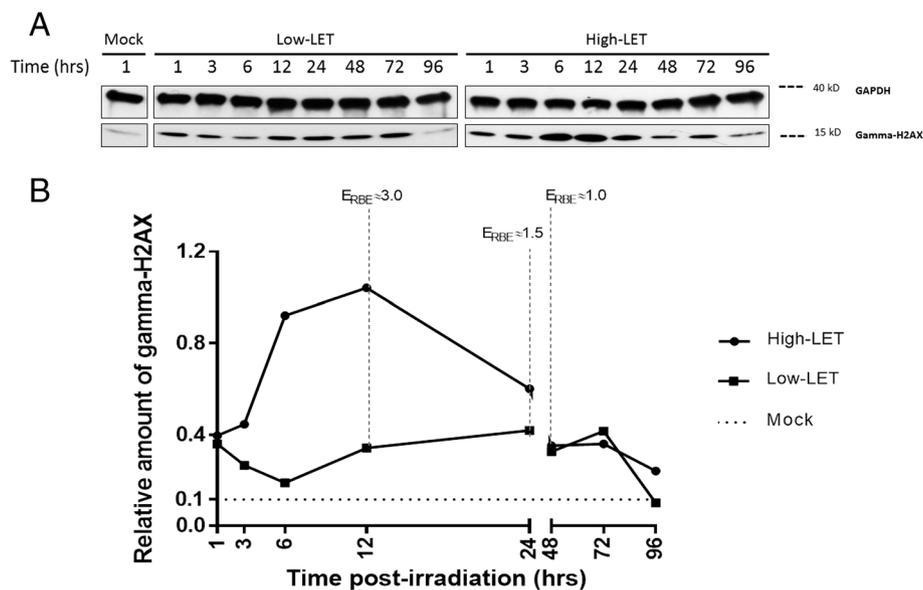


Fig. 6 Post-irradiation gamma-H2AX repair kinetic in the 3DCM. Panel **a**: western blot analysis of gamma-H2AX, from 1 to 96 h following a 2 Gy low-LET or high-LET irradiation. GAPDH was used as a loading control. **b** Gamma-H2AX signal quantification normalized to GAPDH following a 2 Gy low-LET or high-LET irradiation. Image J software was used to analyze non-saturated signals. The non-cropped images are available in Additional file 3: Figure S3

induction is wider, meaning probably a delayed DNA repair kinetic due to our physioxenic cell culture conditions. Furthermore, gamma-H2AX induction was also measured on 2D culture conditions at the same time points post-irradiation (Additional file 4: Figure S4 and Additional file 5: Figure S5). Using GAPDH as loading control, we measured ~3-fold gamma-H2AX induction with low-LET radiation, 1 h post-irradiation compared to mock-irradiated sample. Following this induction, low-LET irradiated samples display a two phase decrease with a fast first step until 3 h post-irradiation and then a slower decrease from 6 h to 24 h (Additional file 4: Figure S4). High-LET irradiated samples display a 3-fold gamma-H2AX induction 1 h post-irradiation, similarly to low-LET exposure. However, the decrease is very slow and only partial as a 2-fold induction is still measured 96 h after exposure (Additional file 5: Figure S5). Such delayed gamma-H2AX induction was recently described for high-LET radiation [45] and is consistent with well-known delayed DSB repair measured after high-LET exposure in 2D cell culture [46].

Finally, we propose a new evaluation marker of biological effectiveness named Evaluation of RBE (E_{RBE}) by calculating the ratio of the gamma-H2AX induction following high-LET irradiation compared to low-LET as a function of time. Indeed, in the present study E_{RBE} at 12, 24 and 48 h following irradiation show a significant decrease as estimated respectively to 3.0, 1.5 and 1.0 in 3DCM (Fig. 6). This marker may be useful to monitor the impact of radiation quality in 3D models for whom collecting irradiated cells for canonical clonogenicity is impossible. Furthermore, analysis of E_{RBE} in a time course manner after radiation exposure may enlighten some undiscovered aspect of tissue response to hadron-therapy, especially for RT hypo-fractionation clinical protocols.

Conclusions

In the present study we report, for the first time, a 3D physioxenic CHS model applied to radiation-biology studies. We showed its usefulness for studying radiation quality impact on CHS in a controlled microenvironment that mimics *in vivo* tissue homeostasis after therapeutic radiation exposure. LET distribution calculation demonstrated a homogeneously ions irradiation through the 3DCM. We describe here differential cellular responses (proliferation, gamma-H2AX induction kinetic) following low- versus high-LET radiation, using the same dose (2 Gy). The discrepancies found between 2D culture and 3DCM response to radiation, especially for high-LET exposure, may be explained by the reconstitution of a tissue-like microenvironment in 3DCM. Indeed, cells embedded in extracellular matrix change their whole metabolism [16] and may display specific delayed response as found for gamma-H2AX induction [41, 42]. Furthermore, high-LET irradiations of

3DCM show a particular gamma-H2AX induction, higher and longer than low-LET. Such specific pattern should be investigated in the future as 3D models may be used to assess new and more relevant indexes of radiation biological efficiency. Indeed, our 3DCM could be used as a validation tool for medical beams using carbon ions or protons in order to evaluate the RBE-LET dependence and measure the variation of RBE along the depth-dose profile of therapeutic proton or heavy ion beams. This issue was pointed out to be critical, at least in proton-therapy by Britten et al., 2013 [47].

Furthermore, the 3DCM strategy described here could also be applied to human AC or Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for radiation quality impact investigations on normal cartilage or MSCs differentiation after therapeutic radiation exposure as it has been previously studied for low-LET radiations [48]. Such models could also be transplanted in nude mice, as it has been previously performed with AC [49].

Finally, in this study, we focused on targeted effects of IRs on CHS cultivated in 3D. However, non-targeted effects of IRs have been previously suggested to play a role in radiation-resistance of CHS to low-LET radiations [50]. Further studies with 3DCM using innovative tools will help understand the radiation-resistance of CHS in clinics [51].

Additional files

Additional figure 1: Cell cycle distribution of SW1353 cultured in 2D. Representative histogram, showing the cell cycle phases of SW1353 cultured in 2D. G₀/G₁ phase is represented in blue, S phase in green and G₂/M phase in pink. Percentage of cells in each phase is also reported. They represent the mean of four independent experiments ± SEM. (JPEG 12 kb)

Additional figure 2: Radiation survival curve of SW1353 cultured in 2D. SW1353 cells were irradiated with the indicated doses of X-rays (low-LET) or ¹⁸O ions (high-LET) then plated at low density, as described in methods. The quantification of the number of formed colonies after 11 days of incubation was used to calculate the surviving fraction relative to the mock-irradiation sample, at each radiation dose. The curve was fitted to the linear quadratic model. Symbols represent the mean of all replicates and error bars represent the SEMs. (JPEG 13 kb)

Additional figure 3: Post-irradiation gamma-H2AX repair kinetic in the 3DCM (non-cropped images). 3DCM were irradiated with a 2 Gy dose of low- or high-LET radiation as described above. 3DCM were collected 1 to 96 h following irradiation and stored at -80 °C. Mock-irradiated sample was treated the same way without being irradiated. The cell lysis protocol described above was used to prepare protein extracts. Half of each extract underwent SDS-PAGE (10 %) analysis. Low- (panels A, B) and high- (panels C, D) LET samples were loaded on two different gels, due to the limited number of lanes per gel. After the transfer step, membranes were cut just above 70 kD and incubated with the corresponding antibodies. Detections were assessed on X-ray films using two ECL reagents depending on signal intensity and the corresponding images are represented, with the ladder molecular weights (kD) on the right side of each image. The gamma-H2AX antibody was first used and positive probing observed at 15 kD; panel A (ECL classico, 30 s) and panel C (ECL classico, 30 s). The same membranes were, then, re-incubated with anti-GAPDH antibody and the positive probing observed between 35 kD and 40 kD: panel B (ECL classico, 30 s) and panel D

(ECL crescendo, 5 min). The gamma-H2AX lane reappears at 15 kD due to the use of the same anti-mouse secondary antibody. (JPEG 194 kb)

Additional figure 4: Post-irradiation gamma-H2AX repair kinetic in 2D, following low-LET irradiation. Panel A: western blot analysis of gamma-H2AX, from 1 to 96 h following a 2 Gy low-LET irradiation. GAPDH was used as a loading control. (B) Gamma-H2AX signal quantification normalized to GAPDH following a 2 Gy low-LET irradiation. Image J software was used to analyze non-saturated signals. (JPEG 38 kb)

Additional figure 5: Post-irradiation gamma-H2AX repair kinetic in 2D, following High-LET irradiation. Panel A: western blot analysis of gamma-H2AX, from 1 to 96 h following a 2 Gy high-LET irradiation. GAPDH was used as a loading control. (B) Gamma-H2AX signal quantification normalized to GAPDH following a 2 Gy high-LET irradiation. Image J software was used to analyze non-saturated signals. (JPEG 34 kb)

Abbreviations

2D: Two-dimensional; 3D: Three-dimensional; 3DCaM: 3D cartilage model; 3DCM: 3D chondrosarcoma model; AC: Articular chondrocytes; AK: Adenylate kinase; BMP-2: Bone morphogenic protein-2; BSA: Bovine serum albumin; CFE: Colony forming efficiency; CHS: Chondrosarcoma; D₁₀: Lethal dose for 10 % survival; D₃₇: Lethal dose for 37 % survival; DAB: Diaminobenzidine; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DSB: DNA Double strand break; ECL: Electrochemiluminescence; EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid; ERBE: Evaluation of Relative Biological Effectiveness; FBS: Fetal Bovine Serum; GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase; HES: Hematoxylin, erythrosine, safran; HRP: Horseradish Peroxidase; IHC-p: Immunohistochemistry-paraffin; IR: Ionizing radiation; LET: Linear energy transfer; MSCs: Mesenchymal stem cells; PBS: Phosphate-buffered saline; RBE: Relative biological effectiveness; RT: Radiation-therapy; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis; S.E.M: Standard error on the mean; SF₂: Surviving fraction after a 2 Gy irradiation; SOBP: Spread-out bragg peak; TBS: Tris-buffered saline; T-PER: Tissue protein extraction reagent.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DHH carried out the experiments and data analysis and drafted the manuscript. YS conceived the study. YS, JLL, FC and SB participated in data analysis, helped drafting the manuscript and revised it critically. JEG carried out the ions LET distribution profile and wrote the corresponding section in the manuscript. PG, FL and MD helped in the 3D culture experiments and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by DSV-CEA (AAP Radiobiologie, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Fontenay aux Roses, France) and Conseil Régional de Basse-Normandie (programme Emergence, Caen, France). The authors are responsible for the study design, the writing of the report and the decision to submit the article for publication. DHH is supported by a PhD scholarship (Irtelis Graduate Program of DSV-CEA). SB is supported by the EU Erasmus program in collaboration with the University of Pavia (Italy) Master's school. We thank A. Batalla and P. Chevallier for technical assistance with Saturn medical accelerator (CLCC François Baclesse), A-M. Frelin-Labalme for X-RAD 225 Cx dosimetry and CIMAP physicists E. Balanzat, Y. N'Gnono, F. Durantel and A. Cassimi for IRABAT heavy ions beam calibration and dosimetry (GANIL). We are also grateful to Pr C. Bor, J. Marnay and C. Bageot for assistance with IHC-p (pathology laboratory, CLCC François Baclesse), M. Guillemin for technical assistance with flow cytometry (UCBN) and N. Elie for assistance with imaging (HIQ, UCBN).

Author details

¹LARIA-IRCM-DSV-Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, CIMAP, GANIL, Bd Henri Becquerel, BP 55027, 14076 Caen, cedex 05, France. ²Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy. ³UMR6249-Université de France-Comté, Besançon, France. ⁴EA4652-Normandie Université, Caen, France.

Received: 6 January 2015 Accepted: 31 July 2015

Published online: 08 August 2015

References

- Durante M. New challenges in high-energy particle radiobiology. *Br J Radiol.* 2014;87:20130626.
- Tsuji H, Kamada T. A review of update clinical results of carbon ion radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42:670–85.
- Loeffler JS, Durante M. Charged particle therapy—optimization, challenges and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10:411–24.
- Gelderblom H, Hogendoorn PCW, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AHM, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. *The Oncologist.* 2008;13:320–9.
- Jensen AD, Münter MW, Debus J. Review of clinical experience with ion beam radiotherapy. *Br J Radiol.* 2011;84(Spec No 1):S35–47.
- Holliday EB, Frank SJ. Proton radiation therapy for head and neck cancer: a review of the clinical experience to date. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;89:292–302.
- Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J Surg.* 2009;79:327–36.
- Clark JC, Akiyama T, Dass CR, Choong PF. New clinically relevant, orthotopic mouse models of human chondrosarcoma with spontaneous metastasis. *Cancer Cell Int.* 2010;10:20.
- Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, et al. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2013;93:1100–14.
- Van Oosterwijk JG, Plass JRM, Meijer D, Que I, Karperien M, Bovée JVMG. An orthotopic mouse model for chondrosarcoma of bone provides an in vivo tool for drug testing. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2014;466:101–9.
- Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, et al. Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res.* 2010;70:3925–34.
- Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:393–410.
- Freyria A-M, Ronzière M-C, Cortial D, Galois L, Hartmann D, Herbage D, et al. Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type I or type II collagen scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2009;15:1233–45.
- Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M, Fabre H, et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta.* 1840;2014:2414–40.
- Legendre F, Ollitrault D, Hervieu M, Baugé C, Maneix L, Goux D, et al. Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;19:550–67.
- Saintigny Y, Cruet-Hennequart S, Hamdi DH, Chevalier F, Lefaix J-L. Impact of therapeutic irradiation on healthy articular cartilage. *Radiat Res.* 2015;183:135–46.
- Gibson JS, Milner PL, White R, Fairfax TPA, Wilkins RJ. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflüg Arch Eur J Physiol.* 2008;455:563–73.
- Claus S, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, et al. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng Part C-Methods.* 2012;18:104–12.
- Ando K, Kase Y. Biological characteristics of carbon-ion therapy. *Int J Radiat Biol.* 2009;85:715–28.
- Chajra H, Rousseau CF, Cortial D, Ronzière MC, Herbage D, Mallein-Gerin F, et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(1 Suppl):S33–45.
- Ma CM, Coffey CW, DeWerd LA, Liu C, Nath R, Seltzer SM, et al. AAPM protocol for 40–300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med Phys.* 2001;28:868–93.
- Hellweg CE, Baumstark-Khan C, Schmitz C, Lau P, Meier MM, Testard I, et al. Carbon-ion-induced activation of the NF-κB pathway. *Radiat Res.* 2011;175:424–31.
- Suetens A, Moreels M, Quintens R, Chiriotti S, Tabury K, Michaux A, et al. Carbon ion irradiation of the human prostate cancer cell line PC3: a whole genome microarray study. *Int J Oncol.* 2014;44:1056–72.

24. Battistoni G, Cerutti F, Fasso A, Ferrari A, Muraro S, Ranft J, et al. The FLUKA code: description and benchmarking. In: Albrow M, Raja R, editors. *Hadronic Shower Simulation Workshop*, vol. 896. Melville: Amer Inst Physics; 2007. p. 31–49.
25. Ferrari A, Sala PR, Fasso A, Ranft J. FLUKA: A Multi-Particle Transport Code. Geneva: CERN; 2005. p. 405.
26. Sato T, Niita K, Matsuda N, Hashimoto S, Iwamoto Y, Noda S, et al. Particle and Heavy Ion Transport code System, PHITS, version 2.52. *J Nucl Sci Technol*. 2013;50:913–23.
27. Gonon G, Groetz JE, de Toledo SM, Howell RW, Fromm M, Azzam EI. Nontargeted Stressful Effects in Normal Human Fibroblast Cultures Exposed to Low Fluences of High Charge, High Energy (HZE) Particles: Kinetics of Biologic Responses and Significance of Secondary Radiations. *Radiat Res*. 2013;179:444–57.
28. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 1956;103:653–66.
29. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1:2315–9.
30. Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, et al. Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res*. 2007;25:820–8.
31. Van Oosterwijk JG, de Jong D, van Ruler M, Hogendoorn PCW, Dijkstra PDS, van Rijswijk CSP, et al. Three new chondrosarcoma cell lines: one grade III conventional central chondrosarcoma and two dedifferentiated chondrosarcomas of bone. *BMC Cancer*. 2012;12:10.
32. Nawa G, Ueda T, Mori S, Yoshikawa H, Fukuda H, Ishiguro S, et al. Prognostic significance of Ki67 (MIB1) proliferation index and p53 over-expression in chondrosarcomas. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1996;69:86–91.
33. Perez J, Decouvelaere AV, Pointecouteau T, Pissaloux D, Michot JP, Besse A, et al. Inhibition of chondrosarcoma growth by mTOR inhibitor in an in vivo syngeneic rat model. *PLoS One*. 2012;7:e32458.
34. Spadinger I, Palcic B. The relative biological effectiveness of 60Co gamma-rays, 55 kVp X-rays, 250 kVp X-rays, and 11 MeV electrons at low doses. *Int J Radiat Biol*. 1992;61:345–53.
35. Upton A, Bond V. NCRP Report No. 064 - Influence of Dose and Its Distribution in Time on Dose–response Relationships for Low-LET Radiations. 1980.
36. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1984;133:1710–5.
37. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311–22.
38. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, et al. gamma-H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle Georget Tex*. 2010;9:662–9.
39. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol CB*. 2000;10:886–95.
40. Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, Hyrien O, Chen R, Hill RP, et al. Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. *Radiat Res*. 2010;173:1–9.
41. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC. gamma-H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. 2010;24:679–86.
42. Desai N, Durante M, Lin ZW, Cucinotta F, Wu H. High LET-induced H2AX phosphorylation around the Bragg curve. *Adv Space Res Off J Comm Space Res COSPAR*. 2005;35:236–42.
43. Fürweger C, Hajek M, Vana N, Kodym R, Okayasu R. Cellular signal transduction events as a function of linear energy transfer (LET). *Radiat Prot Dosimetry*. 2007;126:418–22.
44. Roig AI, Hight SK, Minna JD, Shay JW, Rusek A, Story MD. DNA damage intensity in fibroblasts in a 3-dimensional collagen matrix correlates with the Bragg curve energy distribution of a high LET particle. *Int J Radiat Biol*. 2010;86:194–204.
45. Antonelli F, Campa A, Esposito G, Giardullo P, Belli M, Dini V, et al. Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death. *Radiat Res*. 2015;183:417–31.
46. Ostashevsky JY. A model relating cell survival to DNA fragment loss and unrepaired double-strand breaks. *Radiat Res*. 1989;118:437–66.
47. Britten RA, Nazaryan V, Davis LK, Klein SB, Nichiporov D, Mendonca MS, et al. Variations in the RBE for cell killing along the depth-dose profile of a modulated proton therapy beam. *Radiat Res*. 2013;179:21–8.
48. Cruet-Hennequart S, Drougard C, Shaw G, Legendre F, Demoor M, Barry F, et al. Radiation-induced alterations of osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2015;10:e0119334.
49. Ollitrault D, Legendre F, Drougard C, Briand M, Benateau H, Goux D, et al. BMP-2, Hypoxia, and COL1A1/Htra1 siRNAs Favor Neo-Cartilage Hyaline Matrix Formation in Chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;21:133–47.
50. Wakatsuki M, Magpayo N, Kawamura H, Held KD. Differential bystander signaling between radioresistant chondrosarcoma cells and fibroblasts after X-Ray, proton, iron ion and carbon ion exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;84:E103–8.
51. Chevalier F, Hamdi DH, Saintigny Y, Lefaix J-L. Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:280–93.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Titre : Analyse des effets directs de rayonnements ionisants à différents TELs dans un modèle expérimental *in vitro* de cartilage humain sain et pathologique.

Mots clés : ions carbone, cartilage, chondrosarcome, modèle 3D, physioxie, efficacité biologique relative

Résumé : L'hadronthérapie par ions carbone représente une modalité de radiothérapie alternative très attractive du fait des propriétés physiques et biologiques de ce type de particules. Les chondrosarcomes, tumeurs radio-résistantes à différenciation cartilagineuse, sont en première ligne pour le traitement par ions carbone. Cependant, les effets secondaires sur les tissus sains environnants sont peu ou mal connus. Ce projet a pour but l'étude des effets directs des ions accélérés dans un modèle 3D de cartilage sain et pathologique proche de l'homéostasie humaine et le développement de nouveaux outils de calculs d'efficacité biologique relative (EBR). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux séquelles radio-induites sur le cartilage articulaire dans un contexte d'hadronthérapie par ions carbone. En culture 2D physioxique (2% d'O₂), l'efficacité biologique relative des ions carbone (transfert d'énergie linéique ou TEL intermédiaire) comparée aux rayons X a été évaluée à 2,6. Ceci a été corrélé à une plus forte induction de sénescence radio-induite. Cependant, cet effet différentiel n'a pas été retrouvé en utilisant un modèle 3D de cartilage articulaire. L'efficacité biologique relative des ions accélérés semble donc surévaluée, en utilisant des cultures en monocouche, par rapport à la 3D. Dans un deuxième temps, un modèle 3D de chondrosarcome a été développé pour des études d'hadronbiologie. Après plusieurs obstacles techniques, des méthodes d'extraction protéique et d'immunohistochimie ont été mises au point. Une nouvelle méthode d'évaluation de l'EBR en 3D basée sur la cinétique d'induction de la protéine γ -H₂AX a été proposée.

Title : Analysis of the direct effects of ionizing radiations of different LETs in an *in vitro* model of human articular cartilage and chondrosarcoma.

Keywords : carbon ions, cartilage, chondrosarcoma, 3D model, physioxia, relative biological effectiveness

Abstract : Hadrontherapy using carbon ions has many advantages due to physical and biological properties of this type of particle. Chondrosarcoma, a cartilaginous radio-resistant tumor, has been successfully treated using carbon ions. However, potential side effects to the surrounding healthy tissues are still poorly known. This project aims to study the direct effects of carbon ions in a 3D model of healthy articular cartilage and chondrosarcoma close to human homeostasis, in order to provide new tools for the evaluation of the relative biological effectiveness (RBE). The first part of the project was dedicated to the evaluation of carbon ions-induced impact on articular cartilage in the context of chondrosarcoma treatment. Compared to X-rays, the relative biological effectiveness of intermediate-LET carbon ions scored 2.6 in 2D monolayer culture. This was correlated with a stronger induction of cellular senescence. However, this differential effect was not reproduced using a 3D model of articular cartilage. Thus, the relative biological effectiveness of accelerated ions is probably overestimated using monolayer cultures (2D), compared to 3D. In the second part of this work, we developed a 3D chondrosarcoma model for hadronbiology studies. Protein extraction and immunohistochemistry protocols were developed. A new RBE evaluation method based on γ -H₂AX repair kinetic in 3D, was proposed.