

Titre Thèse : **Séquelles de la radiothérapie non conventionnelle par ions carbone sur les tissus sains : mesure de la sénescence du cartilage grâce à un modèle in vitro 3D humain.**

Encadrant : Yannick Saintigny

Laboratoire : LARIA

L'hadronthérapie est une technique de radiothérapie non conventionnelle des tumeurs cancéreuses qui met en jeu des faisceaux d'ions accélérés de grande énergie. Cette technique, bien qu'encore peu répandue en Europe, présente un avantage déterminant par rapport à la radiothérapie conventionnelle en combinant les propriétés radiobiologiques uniques des particules de haut TEL (Transfert d'Énergie Linéique) et une balistique (précision) performante. Cependant, les impacts physiques, chimiques et biologiques d'une exposition aux ions accélérés des tissus sains environnant la tumeur et/ou sur le trajet du faisceau restent mal connus et pourraient conduire à l'émergence d'effets secondaires ou de séquelles dramatiques. L'évaluation des conséquences des dommages cellulaires radio-induits dans des conditions mimant au mieux la réalité biologique d'un tissu humain est ainsi essentielle dans la perspective d'un protocole d'hadronthérapie. Le cartilage articulaire sain est un tissu qui participe au déplacement de plus de 230 articulations mobiles ou semi-mobiles distribués dans l'ensemble de l'organisme. Il est ainsi virtuellement impossible, aujourd'hui, de réaliser une radiothérapie en excluant les articulations et leurs cartilages du champ ou du trajet des faisceaux. Ainsi, l'arthrose articulaire est une séquelle tardive de la radiothérapie conventionnelle à la suite d'une sénescence radio-induite du cartilage.

L'objectif principal de ce projet de thèse est ainsi de déterminer les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires impliqués dans l'émergence d'une sénescence radio-induite du cartilage articulaire suite à une irradiation thérapeutique par ions carbone. Une telle sénescence serait la première étape du développement d'une arthrose tardive évoluant en une séquelle définitive de la radiothérapie par ions carbone. Ce projet utilisera le modèle de culture tridimensionnelle de chondrocytes articulaires humains maintenu en physioxie (pO₂ 2%) développé au LARIA afin de mimer au plus près la physiologie du cartilage. De plus, l'exposition à des faisceaux d'ions carbone de TEL compatible avec un faisceau thérapeutique (tissus sains : 30 keV/μm) sera complétée par l'analyse d'une exposition comparable à des photons d'une radiothérapie conventionnelle. Ce projet permettra ainsi de collecter des données extrapolables à la situation d'un patient traité par radiothérapie conventionnelle ou par hadronthérapie.

La mesure de la sénescence radio-induite sera réalisée par la mesure de l'expression tardive (de 1 à 30 jours post irradiation) de la bêta-galactosidase dans le modèle 3D de cartilage. En effet, l'expression de cette enzyme est un marqueur reconnu de la sénescence cellulaire in vitro mais aussi in vivo. De plus, une collaboration d'ores et déjà engagée avec le laboratoire dirigé par C. Mann (Ibitec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, CEA Saclay) nous permettra de mesurer un variant de l'histone H2A (H2A.J), spécifique des cellules humaines et dont l'accumulation provoque et signale la sénescence mais aussi promeut l'expression de cytokines inflammatoires. Enfin, l'équipe de Pascale Bertrand a montré le rôle de la dérégulation spécifique des lamines composant l'enveloppe nucléaire dans l'émergence de la sénescence radio-induite. Une telle dérégulation sera mesurée dans les modèles 3D de chondrocytes irradiés avec des photons ou des ions carbone.

Le chondrocyte a pour rôle de maintenir un parfait équilibre entre la synthèse et la dégradation des composants matriciels du cartilage grâce aux cytokines (IL-1, TNF- α , IL-6) et facteurs de croissance locaux (IGF-I, BMPs, TGF- β 1). La composante inflammatoire d'une irradiation pourrait modifier la production de cytokines, mais aussi l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaire nécessaires à l'homéostasie du cartilage. Une telle situation aura probablement des conséquences sur la sénescence radio-induite du cartilage. Pour se placer dans les conditions les plus favorables, une stratégie expérimentale basée sur une analyse globale non-ciblée des protéines sera utilisée en association avec une analyse ciblée de certaines cytokines (spectrométrie de masse, puces à protéines). Après la production des échantillons au laboratoire, l'analyse des protéines sera en partie sous-traitée sur des plateformes extérieures. Cette approche fait déjà l'objet de collaboration du LARIA avec des plateformes de spectrométrie de masse et d'analyse protéomique à haut débit au CEA de Marcoule et à l'université de Montpellier.

Project title : **Impact of co-morbidity factors and genetic background on radiation-induced (single and fractionated doses) senescence of human cartilage**

Encadrant : Yannick Saintigny

Laboratoire : LARIA

Emerging protocols of radiation-therapy with protons or light particle as carbon ions in advanced medical facilities have widely changed the way of thinking about local tumor control and impact on healthy tissues, thanks to their excellent ballistic with a decreased irradiated volume of normal healthy tissue in the beam track. Furthermore, these 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. Indeed, chondrosarcoma is a malignant bone tumor with cartilaginous differentiation described as chemo- and radiation-resistant. Hadron-therapy using protons or C-ions have been successfully used to treat low- and intermediate-grade chondrosarcoma. However, the risk assessment of sequelae of healthy tissue like hyaline cartilage and second malignancies in the beam track of charged particles is not totally predicted⁴. Moreover, if side effects and sequelae following conventional therapeutic irradiation have been 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 tissues⁵. 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 life¹⁸. Hyaline articular cartilage can be side-exposed to ionizing radiations (IRs) which might induce bone differentiation and senescence⁶. The senescence of chondrocytes has been defined as the "age-dependent deterioration of chondrocytes following intrinsic and extrinsic factors". 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.

Primary human articular chondrocytes from selected donors (from different healthy donors or specific co-morbidity: diabetes mellitus, alcohol abuse, arthritis, arthrosis...) will be cultured in a collagen scaffold to construct a physioxenic 3D cartilage model. Cells will be irradiated with single doses or (oligo-) fractionated of C-ions (~ 30 keV/ μ m), protons or X-rays. Survival, proliferation, oxidative stress, proteome analysis, DNA repair, cell deaths (necrosis, apoptosis, etc) and senescence assays will be performed. The goal of this project will be to analyse the impact of therapeutic irradiation modalities and co-morbidity on cartilage fate.

The aim of this project is to collect data from 3D cartilages build from multiple donors and exposed to carbon ions or proton therapeutic radiations modalities. Proteomics and mass spectrometry analysis of such irradiated tissues will give insights of cartilage metabolic pathways involved in radiation-induced arthrosis. Furthermore, analysis of comorbidity factors impact on irradiated cartilage's fate will improve risk-assessment of some patients before engaging a radiation-therapy.