



HAL
open science

Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques.

Zuzana Bencokova

► **To cite this version:**

Zuzana Bencokova. Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00351044

HAL Id: tel-00351044

<https://theses.hal.science/tel-00351044>

Submitted on 8 Jan 2009

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.



THÈSE

De

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Biotechnologie, santé et management

Soutenue par

Zuzana MARCINKOVA-BENCOKOVA

Le 10 juillet 2007

**Signalisation et réparation des cassures
double-brin de l'ADN dans les gliomes :
Modulation de la réponse aux traitements
chimio-radiothérapeutiques.**

Composition du jury :

Pr. Alain FAVIER

Dr. Vincent FAVAUDON

Pr. Pierre VERRELLE

Dr. Jérôme GARNIER

Pr. Jacques BALOSSO

Dr. Nicolas FORAY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

SOMMAIRE

Avant-propos	1
I INTRODUCTION – RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	2
I.1 Les tumeurs du système nerveux: aspects biologiques et thérapeutiques	2
I.1.1 Critères d'identification et classifications des tumeurs du système nerveux	2
I.1.1.1 Aspects histologiques des tumeurs primitives du système nerveux	3
I.1.1.2 Classification de l'OMS	4
I.1.1.3 Classification de l'hôpital Sainte-Anne	6
I.1.1.4 Comparaisons des classifications proposées.....	6
I.1.2 Aspects épidémiologiques des tumeurs cérébrales	8
I.1.2.1 Incidence des tumeurs cérébrales sporadiques	8
I.1.2.2 Les facteurs de risque environnementaux.....	8
I.1.2.3 Les maladies génétiques associées à des tumeurs cérébrales.....	9
I.1.2.4 Le cas particulier de la neurofibromatose de type 1	10
I.1.3 Aspects moléculaires et cellulaires des tumeurs cérébrales.....	13
I.1.3.1 Les différents modèles de neuro-oncogenèse (cellules souches ou instabilité).....	13
I.1.3.2 Les cellules souches et la radiorésistance	14
I.1.3.3 Les dérèglements génétiques et cellulaires liés au cancer.....	14
I.1.3.3.1 <i>Les signatures moléculaires et cytogénétiques des gliomes</i>	16
I.1.3.3.2 <i>Les voies de transduction du signal</i>	18
I.1.3.3.3 <i>Les voies du contrôle du cycle cellulaire</i>	20
I.1.3.4 Conclusions sur les aspects moléculaires des gliomes	20
I.1.4 Aspects thérapeutiques des gliomes.....	21
I.1.4.1 La chirurgie des gliomes	21
I.1.4.2 La radiothérapie des gliomes	21
I.1.4.3 La radiochirurgie des gliomes	22
I.1.4.4 La chimiothérapie des gliomes.....	23
I.1.4.4.1 <i>La chimiothérapie systémique</i>	23
I.1.4.4.2 <i>La chimiothérapie intratumorale</i>	24
I.1.4.5 Les traitements combinés et les traitements ciblés	25
I.1.4.6 Les traitements expérimentaux utilisant le rayonnement synchrotron	26
I.1.4.6.1 <i>Le rayonnement synchrotron: rappels et stratégies</i>	26
I.1.4.6.2 <i>Résumé des acquis de l'utilisation du rayonnement synchrotron</i>	29
I.1.5 Les modèles de gliomes et leur utilisation dans les études précliniques	30
I.1.5.1 Les modèles d'implantation.....	31
I.1.5.2 Les animaux génétiquement modifiés.....	32

I.1.5.3	Conclusions sur les modèles de gliomes	32
I.1.6	Conclusion-bilan sur les rappels bibliographiques concernant les gliomes.....	33
I.2	Rappels de radiobiologie.....	35
I.2.1	La radiobiologie, une science pluridisciplinaire en plein essor.....	35
I.2.1.1	La spécificité des réponses moléculaires et cellulaires	35
I.2.1.2	La dualité des réponses cliniques	36
I.2.1.3	La redondance et/ou la complémentarité des voies de réparation	36
I.2.1.4	L'importance de la condensation de l'ADN.....	37
I.2.1.5	Le problème posé par les effets de voisinage (ou effets <i>bystander</i>).....	38
I.2.1.6	L'hypersensibilité aux faibles doses et à de faibles débits.....	38
I.2.1.7	Des marqueurs spécifiques des différentes voies de réparation	38
I.2.1.8	La découverte de nouveaux syndromes génétiques	39
I.2.2	Les événements radioinduits initiaux	39
I.2.2.1	La phase physique et l'importance des microdépôts d'énergie	39
I.2.2.1.1	<i>Les 3 effets majeurs de l'interaction rayonnement-matière</i>	40
I.2.2.1.2	<i>Les microdépôts d'énergie</i>	41
I.2.2.2	La phase chimique et l'importance des produits radicalaires radioinduits.....	42
I.2.2.2.1	<i>Les principaux produits de la radiolyse de l'eau</i>	42
I.2.2.2.2	<i>Les conséquences de la radiolyse d'une solution aqueuse</i>	43
I.2.3	La phase biologique et l'importance de la qualité de la réparation de l'ADN	44
I.2.3.1	L'importance de l'ADN dans la réponse aux radiations	44
I.2.3.2	Les différentes voies de réparation des CDBs: suture, recombinaison.....	46
I.2.3.2.1	<i>Réparation par suture</i>	47
I.2.3.2.2	<i>Réparation par recombinaison</i>	48
I.2.3.2.2.1	<i>Le rôle particulier de BRCA1</i>	50
I.2.3.3	La réparation des mésappariements (MMR)	52
I.2.3.4	L'immunofluorescence H2AX : une nouvelle technique de détection des CDBs.....	52
I.2.3.5	Les différents types de morts radioinduites	52
I.2.4	Conclusion-bilan sur les rappels bibliographiques concernant les gliomes.....	54
II	PROBLEMATIQUE DE LA THESE	56
II.1	Les questions posées par les traitements innovants contre les gliomes.....	56
II.2	Le contexte local.....	57
II.3	Les différentes étapes de la thèse	57
II.3.1	Etape I - Nouveaux concepts de radiobiologie	57
II.3.2	Etape II - Caractérisation radiobiologique des modèles de gliomes.....	58
II.3.3	Etape III - Caractérisation radiobiologique de la neurofibromatose.....	58
II.3.4	Etape IV - Pharmacomodulation de la recombinaison dans les gliomes.....	59
III	MATERIELS ET METHODES	61

III.1	Lignées cellulaires et conditions de culture	61
III.1.1	Lignées de gliomes de rats	61
III.1.2	Lignées humaines de gliomes.....	62
III.1.3	Les autres lignées utilisées dans cette thèse	63
III.2	Procédure d'irradiation des cellules.....	64
III.2.1	Irradiation avec la source conventionnelle des rayons X.....	64
III.2.2	Irradiation synchrotron sur la ligne médicale de l'ESRF	65
III.3	Traitements pharmacologiques	66
III.3.1	Traitement par les sels de platine	66
III.3.2	Traitement par les inhibiteurs de kinases	66
III.4	Survie clonogénique	68
III.5	Immunofluorescence.....	69
III.6	Etude du cycle cellulaire	69
III.7	Extraits nucléaires et immunoblots.....	70
IV	RESULTATS	71
IV.1	Etape I - Nouveaux concepts de radiobiologie	71
	Article I.....	71
IV.1.1	Contexte	71
IV.1.2	But de l'article	72
IV.1.3	Résultats principaux.....	72
IV.1.4	Conclusions et impact sur la thèse.....	73
	Article II.....	74
IV.1.5	Contexte	74
IV.1.6	But de l'article	75
IV.1.7	Résultats principaux.....	75
IV.1.8	Conclusions et impact sur la thèse.....	75
IV.2	Etape II : Caractérisation radiobiologique des modèles de gliomes.....	76
	Article III.....	76
	Article IV.....	76
IV.2.1	Contexte pour les articles III et IV	76
IV.2.2	Buts de l'article III.....	77
IV.2.3	Résultats de l'article III.....	78
IV.2.4	Discussion de l'article III	79
IV.2.5	Conclusions et impact sur la thèse de l'article III.....	80
IV.2.6	Buts de l'article IV	80
IV.2.7	Résultats principaux de l'article IV	80
IV.2.8	Discussion de l'article IV	82
IV.2.9	Conclusions et impact sur la thèse de l'article IV.....	83

IV.3	Etape III : Caractérisation radiobiologique de la neurofibromatose I.....	84
	Article V	84
IV.3.1	Contexte	84
IV.3.2	But de l'Etape III	85
IV.3.3	Résultats de l'Etape III	86
IV.3.4	Conclusions de l'Etape III.....	89
IV.4	Etape VI : Modulation de la réparation par suture et par la recombinaison MRE11- dépendante par les inhibiteurs de tyrosine kinases dans les tumeurs cérébrales.	91
IV.4.1	Quelles étaient les drogues inhibitrices de tyrosine kinases qui mériteraient d'être testées ?	91
IV.4.2	Quels sont les modèles cellulaires les plus pertinents pour tester l'efficacité des traitements combinés ?	93
IV.4.3	Choix du protocole expérimental.....	93
IV.4.4	Description de la réponse pH2AX sur les lignées humaines U87, U118 et U373 94	
IV.4.5	Description de la réponse MRE11 sur les lignées humaines U87, U118 et U373 96	
IV.4.6	Conclusions préliminaires	97
	Review I	97
V	DISCUSSION	98
V.1	Etape I : Nouvelles notions de radiobiologie.....	98
V.1.1	Le problème des surinterprétations des résultats acquis par co-immunofluorescence.	99
V.1.2	Le problème de la détection et de la prédiction des faibles radiosensibilités	99
V.1.3	Existence d'une corrélation quantitative entre survie et défauts de réparation indépendante de la nature du gène muté.	101
V.2	Etape II : Mise en évidence d'altérations fonctionnelles de BRCA1 dans les gliomes	102
V.2.1	A la recherche d'une signature moléculaire pour les gliomes.....	102
V.2.2	Rôle possible de BRCA1 dans la gliomagenèse	104
V.2.3	Conséquences de dysfonctions de BRCA1 dans les traitements radio- chimiothérapeutiques des gliomes	105
V.3	Etape III : Analyse radiobiologique de la neurofibromatose type I	107
V.3.1	La neurofibromatose de type 1: un syndrome associé à une radiosensibilité modérée mais significative.	107
V.3.2	Y-a-t-il un lien entre BRCA1 et NF1?	108
V.4	Etape IV: Effets des inhibiteurs de tyrosine kinases.....	110
VI	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	112
VII	BIBLIOGRAPHIE	115

RESUME	125
ABSTRACT	125

TABLE DES ABREVIATIONS

%ILS: Pourcentage d'augmentation de survie	MNU : Methylnitrosourée
ADN: Acide désoxyribonucléique	MPNST: Tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques (malignant peripheral nerve sheath tumors)
BHE: Barrière hémato-encéphalique	MRT: Microbeam Radiation Therapy
BNCT: Boron neutron capture therapy	MST: Temps de survie moyen
BRCA1: Breast cancer susceptibility gene 1	mTOR: Mamalian Target of Rapamycine
BRCA2: Breast cancer susceptibility gene 2	OMS: Organisation Mondiale de la Santé
Carboplatine: Cis-diammine (1,1-cyclobutylidicarboxylato) platinum (II)	NF1: Neurofibromatose de type 1 ou Neurofibromine (protéine)
CDBs: Cassures double-brin	NF2: Neurofibromatose de type 2
CDDP: cis-diamminedichloroplatinum (II)	NHEJ : Non-Homologous End Joining (Suture)
CDK4: Cycline dependante kinase 4	PARP: Poly (ADP-ribose) polymérase
CHO: Chinese Hamster Ovary	PAT: Thérapie par photoactivation (Photon Activation Therapy)
CHU: Centre hospitalo-universitaire	PBS: Phosphate buffer saline
CSBs: cassures simple-brin	PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
CT-thérapie: Computed Tomography thérapie	PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
CTV: Volume tumoral cible	PI3K: Phosphoinositide-3 kinase
DBs: Dommages de bases	PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
DEF: Dose Enhancement Factor	pH2AX : Forme phosphorylée de l'histone H2AX
DMEM: Dulbecco's modified eagle's minimum medium	RB : Retinoblastome
DMSO: Diméthyl-sulfoxyde	RPA : Replication Protein A
DNA-PKcs: Sous-unité catalytique du complexe DNA-PK	RSRM : Rayonnement synchrotron et recherche médicale
DSB: Double Strand Break (Cassures double brin de l'ADN)	RX: Rayons X
EBR: Efficacité biologique relative	SER : Sensitization Enhancement Ratio
EGF: Epidermal Growth Factor	SNC : Système nerveux central
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	SNP : Système nerveux périphérique
ENU: Ethylnitrosourée	SOR : Standards, Options et Recommandations
EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer	SSB : Single Strand Break (Cassures simple brin de l'ADN)
ESRF: European Synchrotron Radiation Facility	SVF: sérum de veau fœtal
FITC: Fluorescein Isothiocyanate	TEL : Transfert Linéique d'Énergie
GTV: Volume tumoral Gy : Gray	TRITC: Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
INSERM: Institut national pour la santé et la recherche médicale	UV: Radiation ultraviolet
ID: Insertion devices	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
LOH: Perte de Heterozygotie (Loss of Heterozygosity)	
MAPK: Mitogen activating phospho kinase	
MDM2: Murin double mutant 2	
MeST : Temps de survie médian	

AVANT-PROPOS

Les tumeurs cérébrales, notamment les glioblastomes, posent aujourd'hui un véritable problème de santé publique du fait de leur résistance à de nombreux traitements radiochimiothérapeutiques. Les stratégies thérapeutiques développées ont principalement été basées sur la recherche de l'accès le plus direct des drogues au lit tumoral ainsi que des synergies entre radiation et chimiothérapie. Les techniques innovantes proposées récemment par le rayonnement synchrotron ont renouvelé ces efforts de développement.

En parallèle, les connaissances des phénomènes de radiobiologie ont considérablement évolué et sont en train de faire changer les esprits pour la mise en place de nouveaux traitements et de leur évaluation. En effet, la notion de sécurisation du transfert clinique devient de plus en plus forte et incite les chercheurs à mieux prédire les effets du traitement sur les tissus sains plutôt d'en augmenter encore l'efficacité dans la tumeur.

Ainsi, cette thèse est la suite logique des travaux sur la photoactivation du cisplatine par rayonnement synchrotron qui a été développée dans l'Unité Inserm U836. Bénéficiant à la fois de modèles cellulaires de gliomes (rongeurs et humains) et du programme de recherche systématique sur les bases moléculaires de la radiosensibilité humaine, j'ai pu étudier la radiobiologie des gliomes sous un angle nouveau pour tester et pour sécuriser le transfert clinique de thérapies innovantes.

I INTRODUCTION – RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 Les tumeurs du système nerveux: aspects biologiques et thérapeutiques

En France, on compte aujourd'hui environ 6000 nouveaux cas par an de tumeurs du système nerveux. Les tumeurs cérébrales constituent la deuxième cause de cancer chez l'enfant. L'augmentation régulière de l'incidence des tumeurs cérébrales due à la fois à un meilleur dépistage et à des facteurs de risque probablement croissants a incité les chercheurs à mieux répertorier les tumeurs du système nerveux afin de faciliter leur traitement. Nous aborderons ici les différentes classifications les plus communément utilisées des tumeurs du système nerveux, leurs aspects épidémiologiques, leurs caractéristiques biologiques et enfin les différentes approches thérapeutiques qui sont appliquées aujourd'hui.

I.1.1 Critères d'identification et classifications des tumeurs du système nerveux

Les tumeurs du système nerveux sont généralement divisées selon leur *localisation* : système nerveux *central* (SNC) et *périphérique* (SNP), tumeurs *intra-* et *extra-crâniennes* (Figure 1), tumeurs *intra-* ou *extra-rachidiennes* ou selon leur *origine* tissulaire : tumeurs primaires (*primitives*) et secondaires (*métastases*). Cependant, face à la complexité, la diversité et l'hétérogénéité des tumeurs du système nerveux, ces critères d'identification sont insuffisants pour donner une image claire et objective de toutes leurs caractéristiques. Historiquement, à défaut d'informations biologiques précises (moléculaires, cytogénétiques,...) les médecins ont généralement adopté plusieurs classifications des tumeurs du système nerveux basées *sur l'observation microscopique*. Afin de mieux cibler les tissus étudiés dans le cadre de cette thèse, *seules les tumeurs primitives intracrâniennes seront abordées ici*.

I.1.1.1 Aspects histologiques des tumeurs primitives du système nerveux

Chez les vertébrés, les tumeurs du SNC sont des néoplasies dérivées de cellules d'origine neuroectodermique. Ces tumeurs concernent donc soit les *astrocytes* soit les *oligodendrocytes*. On désigne fréquemment sous le terme général de *gliomes*: les *astrocytomes*, les *oligodendrogliomes* et les tumeurs mixtes (les *oligo-astrocytomes*). Les gliomes sont les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes chez l'adulte. Les tumeurs embryonnaires incluent également les *médulloblastomes*, les *ganglioneuroblastomes* et les *neuroblastomes*, tumeurs solides périphériques les plus fréquentes chez l'enfant (Figure 1). Le processus tumoral affecte très rarement la lignée neuronale elle-même.

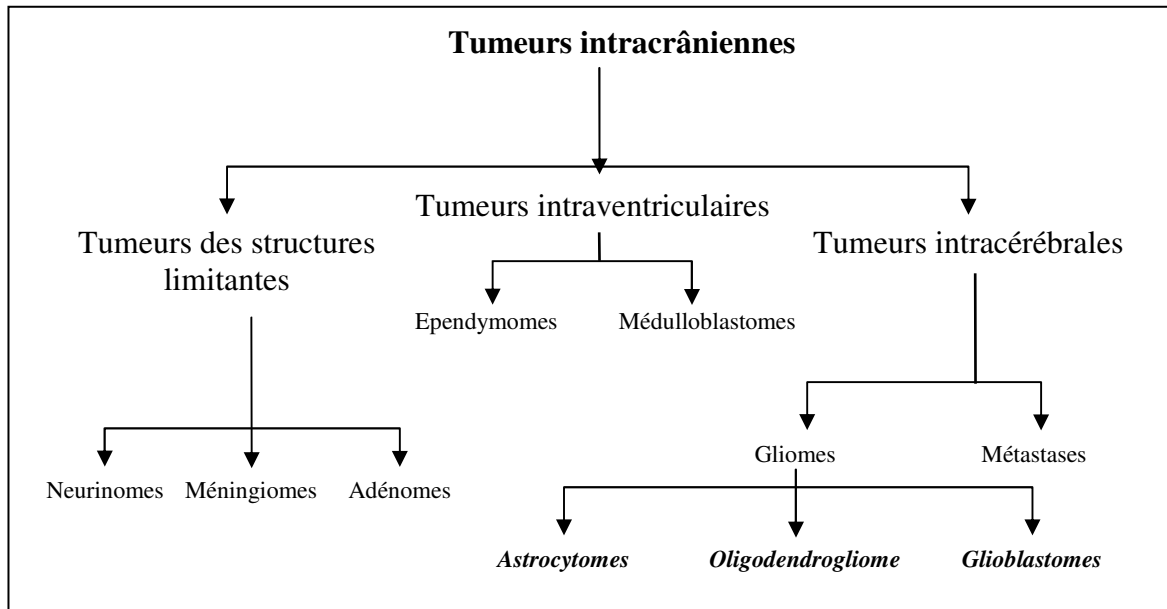


Figure 1 : Sommaire des tumeurs intracrâniennes selon leur localisation et leur origine.

Quant aux tumeurs du SNP, il s'agit le plus souvent des tumeurs bénignes essentiellement représentées par les *schwannomes* et les *neurofibromes* et des tumeurs malignes regroupées sous le terme général de « *tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques* » (*malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST*).

La reconnaissance et la classification de ces tumeurs sont fondées sur l'identification du type cellulaire prédominant, reconnu au cours de l'examen d'histopathologie. On peut citer

deux classifications majeures : celle proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et celle proposée par l'équipe de morphologie de l'Hôpital Sainte-Anne (Paris).

I.1.1.2 Classification de l'OMS

La classification internationalement reconnue reste celle de l'OMS. Elle unifie tous les classements précédents. Elle combine le type histologique et un système de grade d'évolution (le *grading*). Elle est issue de deux grands concepts opposés mais complémentaires :

- la théorie des restes embryonnaires, selon laquelle les tumeurs dérivent de cellules embryonnaires susceptibles de se *différencier* (Bailey and Cushing 1926),
- l'hypothèse de Kernohan qui propose que les gliomes se développent à partir des cellules adultes susceptibles de se *dédifférencier* (Kernohan, Mabon et al. 1949).

A partir de la classification histopronostique de Bialek et Cushing, la classification de l'OMS de 1979 (Zulch 1979) se composa d'une définition des catégories histologiques de différenciation associée à une valeur histopronostique correspondante à chacune des catégories. La classification OMS a défini le système des grades. Ce système permet de classer les tumeurs d'origine astrocytaire selon leur degré de malignité déterminé par l'examen histologique (*grade I à IV*). Cette classification prend en compte le degré de différenciation, la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique, la nécrose et la prolifération vasculaire. Dans le SNC, les tumeurs du *grade I* sont des gliomes *bénins* dont la démarcation est nette. Les *grades II, III et IV* sont des gliomes *malins* formés essentiellement d'astrocytomes diffus infiltrés dans le cerveau. Les astrocytomes sont les tumeurs du SNC les plus couramment diagnostiquées et représentent environ 60 % des tumeurs cérébrales. Les glioblastomes multiformes qui constituent la forme la plus maligne et infiltrante (*grade IV*) appartiennent aux cancers humains les plus agressifs (la médiane de survie ne dépasse pas 1 an). Les principaux critères de diagnostic des astrocytomes diffus, selon la classification de l'OMS 2002, sont rapportés dans le Tableau 1.

Au niveau du SNP, les *tumeurs bénignes* (schwannomes et neurofibromes) et les *tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques* (MPNST) se développent de façon sporadique ou dans un contexte génétique particulier (Tableau 2). Par exemple, les neurofibromes font partie des critères diagnostiques de la maladie héréditaire appelée *neurofibromatose de type 1 (NF1)*

(1.1.2.3). Les MPNST se développent dans 50% des cas dans un contexte de NF1. En revanche, les schwannomes sont un critère diagnostique majeur de la *neurofibromatose de type 2 (NF2)*.

Tableau 1 : Classification histologique selon l'Organisation Mondiale de la Santé et pronostic de survie des astrocytomes, oligodendrogliomes et gliomes mixtes (Kleihues, Louis et al. 2002).

Grade	Pronostic de survie
Astrocytomes	
• Grade I (Astrocytomes pilocytiques)	Curable par la chirurgie
• Grade II (astrocytomes diffus)	10-15 ans
• Grade III (Astrocytomes anaplasiques)	2-3 ans
• Grade IV (Glioblastomes)	< 1 an
Oligodendrogliomes	
• Grade II	10-15 ans
• Grade III	5-10 ans
Gliomes mixtes	
• Grade II (oligoastrocytomes mixtes)	10-15 ans
• Grade III (oligoastrocytomes anaplastiques)	3-5 ans

Tableau 2 : Classification de l'OMS des tumeurs du système nerveux périphérique (Wager, Karayan-Tapon et al. 2005).

Cellules d'origine	Tumeurs (grade selon OMS)	Anomalies associées
Cellules de Schwann	Schwannomes (synonyme : neurinomes) (Grade I)	Inactivation du gène NF2 (22q12)
Association de cellules de Schwann et de fibroblastes et de cellules péri-neurales	Neurofibromes (Grade I)	Inactivation du gène NF1 (17q11)
Toute composante nerveuse	Tumeurs malignes de la gaine ou MPNST (Grade III-IV)	Anomalies du chromosome 17 (inactivation de NF1 et p53) Perte fréquente du chromosome 22 (NF2)

I.1.1.3 Classification de l'hôpital Sainte-Anne

Le professeur Daumas-Duport de l'Hôpital Sainte-Anne à Paris a proposé une nouvelle classification se basant sur l'histopathologie des biopsies *corrélées à l'imagerie* (scanner ou IRM) (Daumas-Duport, Beuvon et al. 2000). Cette classification distingue trois catégories parmi les gliomes infiltrants :

- les oligo-dendrogliomes,
- les oligo-astrocytomes de grade A ou B
- les glioblastomes.

Les travaux de ce groupe ont permis d'inclure les notions de *micro-angiogenèse* (détectée au microscope) et de *macro-angiogenèse* (détectée par imagerie). Cette classification distingue deux grades de malignité (A et B). Le *grade A* regroupe les tumeurs ne présentant pas d'hyperplasie endothéliale et ne captant pas l'agent de contraste. Histologiquement, le grade A est formé des tumeurs diffuses où les cellules tumorales sont dispersées dans le tissu sain. Le *grade B* correspond aux tumeurs de structure mixte, qui comprennent une partie solide et une partie infiltrante. En imagerie, les tumeurs de grade B ont donc souvent un aspect hétérogène, présentent une hyperplasie endothéliale et captent l'agent de contraste.

I.1.1.4 Comparaisons des classifications proposées

Les deux classifications présentées plus haut permettent d'établir le diagnostic et le *grading* mais reposent sur des approches très différentes (Tableau 3). La classification de l'OMS repose sur des critères histologiques basés sur *le type cellulaire prédominant* (oligodendrogial ou astrocytaire) pour tenter de définir les groupes de patients relativement homogènes en terme de survie. Elle a néanmoins deux limites :

- une faible reproductibilité de lecture de lames histologiques
- l'absence de caractère prédictif au niveau individuel : en effet, au sein d'une classe définie de malades, quelques individus suivent une évolution clinique très éloignée - qu'elle soit favorable ou péjorative - par rapport à celle qui était attendue.

La classification de l'Hôpital Sainte-Anne repose sur l'analyse de la *structure histologique tumorale* (tissu tumoral solide *ou* cellules tumorales isolées) et intègre *les données cliniques et d'imagerie*. Les groupes sont définis selon un plus grand nombre de critères et permettent de mieux garantir la représentativité des prélèvements (Wagner, Karayan-Tapon et al. 2005).

Tableau 3 : *Comparaison de la classification de l'OMS 2000 et de l'Hôpital St. Anne.*

	OMS 2000	St. Anne
Grade I	Croissance lente, survie longue tumeurs bénignes	Aucun critère présent
Grade II	Croissance relativement lente, survie longue ou courte suivant le grade, tumeurs bénignes ou malignes	1 critère présent (généralement atypie nucléaire)
Grade III	Croissance rapide, tumeurs malignes et progressant souvent vers le grade IV	2 critères présents (généralement atypie nucléaire et mitose)
Grade IV	Croissance très rapide, tumeurs très agressives tumeurs hautement malignes	3-4 critères présents

On voit bien ici qu'il serait nécessaire de mettre en place une classification unifiée des gliomes, notamment en compte l'examen *neuroradiologique* et le diagnostic *radiopathologique* pour guider au mieux le choix d'une stratégie thérapeutique. L'âge, la topographie et les données cliniques doivent être prises en compte dans l'interprétation morphologique. Les études de biologie moléculaire pourront certainement aider à mieux classer les gliomes à condition qu'elles soient pratiquées dans des sous-groupes homogènes de patients bien définis en termes de données cliniques, d'imagerie et d'histologie. Seule une approche *systématique*, permettra d'évaluer la place de la biologie moléculaire et de proposer une classification fiable des gliomes (Figarella-Branger and Bouvier 2005). On mesure ici toute l'importance d'une identification de signatures moléculaires spécifiques à chaque type de tumeurs. Nous verrons dans les chapitres suivants que la recherche de tels marqueurs n'a pas encore abouti à une situation aussi favorable.

I.1.2 Aspects épidémiologiques des tumeurs cérébrales

I.1.2.1 Incidence des tumeurs cérébrales sporadiques

L'incidence des tumeurs cérébrales primitives est difficile à estimer précisément car les séries de la littérature sont très hétérogènes (autour de 10 à 20 pour 100 000 personnes par an) (Vallat, Poirier et al. 1997). Chez l'enfant, les tumeurs du SNC sont les tumeurs les plus fréquentes et représentent 20 % des cancers pédiatriques, juste après les leucémies (30 % des cancers). Chez l'adulte, les tumeurs cérébrales primitives sont relativement plus rares mais leur incidence augmente avec l'âge (pic entre 65 et 74 ans). On estime à environ 2500-3000 le nombre de nouveaux cas de gliomes chaque année en France (Behin, Hoang-Xuan et al. 2003; Gray, Mokhtari et al. 2004). A titre de comparaison, il y a 250 000 nouveaux cas de cancers par an et on diagnostique environ 35 000 nouveaux cas de cancers du sein chaque année.

I.1.2.2 Les facteurs de risque environnementaux

L'origine des tumeurs cérébrales reste encore mal connue. De nombreuses études ont été menées pour détecter les facteurs de risque environnementaux des gliomes.

- *Les infections virales* : La notion que certains virus peuvent être à l'origine des tumeurs cérébrales repose principalement sur les arguments expérimentaux et cliniques. En particulier, l'existence d'une immunodépression prolongée due le plus souvent au sida augmente le risque d'un lymphome malin primitif. Certains types de virus oncogènes provoquent l'apparition de gliomes chez les animaux dans des conditions expérimentales très particulières.

- *Les radiations ionisantes* sont le seul facteur de risque indiscutable pour l'apparition de tumeurs cérébrales. Le risque de développement de méningiomes ou des tumeurs gliales radioinduites après une longue période de latence est multiplié par un facteur de 3 à 10 après l'irradiation du crâne à des doses de 4 à 60 Gy.

- *Les autres facteurs de risques* : La plupart des résultats ne sont que peu convaincants. Ainsi, ont été incriminés les traumatismes crâniens, l'épilepsie, la proximité des lignes électriques à haute tension, des facteurs nutritionnels, hormonaux ou infectieux, le tabac, l'alcool, les N-nitrosurées, les barbituriques, l'exposition professionnelle à différents toxiques (chlorure de vinyle, dérivés du pétrole, produits du caoutchouc, pesticides, formaldéhyde, ...). Plus récemment, l'usage des téléphones portables a été mis en cause, mais le recul n'est pas suffisant pour évaluer à long terme les risques potentiels du *rayonnement électromagnétique*.

I.1.2.3 Les maladies génétiques associées à des tumeurs cérébrales

Environ 1 à 10% des cancers peuvent être associés avec un syndrome héréditaire. Plusieurs syndromes génétiques connus prédisposant aux gliomes ont été découverts (Tableau 4). Certains de ces syndromes sont caractérisés par un phénotype particulier, facilement reconnaissable. Par exemple, les neurofibromatoses de type 1 et 2, la sclérose tubéreuse de Bourneville, la maladie de Von Hippel-Lindau s'expriment par une pénétrance élevée et avec un spectre caractéristique de néoplasmes du système nerveux, de tumeurs d'autres organes et d'autres lésions non cancéreuses. En revanche, d'autres syndromes s'exprimant avec une pénétrance plus faible, des tumeurs plus variées et sans autre trait phénotypique particulier sont plus difficiles à reconnaître. C'est notamment le cas du syndrome de Li-Fraumeni ou des cancers familiaux du sein et/ou de l'ovaire liés aux mutations de BRCA1 et BRCA2.

Tableau 4 : Les syndromes familiaux prédisposant aux tumeurs cérébrales.

Syndrome	Gène	Locus	Fonction de la protéine	Système nerveux
Neurofibromatose 1 (Recklinghausen)	<i>NF1</i>	<i>17q11</i>	Protéine activatrice des enzymes RasGTPases	Neurofibromes multiples, tumeurs malignes du SNP (MPNST), astrocytomes, gliomes du nerf optique, glioblastomes
Neurofibromatose 2	<i>NF2</i>	<i>22q12</i>	Organisation de la membrane cellulaire	Schwannomes multiples (dont neurinomes de l'acoustique bilatéraux), méningiomes multiples
Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	<i>3p26</i>	Facteur de transcription, de l'apoptose, du cycle cellulaire, de l'angiogenèse	Hémangioblastomes
Sclérose tubéreuse de Bourneville	<i>TSC1</i> , <i>TSC2</i>	<i>9q34</i> , <i>16p13</i>	Probablement l'oncogène de la famille RasGTPases	Astrocytome subépendymaire à cellules géantes
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	<i>17p13</i>	Facteur de transcription, de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN	Astrocytomes
Cowden	<i>PTEN</i>	<i>10q23</i>	Régulation de la phosphatidylinositol 3' kinase (flux calcique, croissance, migration cellulaire)	Gangliocytome dysplasique du cervelet, mégalencéphalie
Turcot	<i>APC</i> <i>hMLH1</i> <i>hPSM2</i>	<i>5q21</i> <i>3q21</i> <i>7p22</i>	Transduction du signal, réparation « mismatch » de l'ADN	Glioblastomes Médulloblastomes
Gorlin	<i>PTCH</i>	<i>9q31</i>	Régulation de la transcription des gènes du développement	Médulloblastomes, méningiomes, astrocytomes
Retinoblastome	<i>RB</i>	<i>13q14</i>	Régulation de la transcription	Retinoblastomes, gliomes, pineoblastomes

I.1.2.4 Le cas particulier de la neurofibromatose de type 1

Dans le cadre de cette thèse, la neurofibromatose de type 1 (NF1) sera retenue comme modèle de maladie génétique associée aux tumeurs cérébrales. Ces mêmes tumeurs associées à la NF1 seront également considérées comme des exemples représentatifs de tumeurs du SNP.

La neurofibromatose de type 1 est le syndrome héréditaire associé à des gliomes, d'incidence la plus fréquente (1 pour 4000 naissances) (Littler and Morton 1990). C'est une maladie autosomique dominante causée par les mutations du gène *NF1*. Le gène NF1 est situé sur le chromosome 17 (locus 17q11.2), sa structure est présentée dans la Figure 2A (Wallace, Marchuk et al. 1990). Il est de très grande taille (300 kbp), ce qui favorise les mutations (plus de 300 mutations germinales délétères ont été décrites). Ces mutations sont réparties sur

l'ensemble du gène et conduit le plus souvent à un produit du gène NF1, la *neurofibromine* (220 kDa), tronqué voire absent. La fréquence des mutations *de novo* est élevée: près de la moitié des mutations sont des cas sporadiques (Littler and Morton 1990; Lazaro, Ravella et al. 1994).

La neurofibromine est une protéine cytoplasmique présentant certaines homologies avec les protéines activatrices des guanosine triphosphatase RasGTPases, qui contribuent à maintenir le proto-oncogène Ras dans une forme inactive. La pathologie NF1 survient en cas de perte de la fonction suppressive (Figure 2B et 2C). Le facteur Ras est particulièrement actif dans les tissus du système nerveux et son activation mène à la prolifération et à la tumorigenèse (Basu, Gutmann et al. 1992; Daston, Scrable et al. 1992; DeClue, Papageorge et al. 1992; Heim, Silverman et al. 1994). Des mutations du gène *NF1* ont été trouvées occasionnellement dans certains gliomes (Tenan, Colombo et al. 1993; Jensen, Paderanga et al. 1995; Thiel, Marczinek et al. 1995).

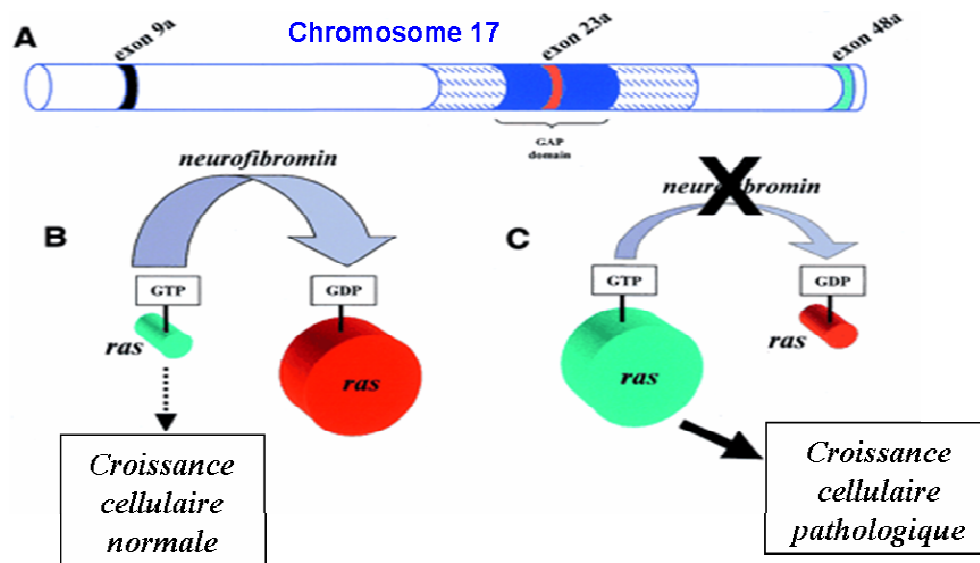


Figure 2 : Le schéma d'activation des domaines RasGAP.

(A) La neurofibromine, produit du gène NF1, contient trois exons alternativement traduits (9a, 23a et 48a) et deux régions d'homologie aux protéines IRA de levures (zone hachurée) avec le domaine RasGTP au milieu. (B) Le neurofibromine aide à la conversion de GTP-Ras actif vers GDP-Ras inactif. Si l'expression de NF1 est normale, Ras est moins actif et les signaux de prolifération cellulaire sont réduits. (C) L'inactivation fonctionnelle de NF1 trouvé chez les patients touchés par la neurofibromatose de type 1 conduit à la perte de l'activité RasGAP. L'altération de NF1 augmente l'activation de Ras ce qui entraîne une croissance cellulaire incontrôlée.

La neurofibromine semble ainsi servir principalement à la croissance et à la régulation du cycle cellulaire et pourrait jouer un rôle dans la transmission du signal. Elle agit ainsi sur la différenciation cellulaire et la régulation des oncogènes cellulaires. Cette protéine est associée aux microtubules, ce qui semble être un élément important mais encore mal élucidé. L'inactivation fonctionnelle des deux allèles du gène est nécessaire pour entraîner une dérégulation de la prolifération cellulaire. Les individus possédant une mutation germinale du gène *NF1* ont une prédisposition au développement des tumeurs malignes (neurofibrosarcomes, glioblastomes, phéochromocytomes, syndrome myélodysplasique) après une perte d'hétérozygotie au sein des tumeurs bénignes appelées *neurofibromes*. Le gène *NF1* est donc considéré comme un *gène suppresseur de tumeur*.

La pénétrance de la mutation est très forte (près de 100%) et la variabilité phénotypique est importante. La grande variabilité des signes cliniques au sein d'une même famille présentant donc la même mutation laisse penser que d'autres facteurs épigénétiques ou d'autres modulateurs comme TP53 pourraient être impliqués dans les manifestations cliniques. Comme on note de nombreuses formes cliniques des plus bénignes aux plus graves, le diagnostic de la *NF1* a été codifié par consensus international. Le patient peut donc être considéré comme porteur du syndrome quand il présente au moins deux signes de la liste du Tableau 5.

Tableau 5 : Les critères essentiels pour le diagnostic clinique du syndrome de la neurofibromatose de type 1 (Ferner, Huson et al. 2007).

-
1. \geq six taches café-au-lait ($\geq 1,5$ cm après la puberté et $>0,5$ cm avant la puberté)
 2. \geq deux neurofibromes ou un neurofibrome plexiforme
 3. \geq deux nodules iriens de Lisch
 4. un gliome du nerf optique
 5. des lésions osseuses de type dysplasie
 6. des taches lenticulaires de la région inguinale ou axillaire
 7. des antécédents familiaux directs de *NF1*
-

I.1.3 Aspects moléculaires et cellulaires des tumeurs cérébrales

I.1.3.1 Les différents modèles de neuro-oncogénèse (cellules souches ou instabilité)

Des études de caractérisation des altérations génétiques dans les gliomes malins ont récemment été publiées. La théorie sur les changements moléculaires pendant la tumorigénèse est fondée sur l'idée qu'une seule cellule est à l'origine du gliome. Les cellules souches multipotentes seraient à l'origine de la majorité des tumeurs, les glioblastomes inclus (Figure 3). Cette théorie récente propose que les gliomes se développent à partir de cellules pré-matures ou cellules *souches* par une succession de transformations génétiques (Galli, Binda et al. 2004; Vescovi, Galli et al. 2006). Une autre théorie présente la cellule qui donnera la tumeur comme n'ayant pas encore totalement accompli sa différenciation (Perez-Losada and Balmain 2003). La troisième théorie est basée sur l'hypothèse que les gliomes surviennent après une dédifférenciation d'un astrocyte mature (type cellulaire prédominant dans les tissus cérébraux) (Holland 2001).

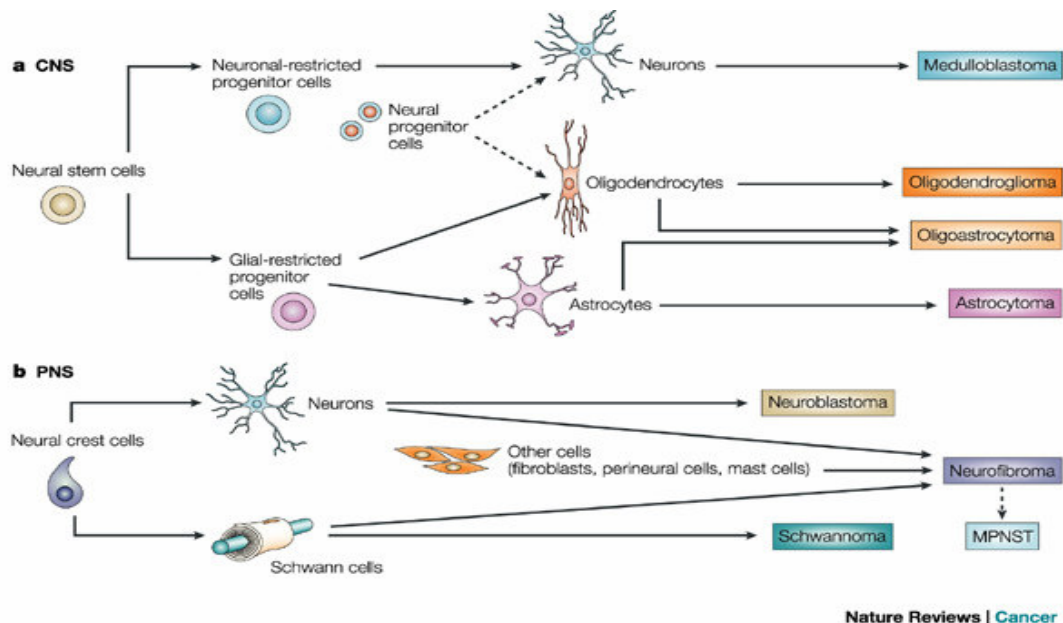


Figure 3 : Schéma du développement des cellules d'origine neuroectodermiques (neurones et cellules gliales) et classification des tumeurs du système nerveux central (A) et périphérique (B), l'extrait de (Zhu and Parada 2002).

I.1.3.2 Les cellules souches et la radiorésistance

Le glioblastome (grade IV) est une des malignités humaines la plus résistante à la radiothérapie. Les travaux de l'équipe de Bao ont éclairci les mécanismes moléculaires de cette radiorésistance (Bao, Wu et al. 2006). Dans les glioblastomes radiorésistants, les cellules souches ont été détectées. La fraction des cellules souche exprimant CD133 (un marqueur spécifique des cellules souches) augmente après le rayonnement dans certaines gliomes et ces tumeurs sont beaucoup plus réfractaires à la radiothérapie que les gliomes CD133-négatives (Bao, Wu et al. 2006). Ces cellules souche facilitent la réparation des dommages de l'ADN radioinduites en activant les points de contrôle du cycle cellulaire Chk1 et Chk2. Le traitement ciblant le mécanisme moléculaire de la progression du cycle cellulaire pourrait contourner cette radiorésistance des glioblastomes et nous fournir un modèle thérapeutique pour cette pathologie.

I.1.3.3 Les dérèglements génétiques et cellulaires liés au cancer

Les cellules normales sont programmées pour se multiplier, croître, se différencier, puis mourir en réponse à un système complexe de signaux régulant leur cycle cellulaire. Lors de la cancérogenèse, il y a rupture de contrôle de la croissance cellulaire, aboutissant à la prolifération anormale et anarchique d'un clone cellulaire particulier. Suite à ces événements, les cellules de ce clone vont présenter des caractéristiques de croissance et de morphologie complètement différentes de celles des cellules normales : une insensibilité et une autonomie vis-à-vis des facteurs régulant le cycle cellulaire (indépendance de facteurs de croissance cellulaire, insensibilité aux inhibiteurs de croissance), résistance à l'apoptose, potentiel répliatif « immortel », activation de l'angiogenèse, capacité métastatique et instabilité génétique (Hanahan and Weinberg 2000). C'est l'interaction entre ces différentes caractéristiques selon une chaîne d'évènements coordonnés qui entraîne la progression du cancer. Les changements phénotypiques sont le reflet de l'accumulation d'altérations génétiques multiples. Les événements génétiques et épigénétiques durant ce processus multi-étapes touchent une multitude de gènes, dont les *proto-oncogènes* et les *gènes suppresseurs de tumeur* (Figure 4).

Durant la tumorigenèse, les *proto-oncogènes* sont activés en oncogènes par des amplifications géniques, des translocations chromosomiques ou des mutations ponctuelles. Ces altérations peuvent provoquer leur surexpression et des changements structuraux qui modifient ainsi leur fonction. Quel que soit le type de mutation en cause, elle se traduit par un « gain de fonction ». Ce mode d'action est dominant, c'est à dire qu'il suffit qu'un seul allèle du proto-oncogène soit activé pour contribuer à la transformation tumorale.

Un *gène suppresseur de tumeur* est un gène dont l'altération durant la carcinogenèse résulte de la perte de fonction essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire normale. Cette perte de fonction est un mécanisme récessif, c'est à dire que les deux allèles du gène doivent être inactivés. Le processus de perte du deuxième allèle est appelé aussi LOH (en anglais *loss of heterozygosity*). L'inactivation de ces gènes peut être due à la perte des allèles du gène, à de petites délétions ou insertions qui altèrent la trame de lecture du gène, à des mutations ponctuelles changeant des acides aminés cruciaux pour l'activité de la protéine ou à la baisse de la transcription par l'altération du promoteur. Récemment, les gènes suppresseurs de tumeur ont été classés selon leurs fonctions en deux groupes:

- les *gardiens de la prolifération (gatekeepers)* interviennent dans le contrôle du déroulement du cycle cellulaire en empêchant le développement des cellules potentiellement cancéreuses dans le cadre d'une régulation au niveau de la cellule, du tissu ou de l'organisme en bloquant la prolifération ou en induisant la mort cellulaire (apoptose).

- les *gardiens du génome (caretakers)* qui sont les protéines de réparation des dommages de l'ADN qui interviennent pour protéger le génome de mutations acquises. L'inactivation des caretakers n'augmente pas la prolifération cellulaire mais initie l'acquisition de changements génétiques supplémentaires. (Kinzler and Vogelstein 1997).

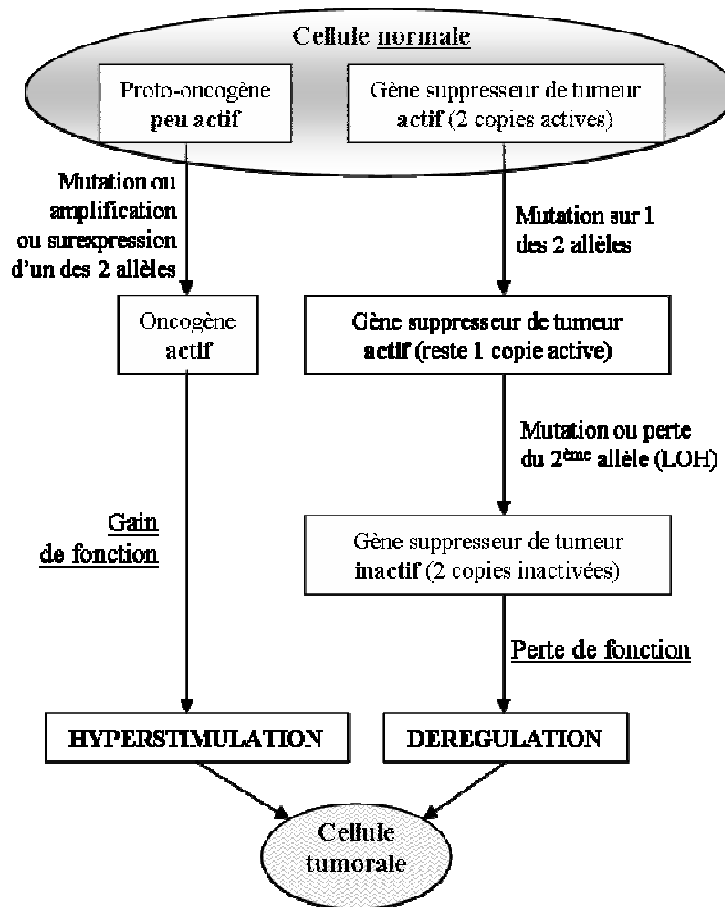


Figure 4 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse.

1.1.3.3.1 Les signatures moléculaires et cytogénétiques des gliomes

De nombreuses recherches ont été effectuées pour déterminer si les gliomes possèdent des signatures moléculaires. En général, les investigations se sont focalisées sur les d'altérations de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, des facteurs de croissance, des signaux de l'apoptose et donc plus particulièrement des gatekeepers. Ainsi, les anomalies sur les chromosomes 7, 9, 10, 12, 13, 17, 19 ou 22 ont été détectées fréquemment dans les gliomes : ce sont notamment des altérations génétiques ou épigénétiques, telles que des délétions, des amplifications, des gains, des mutations ponctuelles, des méthylations ou des deméthylations. Les délétions et les pertes d'hétérozygotie impliquent surtout les gènes suppresseurs de tumeurs. Les gains impliquent surtout les gènes de l'initiation et de la

progression tumorale comme les oncogènes. L'équipe de Sonoda a proposé des signatures moléculaires d'origine des glioblastomes (Figure 5).

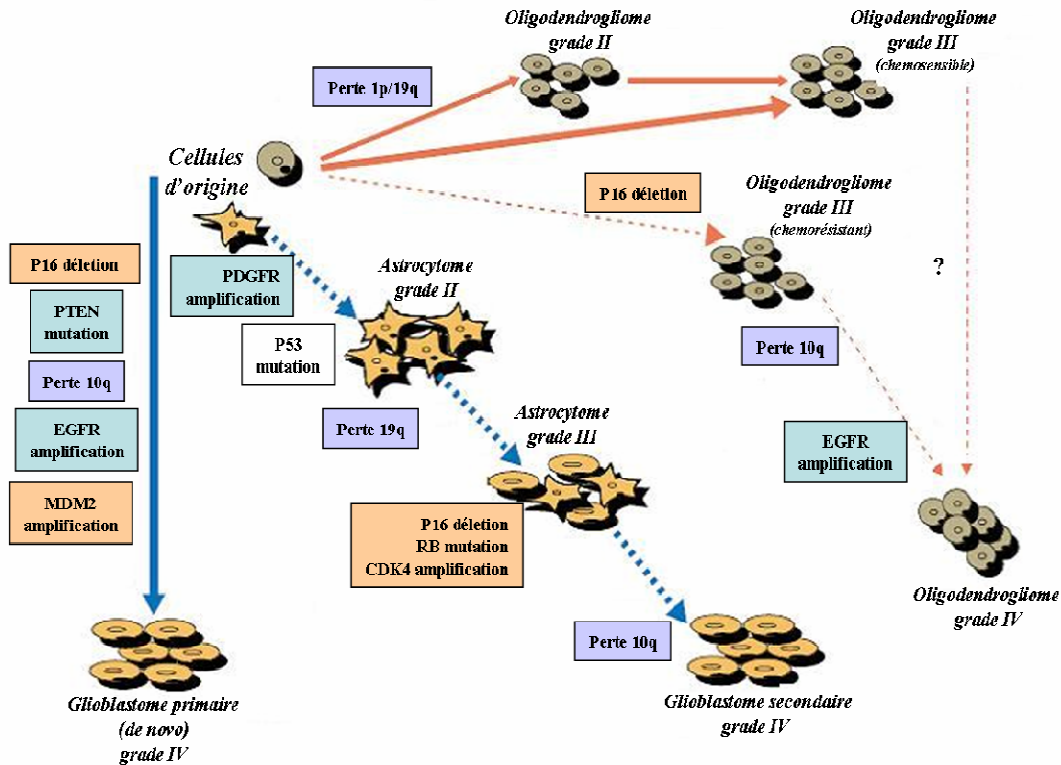


Figure 5: Voies génétiques de progression maligne : évolution des glioblastomes primaires, secondaires et oligodendrogliomes (Behin, Hoang-Xuan et al. 2003).

Les glioblastomes *primaires (de novo)* sont plus fréquents (plus de 80 % des cas) et se développent rapidement chez le sujet âgé avec une histoire clinique inférieur à 6 mois. Leur profil génétique inclut une amplification et une surexpression du gène du récepteur EGF, de mutations *PTEN*, de délétions de p16INK4A et de perte du chromosome 10 (Sonoda, Ozawa et al. 2001). Les glioblastomes *secondaires* se développent à partir d'un astrocytome de grade II et d'un astrocytome anaplastique (grade III) vers le grade IV. Le glioblastome *secondaire* est caractérisés par des mutations de *p53* et une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 10q. Il se développe à la suite d'une longue période (2-10 ans) à partir d'un astrocytome de bas *grade* et il apparait surtout chez les personnes jeunes. Les deux types de glioblastomes infiltrent le cerveau de manière diffuse, y compris l'hémisphère opposé, et présentent de grandes zones de nécrose malgré une prolifération vasculaire excessive.

Plusieurs voies moléculaires endommagées ont été ainsi identifiées et deux voies majeures de signalisation ont été proposées pour la gliomagenèse : la transduction du signal et le contrôle du cycle cellulaire. Le Tableau 6 donne les altérations les plus fréquemment rencontrées suivant le type de gliome.

Tableau 6 : Les altérations génétiques les plus fréquentes des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs dans les astrocytomes (Castro, Cowen et al.) et les oligodendrogliomes (oligo) (Hoang-Xuan, Idbaih et al. 2005).

Gènes	Siège	Principale altération	Fonction	Incidence (%)	
				astro	oligo
PROTO-ONCOGENES					
EGFR	7p	Amplification / Mutation	Transduction	40	0-20
PDGFR	4q	Amplification	Transduction	5-10	5-10
CDK4	12q	Amplification	Cycle	5-10	-
MDM2	12q	Amplification	Cycle	10	-
GENES SUPRESSEURS DE TUMEURS					
TP53	17p	Mutation	Cycle, Apoptose, Réparation	40	10
PTEN	10q	Mutation	Transduction, Invasion	20	-
P16/CDKN2A	9p	Délétion	Cycle	50	20
RB	13q	Mutation	Cycle	20	-
P14^{ARF}	9p	Délétion / Méthylation	Cycle	20	20
?	1p	?	LOH	10	50-80
?	19q	?	LOH	40	50-80
?	10q	?	LOH	80	30
?	22q	?	LOH	25	25

1.1.3.3.2 Les voies de transduction du signal

- **voie EGFR/PDGFR :** Cette voie concerne les facteurs de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) avec leurs récepteurs à fonction de tyrosine kinase EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ou PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*). Leur liaison au ligand entraîne l'activation de seconds messagers tels que Ras/MAPK et PI3K/Akt. Les gliomes peuvent activer ces voies par différents mécanismes : une surexpression des ligands et de leurs récepteurs (exemple de *PDGF/PDGFR*), une amplification génomique et/ou mutation du récepteur (exemple de *EGFR*), ou une activation de la transduction de signal intracellulaire (exemple d'inactivation de *PTEN*, voir plus bas).

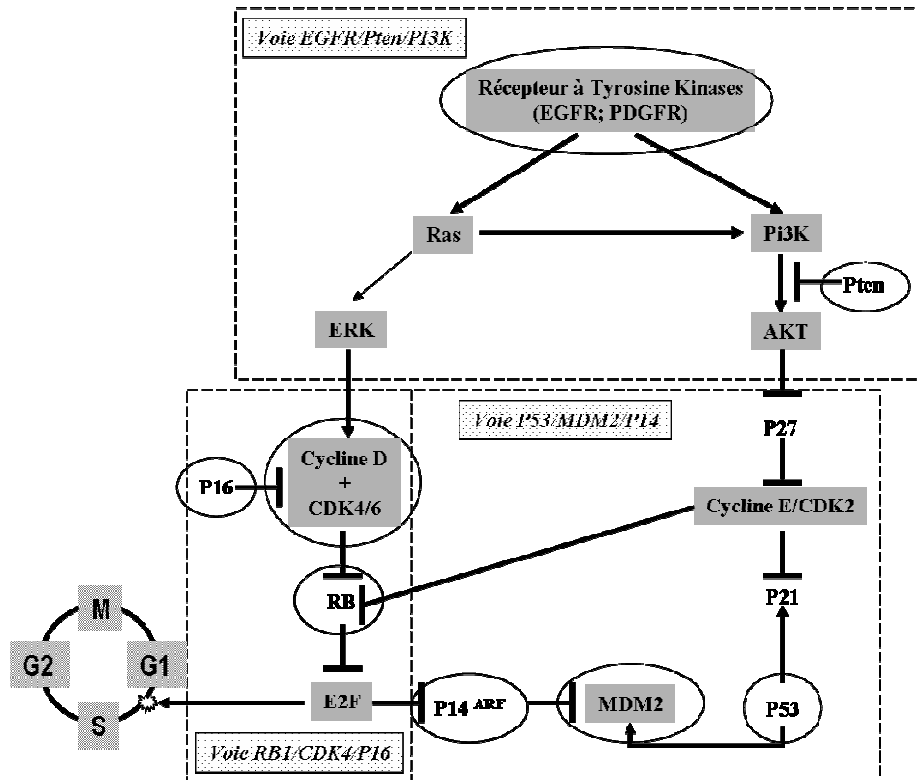


Figure 6 : Schéma simplifié des trois voies principales impliquées dans l'oncogénèse des gliomes. Les oncogènes sont représentés ici dans des rectangles gris et les gènes suppresseurs en blanc (Behin, Hoang-Xuan et al. 2003).

- **voie Ras/MAPK :** Les liaisons entre les facteurs de croissance et les récepteurs membranaires entraînent l'activation de seconds messagers tels que l'oncogène Ras, grâce à une cascade de phosphorylations. Dans les gliomes, la voie Ras/MAPK est souvent activée par les facteurs de croissance (Behin, Hoang-Xuan et al. 2003).

- **voie PI3-Kinase/PTEN :** La phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) peut être également active dans les glioblastomes comme une conséquence de la surexpression de l'*EGFR* ou de l'inactivation du *Pten*. PI3K active Akt, qui phosphoryle plusieurs cibles critiques comme par exemple le mTOR (Mamalian Target of Rapamycine). Certains nouveaux traitements ciblés consistent à bloquer cette cascade de phosphorylations pour empêcher la croissance tumorale (Behin, Hoang-Xuan et al. 2003).

I.1.3.3 Les voies du contrôle du cycle cellulaire

- **voie p16 - CDK4 - RB** : Cette voie agit sur l'inactivation de *Rb1* ou de *p16* (locus *CDKN2A*) ou l'amplification de *CDK4* qui mène à la perte de contrôle du cycle cellulaire. P16 activée inhibe sélectivement le complexe des cyclines CDK4/6, qui phosphoryle Rb1. Rb1 non-phosphorylé réprime la capacité du facteur de transcription E2F à activer les protéines qui favorisent la progression du cycle cellulaire. L'activité de CDK4/6 peut être également inhibée par l'activation des inhibiteurs de CDK comme p21 et p53 (Figure 6).

- **voie p14/ARF - MDM2 - p53** : Cette voie est caractérisée par l'inactivation de p53 ou de *p14/ARF* ou l'amplification de MDM2 (*murin double mutant 2*). La protéine p53 dirige la réponse cellulaire aux dommages *génotoxiques* en induisant un arrêt du cycle cellulaire et le processus de l'apoptose. L'inactivation de p53 est considérée comme un des processus les plus précoces de la transformation gliale car il peut engendrer l'instabilité génomique et/ou l'immortalisation cellulaire. Le MDM2 est l'inhibiteur de p53, il facilite la dégradation de p53. Cette dégradation peut être inhibée par p14^{ARF}, codé par le même locus *CDKN2A* que p16, mais avec un cadre de lecture alternatif. Le locus *CDKN2A* est fréquemment muté ou hyperméthylé dans les gliomes malins. La protéine p53 inhibe la progression du cycle cellulaire dans la phase G1 via l'inhibition de p21.

I.1.3.4 Conclusions sur les aspects moléculaires des gliomes

A la lumière de la littérature, vu la diversité des concepts développés dans les différents modèles de gliomagenèse qui sont proposés (cellules souches ou instabilité génomique) et vu l'absence de consensus dans la définition de signatures moléculaires précises, les tumeurs cérébrales donnent, encore aujourd'hui, le sentiment d'une extrême complexité, ou que les recherches actuelles sont dans une impasse, peut-être à cause d'un manque de connaissances fondamentales. Nous allons voir dans le chapitre suivant consacré aux aspects thérapeutiques des gliomes comment les données moléculaires déjà obtenues ont pu orienter les stratégies anti-gliomes.

I.1.4 Aspects thérapeutiques des gliomes

Après le diagnostic histologique du gliome malin, le traitement de la lésion tumorale repose sur une stratégie pluridisciplinaire associant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En 2002, un rapport sur les *Standards, Options et Recommandations pour la prise en charge des patients atteints de gliomes intracrâniens de l'adulte* (Frappaz, Chinot et al. 2003) a permis de définir les recommandations pour la prise en charge des tumeurs cérébrales. Dans le but d'harmoniser et d'augmenter l'efficacité du traitement en France et en se basant sur une revue critique de la littérature scientifique, ce rapport a défini les grandes lignes du diagnostic et des stratégies thérapeutiques.

I.1.4.1 La chirurgie des gliomes

Les buts de la chirurgie des tumeurs cérébrales sont multiples : établir le diagnostic histologique, améliorer les symptômes neurologiques, apporter un contrôle local de la maladie pour améliorer le pronostic vital (Mitchell, Ellison et al. 2005). L'ablation chirurgicale reste un des moyens thérapeutiques les plus bénéfiques pour les tumeurs solides bien limitées. Sur le plan thérapeutique, les glioblastomes semblent cumuler les handicaps et représentent un véritable défi car leur caractère diffus et infiltrant rend illusoire leur résection complète. La qualité du geste chirurgical influence la survie mais la récurrence postopératoire est encore inévitable (Shinoda, Sakai et al. 2001).

I.1.4.2 La radiothérapie des gliomes

La thérapie par les radiations ionisantes reste un outil fondamental pour une prise en charge optimale des patients atteints de cancer. La radiothérapie peut compléter et parfois remplacer un geste chirurgical. Elle concerne essentiellement les tumeurs malignes. La radiothérapie fractionnée : la dose thérapeutique est délivrée en plusieurs séances. A la fin des années 1970, plusieurs études cliniques de phase III ont démontré que la radiothérapie focalisée réalisée en postopératoire permettait d'augmenter la médiane de survie des patients atteints d'une tumeur cérébrale maline, faisant de cette approche un standard thérapeutique

(Walker, Alexander et al. 1978). Ainsi, la radiothérapie de 60 Gy multiplie la durée de survie par un facteur de 2 à 10 selon les publications, accroît significativement le pourcentage de survivants à 18 mois et le taux de survivants à long terme (Loiseau 2004). Les facteurs pronostiques des gliomes malins sont liés à l'histologie selon les critères de l'OMS (Kleihues, Louis et al. 2002), à la qualité de l'exérèse (Glantz, Burger et al. 1991), à l'âge des patients et à leur état général (Curran, Scott et al. 1993; Loiseau 1996). La difficulté du traitement de ces tumeurs cérébrales, en plus de leur radiorésistance, résulte aussi de la définition du volume à traiter. Le volume tumoral macroscopique (GTV) correspond à la prise de l'agent de contraste pendant l'imagerie ou en cas de l'ablation chirurgicale, aux bords de la cavité opératoire. Le volume cible clinique (CTV) comprend une zone de sécurité de 2 cm au-delà des limites du GTV (surtout dans le cas des tumeurs infiltrantes), dans les trois dimensions du volume tumoral. La dose prescrite et la largeur de la marge de sécurité sont établies en fonction du grade, du type histologique, du volume tumoral et de la localisation de la lésion ainsi que de la proximité des structures à risque dans le cerveau. Des faisceaux multiples, isocentriques et non coplanaires (3 à 5) doivent être utilisés afin de minimiser la dose totale délivrée par fraction dans le cerveau en dehors du volume tumoral. Les *Standards, Options et Recommandations* recommandent de traiter les glioblastomes avec une dose totale de 60 Gy, fractionnée à une raison de 1.8-2 Gy par jour délivrée 5 jours par semaine (Castro, Cowen et al. 2003; Frappaz, Chinot et al. 2003).

Denombreuses équipes ont tenté d'augmenter l'efficacité de l'irradiation en modifiant les modalités d'administration (radiothérapie hypo ou hyper fractionnée, irradiation accélérée...). *Aucune stratégie ne s'est cependant révélée supérieure à ce protocole standard.* Hormis les rayons X et les électrons, d'autres particules peuvent être utilisées en France: les protons à Orsay et les neutrons rapides à Orléans. La radiothérapie utilisant des protons ou des ions plus lourds, hadronthérapie, est un traitement prometteur pour les gliomes en raison de sa précision balistique et de ses effets biologiques spécifiques (Schiffer 2005).

I.1.4.3 La radiochirurgie des gliomes

La radiochirurgie est une approche basée sur l'emploi des rayonnements ionisants qui permet de traiter des petits volumes intracrâniens avec une très grande précision. Cette

technique consiste à focaliser des faisceaux multiples (rayons γ du Cobalt ou photons X) au niveau de la lésion et à déposer une dose importante (30 Gy) en une seule fraction. De façon intéressante, l'effet biologique de cette dose déposée en une seule séance n'est pas comparable avec celui de 30 Gy en 10 fractions de radiothérapie classique. L'effet radiobiologique de cette dose unique est à peu près équivalent à 200 Gy fractionnés. Les indications de cette technique concernent essentiellement des tumeurs de petite taille (< 3 cm de diamètre) comme les schwannomes, les métastases, les tumeurs de la région hypophysaire et dans certaines conditions les méningiomes. La radiochirurgie a malheureusement montré très peu de résultats positifs dans le traitement des gliomes diffus, sauf pour des lésions diagnostiquées très précocement (Larson, Gutin et al. 1996).

I.1.4.4 La chimiothérapie des gliomes

I.1.4.4.1 La chimiothérapie systémique

En général, la réponse tumorale à la chimiothérapie systémique varie beaucoup selon le tissu d'origine des tumeurs. (Stewart 2003). Certaines lésions cérébrales, telles que les oligodendrogliomes anaplastiques ou les médulloblastomes répondent très bien au traitement, tandis que les néoplasies les plus fréquentes, astrocytomes anaplastiques et glioblastomes, font partie des tumeurs les moins chimiosensibles (Bredel 2001; Cairncross, Seiferheld et al. 2004).

Les molécules de chimiothérapie les plus actives, et les plus étudiées, sont en particulier les nitrosourées (bis-chloro-ethyl-nitroso-urée (BCNU), chloro-2-ethyl-1-cyclohexyl-3-nitroso-urée (CCNU)), les composées dérivés de platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine), la procarbazine (Stewart 2002) et de façon plus récente, le témozolomide (Stupp, Mason et al. 2005). Les thérapies ciblées qui visent les changements moléculaires spécifiques dans les gliomes sont décrites dans la suite.

Les premières études randomisées (comparant une irradiation suivie d'une chimiothérapie à la radiothérapie seule) n'ont pas démontré de façon évidente et reproductible, une augmentation de la médiane de survie mais plutôt une augmentation du pourcentage de survivants à 18 et 24 mois (Walker, Alexander et al. 1978). C'est pourquoi la chimiothérapie a initialement été réservée au traitement des *récidives*. Dans cette situation, la plupart des études

ont en effet montré que l'on pouvait espérer un taux de réponse d'environ 10 % après l'addition d'une chimiothérapie (les nitrosourées en majorité) sur une courte période (4 à 6 mois) (Yung, Albright et al. 2000).

L'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante a été confirmé par les résultats de deux méta-analyses. Ces résultats ont montré un bénéfice modeste en termes de médiane de survie et de pourcentages de survivants à long terme, mais les critères cliniques ou histologiques des « bons chimio-répondeurs » n'ont pas pu être recherchés (Fine, Dear et al. 1993; Stewart 2002). La méta-analyse publiée par le Glioma Meta-analysis Trialist Group (GMTG) (Stewart 2002) s'est fondée sur 12 essais randomisés (ayant inclus 3004 patients dont 63 % atteints d'un glioblastome) qui comparaient une radiothérapie exclusive à une radiothérapie associée à une chimiothérapie (nitrosourées plus ou moins associées à une autre drogue). Dans cette méta-analyse, les résultats ont montré que l'adjonction de chimiothérapie améliorait significativement la survie ($p < 0,0001$) avec une diminution du risque relatif de décès de 15 % et apportait un gain en médiane de survie de 2 mois de façon indépendante de l'âge et de l'histologie (grade III ou IV).

Plus récemment, une étude thérapeutique de phase III, menée par l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer) (Stupp, Mason et al. 2005) a pu évaluer l'efficacité d'une nouvelle molécule de chimiothérapie, le témozolomide (Témodal) sur les 573 patients avec un glioblastome nouvellement diagnostiqué. Le traitement administré de façon concomitante avec la radiothérapie standard a été comparé au traitement standard seule (radiothérapie seule, 60 Gy en 30 fractions de 2 Gy). Un gain de survie de près de 3 mois a été obtenu : médiane de survie de 14.6 mois après témozolomide + radiothérapie *versus* 12.1 mois après radiothérapie seule ; $p < 0.001$. Après cette étude, le nouveau traitement standard des glioblastomes a été défini, reposant sur l'administration de témozolomide en traitement concomitant et adjuvant du schéma conventionnel de radiothérapie.

1.1.4.2 La chimiothérapie intratumorale

La situation particulière du cerveau, isolé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) bloque la pénétration des molécules de chimiothérapie dans le parenchyme cérébral et influence ainsi le résultat du traitement. Les méthodes de *chimiothérapie intratumorale* sont

développées pour s'affranchir des limites de la BHE. Ces méthodes consistent en une application locale (dans le lit tumoral) des drogues anticancéreuses via les cathéters ou via des implants en polymères qui diffusent le produit localement. L'injection par cathéter permet de réaliser des applications répétitives, prolongées ou à faible débit grâce aux pompes permettant de contrôler le débit de fluide. Les implants, de taille ou de matières différentes, sont chargés avec une drogue donnée. Le traitement anticancéreux est diffusé de façon constitutive, toutes les grandes classes de molécules ont été testées. Les résultats cliniques ne montrent que de faibles améliorations de la survie (gain de 2 mois pour les patients avec les implants chargés par BCNU comparés avec les patients traités par *placebo*) et par rapport au traitement systémique (Westphal, Hilt et al. 2003). Par contre, cette méthode présente les grands avantages de réduire les effets toxiques systémiques de la chimiothérapie et de concentrer les molécules efficaces *au sein même de la tumeur*.

I.1.4.5 Les traitements combinés et les traitements ciblés

Le traitement combiné de la chimiothérapie cytotoxique et de la radiothérapie permet d'augmenter l'index thérapeutique en améliorant le contrôle local et de réduire la dissémination métastatique des cancers (Favaudon and Noel 2005). Elle est souvent utilisée dans le traitement des tumeurs cérébrales non opérables ou dans la phase postopératoire afin de bloquer la dissémination de la maladie (Frappaz, Chinot et al. 2003). Les drogues en mono ou polychimiothérapie (les nitrosourées, les sels de platine, le témozolomide, la procarbazine...) peuvent être utilisées en combinaison avec la radiothérapie selon des critères de tolérance et d'efficacité.

L'interaction entre les deux modalités thérapeutiques peut être à l'origine de mécanismes multiples affectant la formation ou la réparation des dommages radioinduits de l'ADN, l'altération de la progression du cycle cellulaire, la réoxygénation des tumeurs, la repopulation ou l'inhibition de l'angiogenèse tumorale (Favaudon and Noel 2005).

Les récentes découvertes dans le domaine des voies de signalisation impliquées notamment dans la gliomagenèse (voir chapitre 1.1.3.2.) ont permis de développer de nouvelles molécules thérapeutiques agissant spécifiquement sur ces changements moléculaires. Les groupes principaux de ces traitements ciblés sont les *inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase*

EGFR (Tarceva®, Iressa®) ou PDGFR (Glivec®), de la farnétylation de Ras (Zarnestra®), de mTOR (mammalian target of rapamycin). Les effets de ces drogues anti-prolifératives, pro-apoptotiques et anti-angiogéniques (Figure 7), ils permettent d'augmenter la sensibilité vis-à-vis des traitements classiques de chimio-radiothérapie. Plusieurs essais cliniques de phase I-III de produits ciblés sur les gliomes sont en cours (Hutterer, Günsilius et al. 2006).

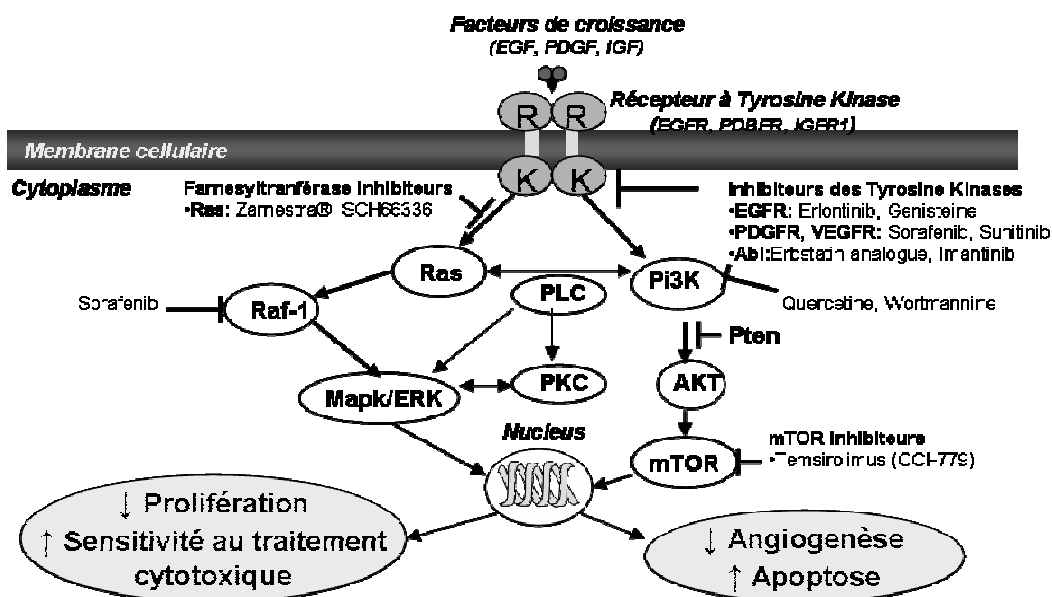


Figure 7 : Schéma de l'activation des voies moléculaires de signalisation dans les gliomes et leur modulation par les thérapies ciblées.

I.1.4.6 Les traitements expérimentaux utilisant le rayonnement synchrotron

Même si le synchrotron européen de Grenoble (ESRF) n'a pas été le premier à l'origine de l'utilisation du rayonnement synchrotron dans les stratégies anti-gliomales, il réunit aujourd'hui les trois grands types d'approches utilisées. Nous nous focaliserons donc dans ce chapitre sur les applications médicales à l'ESRF.

I.1.4.6.1 Le rayonnement synchrotron: rappels et stratégies

L'ESRF est un synchrotron de 3ème génération capable de produire un rayonnement synchrotron. Les électrons sont accélérés par deux accélérateurs successifs (Figure 8). Le

rayonnement synchrotron est un rayonnement électromagnétique de faible longueur d'onde (rayons X mous), caractérisé par une très grande intensité. Il est produit par des paquets d'électrons de très haute énergie qui circulent selon une trajectoire quasi circulaire, dans un anneau de stockage prévu à cet effet. Lorsque ces paquets d'électrons sont déviés de leur trajectoire par un champ magnétique intense, ils émettent des photons de haute intensité tangentiellement à leur trajectoire : c'est le rayonnement synchrotron (Figure 9).

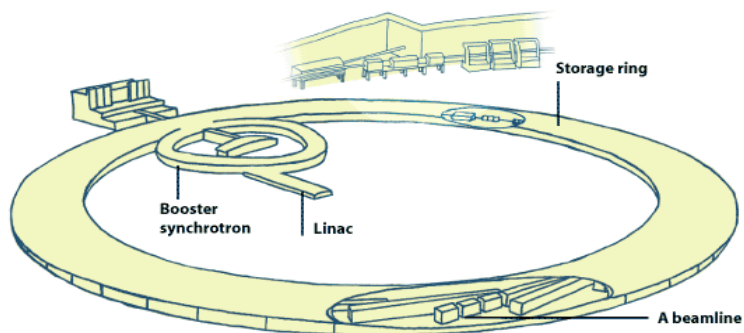


Figure 8 : *Les différents accélérateurs à l'ESRF.*

Production du rayonnement synchrotron : Les électrons sont émis par un canon à électrons, puis accélérés dans un accélérateur linéaire et injectés dans le synchrotron Booster où ils sont de nouveaux accélérés jusqu'à une énergie optimale. Puis ils sont injectés dans l'anneau de stockage (storage ring) où ils sont déviés de leur trajectoire. Le rayonnement synchrotron est récupéré (ligne de lumière) jusqu'à la salle d'expérimentation à la fin de la ligne de lumière (beamline).

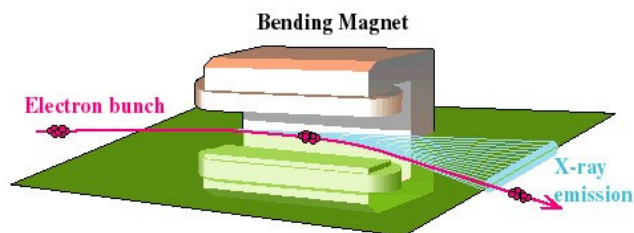


Figure 9 : *Schéma d'un aimant de courbure.*

Les irradiateurs médicaux standardisés produisent généralement les rayons X polychromatiques de haute énergie (entre 5 et 25 MeV), ce qui facilite le traitement des

tumeurs situées en profondeur. Le rayonnement synchrotron (10-100 keV) est caractérisé par sa haute fluence. Il est beaucoup moins pénétrant et donc indiqué pour les tumeurs peu profondes. Le programme de recherche mené sur la ligne médicale (ID 17) est actuellement axé sur les trois stratégies innovatrices de la radiothérapie des tumeurs cérébrales. Historiquement, ces trois modalités thérapeutiques utilisant le rayonnement synchrotron ont été conçues selon trois points de vue différents (Figure 2 ; tableau 7):

- les radiologues et les spécialistes de l'imagerie proposent de charger la tumeur avec un agent de contraste contenant des atomes lourds tels que l'iode ou le gadolinium, prendre l'image de cette tumeur pour établir sa localisation et son volume à irradier, irradier la tumeur en favorisant *l'effet photoélectrique* (la photoactivation) par le rayonnement synchrotron monochromatique à l'énergie de résonance de l'iode ou du gadolinium. La technique développée dans notre équipe est appelée la *radiothérapie par photoactivation des agents de contraste* (« Computed Tomography » thérapie) (Adam, Elleaume et al. 2003; Adam, Biston et al. 2005) ;

- les radiothérapeutes et les oncologistes proposent une autre modalité, appelée la *radiothérapie par photoactivation des drogues platinées* (PAT-Plat). L'idée est de charger la tumeur avec des drogues platinées (cisplatine, carboplatine ou oxaliplatine) intensivement utilisées en chimiothérapie et ensuite de photoactiver les atomes de platine pendant l'irradiation par le rayonnement synchrotron monochromatique à l'énergie de résonance du platine (78 keV) (Corde, Balosso et al. 2003; Biston, Joubert et al. 2004; Biston, Joubert et al. 2007).

- les physiciens proposent de maximaliser le dépôt d'énergie dans le volume tumorale en employant le rayonnement synchrotron polychromatique avec un débit de dose très élevé (625 Gy délivrés en quelques millisecondes) sous forme de faisceaux micrométriques multiples, parallèles et planaires. C'est la *thérapie par microfaisceaux* (MRT) (Laissue, Geiser et al. 1998).

Ces trois options thérapeutiques (Figure 10, Tableau 7) sont décrites plus en détails et les résultats obtenus sont comparés dans une revue qui fait partie de cette thèse (Revue 1).

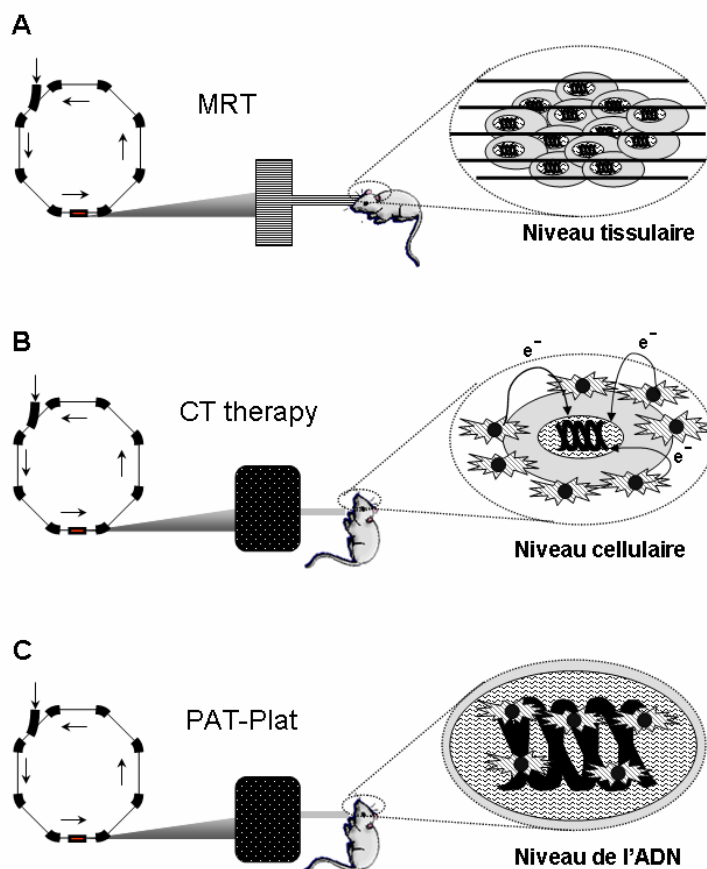


Figure 10 : *Présentation des trois modes de radiothérapie expérimentale utilisant le rayonnement synchrotron (Revue 1).*

1.1.4.6.2 Résumé des acquis de l'utilisation du rayonnement synchrotron

La comparaison des survies de rats traités porteurs de gliomes figure dans la revue I. Il apparaît que la PAT-Plat offre les meilleurs résultats de guérison et de survie. Basée sur une synergie entre radiation et cisplatine, cette modalité suggère que les gliomes peuvent répondre à une radio-chimiothérapie utilisant des molécules utilisées pour d'autres types de cancers (Revue 1).

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des 3 applications médicales du rayonnement synchrotron contre les gliomes.

Méthode	Principe	Hypothèses	Avantages	Inconvénients
Radiothérapie par photoactivation des agents de contraste iodés (CT thérapie)	Radiothérapie stéréotaxique utilisant l'effet de renforcement de l'effet photoélectrique dans la tumeur via les agents de contraste	Dose physique renforcée déposée au sein de la tumeur contribue à la disparition de la tumeur	Séance concomitante de l'imagerie et de la radiothérapie Application intraveineuse	Diffusion extravasculaire Photoactivation extranucléaire (en dehors de l'ADN) Toxicité des produits de radiolyse
Radiothérapie par photoactivation des molécules platinées (PAT-Plat)	Radiothérapie stéréotaxique utilisant l'effet de renforcement de l'effet photoélectrique dans la tumeur via les drogues platinées de chimiothérapie	Effet synergique de la radio-chimiothérapie renforcées par la photoactivation des atomes de platine sur l'ADN	Accumulation des drogues platinées dans la tumeur Photoactivation intranucléaire Vise directement l'ADN	Injection intracrânienne (Intratumorale)
Radiothérapie par microfaisceaux (MRT)	Radiothérapie utilisant les doses élevées sous forme de microfaisceaux en série, multiples, parallèles et planaires	Dose physique renforcée déposée au sein de la tumeur contribue à la disparition de la tumeur	Prévention de la nécrose tumorale par repopulation des tissus sains par les cellules originaires de la vallée entre les deux microfaisceaux	Positionnement du patient Dose résiduelle dans la vallée Effet bystander toujours peu connu Nombreux paramètres d'irradiation testés (dose, taille des microfaisceaux, des vallées...)

1.1.5 Les modèles de gliomes et leur utilisation dans les études précliniques

La compréhension des facteurs comme la *chimiorésistance* ou la *radiorésistance* ainsi que l'évaluation de l'efficacité des traitements requièrent l'utilisation de modèles appropriés. De tels tests incluent l'utilisation de cultures cellulaires (*in vitro*) et de modèles animaux (*in vivo*). La majorité des lignées cellulaires ont été produites par la sélection des clones par culture cellulaire. Malheureusement, ces facteurs de sélection ne sont probablement pas les mêmes que les facteurs présents dans la tumeur d'origine. Ainsi, l'histologie et la génétique de ces tumeurs implantées peuvent ne pas refléter fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines (Vogel, Zhuang et al. 2005; Becher and Holland 2006).

I.1.5.1 Les modèles d'implantation

La greffe des cellules tumorales chez le rongeur représente l'approche la plus commune pour étudier la gliomagenèse et la réponse à un traitement *in vivo*. Les modèles conventionnels de gliomes reposent sur l'injection de cellules tumorales, soit en sous-cutané (injection *ectopique*), soit dans le cerveau (injection *orthotopique*). Les cellules d'origine humaine sont injectées chez des souris immunodéprimées, tandis que les lignées dérivées de rongeurs peuvent être injectées chez un animal de la même espèce (syngénique). La majorité des gliomes expérimentaux ont été *induits* chimiquement par un traitement de l'animal avec un mutagène. Ces tumeurs présentent divers phénotypes comparables aux astrocytomes, glioblastomes et gliosarcomes. Les cellules les plus communément utilisées pendant ces trois dernières décennies sont issues des lignées de gliomes de rat C6, 9L et F98, qui ont été isolées chez le rat par un traitement mutagène avec des dérivés de la nitrosourée, tels que la méthylnitrosourée (MNU) ou éthylnitrosourée (ENU). Ces lignées peu immunogènes sont capables de produire une tumeur cérébrale après injection intracrânienne (Tableau 8).

Les lignées cellulaires humaines dérivées des gliomes les plus utilisées sur des souris immunodéficientes (*souris nude*) sont U87, U118, U373 et LN229. Evidemment, même s'ils sont intensivement utilisés pour évaluer les modalités thérapeutiques en radio - chimiothérapie des gliomes, les modèles animaux et humains ne présentent pas les mêmes caractéristiques moléculaires et prolifératives. Une étude récente a permis d'identifier dans deux gliomes humains plus ou moins fréquents (médulloblastome et glioblastome), un sous-type de cellules exprimant l'antigène CD133 et présentant les propriétés de cellules souches : prolifération, renouvellement illimité et différenciation (Singh, Hawkins et al. 2004). Transplantées intracérébralement chez une souris immunodéprimée, ces cellules se sont comportées comme des cellules initiatrices de tumeurs. Cette xéno greffe présente une « phénocopie » de la tumeur primaire opérée chez le patient. Cette étude laisse entrevoir la possibilité de modéliser individuellement la tumeur d'un patient donné et de tester *in vivo* la réponse des cellules prélevées avant une chimio-radiothérapie.

I.1.5.2 Les animaux génétiquement modifiés

A cause des limitations des modèles implantés, la transgénèse a été développée pour l'étude des gliomes. Cette technique est utilisée surtout chez la souris à cause de sa durée de vie courte et de sa reproduction rapide et abondante. Elle consiste à manipuler les gènes (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur) prédisposant au développement des tumeurs gliales et ainsi de valider leur rôle dans la pathogenèse des tumeurs. Les deux approches de transgénèse peuvent être utilisées pour modifier l'expression des gènes:

- le gain de fonction (la surexpression des oncogènes)
- la perte de fonction (*knock out*)

Un des exemples représentatifs est la surexpression ciblée du proto-oncogène *Ras* dans les astrocytomes. Les animaux développent spontanément les astrocytomes de grade I à III. (Ding, Roncari et al. 2001; Bajenaru, Hernandez et al. 2003). D'autres lignées surexprimant l'oncogène *Src* ont été établies (Weissenberger, Steinbach et al. 1997). Le croisement de cette lignée avec des souris *IL6-/-* a pu démontrer le rôle important dans la progression tumorale de l'interleukine 6 (Weissenberger, Loeffler et al. 2004). Plusieurs gènes peuvent être manipulés chez le même animal pour étudier les effets de leur mutation. Un modèle présentant l'hétérozygotie des deux gènes suppresseurs de tumeurs *NF1* et *TP53* a permis de modéliser la progression des glioblastomes secondaires dérivés d'un astrocytome de grade II. La majorité des souris a présenté des tumeurs gliales à 6 mois (Reilly, Loisel et al. 2000).

I.1.5.3 Conclusions sur les modèles de gliomes

La prudence reste évidemment de mise pour l'extrapolation des données précliniques à l'homme. Cependant, les voies de réparation et de signalisation du stress ont beaucoup de points communs entre les genres de mammifères, il sera donc utile d'analyser les réponses aux traitements à la fois pour les modèles animaux et des lignées humaines en gardant à l'esprit les effets sélectifs de l'établissement des lignées *in vitro*.

I.1.6 Conclusion-bilan sur les rappels bibliographiques concernant les gliomes

A travers cette revue évidemment incomplète de la littérature scientifique, il apparaît qu'à la fois les traitements contre les tumeurs cérébrales et la connaissance des mécanismes biologiques de formation et de réponse thérapeutique sont insuffisants. Il reste beaucoup à faire pour comprendre les mécanismes sous-jacents et pour prédire la spécificité, l'efficacité et la tolérance à court et à long terme des traitements sur une base individuelle. Une grande part des stratégies et des recherches moléculaires concerne les acteurs de la prolifération, ou de l'angiogénèse, souvent à partir de concepts empiriques. Dans certains cas, les analyses histologiques ou génétiques effectuées à but diagnostique peuvent déjà être exploitées dans un but prédictif. Finalement, une analyse moléculaire systématique des événements initiaux produits par les traitements est rarement menée. Cette approche d'exploration des mécanismes de réparation pourrait compléter nos connaissances sur les voies de signalisation en réponse à l'irradiation. Ceci pourrait permettre d'accroître l'efficacité de la radiothérapie ou d'en réduire les complications.

Table 8: *Caractéristiques principales des 3 modèles de gliomes de rongeurs les plus utilisés.*

Lignée	Type tumoral	Origine	Mutagène	Statut		Dépositaire
				p53	p16/CDKn2a/lnk4	
C6	Gliosarcome	Wistar	MNU, dose répétitive	Sauvage (Asai, Miyagi et al. 1994; Schlegel, Piontek et al. 1999)	Muté (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Benda and Schmitek (Benda, Lightbody et al. 1968)
9L	Gliosarcome	CD Fisher	MNU, dose répétitive	Muté (Asai, Miyagi et al. 1994; Schlegel, Piontek et al. 1999)	Sauvage (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Benda and Schmitek (Benda, Lightbody et al. 1968)
F98	Gliome anaplastique	CD Fisher	ENU, dose unique	Sauvage (Schlegel, Piontek et al. 1999) or Muté (Senatus, Li et al. 2006)	Muté (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Wechsler (Ko, Koestner et al. 1980)

Table 9: *Caractéristiques principales des lignées gliomales humaines étudiées dans cette thèse.*

<i>Lignée</i>	<i>Type tumoral</i>	<i>Grade</i>	<i>L'âge du donneur</i>	<i>Implantation dans la souris nude</i>	<i>Dépositaire</i>
U87MG (HTB 14)	Gliome anaplastique	III	44	Oui	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U118MG (HTB 15)	Gliome anaplastique	III	50	Oui	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U138MG (HTB 16)	Gliome anaplastique	III	47	Non	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U373MG (HTB17)	Gliome anaplastique	III	?	Oui	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
LN229	Gliome anaplastique	III	60	Oui	N de Tribolet (Diserens, de Tribolet et al. 1981)
CCF-STTG1	Glioblastome	IV	68	Non	ATCC depository
MO59J	Gliome anaplastique	III	33	Non	J Allalunis-Turner (Allalunis-Turner, Barron et al. 1993)

I.2 Rappels de radiobiologie

I.2.1 La radiobiologie, une science pluridisciplinaire en plein essor

Après une phase *descriptive* où la connaissance des effets des radiations se limitait à la description des événements tissulaires, la radiobiologie est rentrée dans une phase *quantitative* depuis le milieu du XX^{ème} siècle et actuellement les moindres effets moléculaires et cellulaires peuvent être mesurés et comparés. La *radiobiologie* et plus généralement la *génotoxicologie*, ont considérablement évolué ces dernières années, au milieu en termes conceptuels techniques.

I.2.1.1 La spécificité des réponses moléculaires et cellulaires

La molécule de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est un des constituants essentiels des organismes vivants. L'ADN est très sensible aux attaques génotoxiques (UV, rayons X, produits chimiques). Alors que les radiations ionisantes génèrent un large spectre de dommages de l'ADN biochimiquement différents (ex : les dommages de bases (DBs), les cassures simple-brin (CSBs), les cassures double-brin (CDBs)), la cellule répond spécifiquement à chaque type de dommage radioinduit par l'activation de modes de réparation *spécifiques* afin de maintenir l'intégrité et la stabilité génomique (Lindahl 1993). Une mutation, un dysfonctionnement dans l'un de ces modes peut donc entraîner un défaut de réparation pour certains dommages et une réponse normale pour d'autres, *d'où l'intérêt de connaître précisément le spectre des différents dommages engendrés par les rayonnements considérés*. Un défaut de réparation peut générer un blocage de la transcription et de la réplication et/ou la mort cellulaire. Plusieurs maladies héréditaires liées aux mutations des gènes responsables de la stabilité génomique sont impliqués dans des défauts de la réparation des dommages de l'ADN induites, ainsi que dans le vieillissement (Finkel and Holbrook 2000) ou dans la cancérogenèse (Hoeijmakers 2001; Peltomaki 2001).

I.2.1.2 La dualité des réponses cliniques

Parmi les dommages radioinduits de l'ADN, les CDBs sont les lésions-clés de la létalité. Une seule CDB non réparée entraîne *la mort* de la cellule. Bien que la réparation des CDBs soit majoritairement fautive, les conséquences péjoratives pour la cellule sont plutôt bonnes pour le résultat du traitement anticancéreux. Cependant, ces CDBs mal réparées peuvent générer une instabilité génomique, à l'origine d'une avalanche d'erreurs qui peut donc conduire à une *cancérisation*. Cette dualité entre *radiosensibilité* (effet létal) et *cancer* se retrouve dans la façon de réparer les CDBs : soit par *suture* (c'est-à-dire par simple ligature des brins coupés), soit par *recombinaison* (c'est-à-dire en allant chercher une séquence, en la coupant puis en l'insérant dans le trou causé par la cassure). Un défaut de réparation par suture entraîne une augmentation des fragments d'ADN non réparés et donc une mort cellulaire plus importante. On retrouve ces événements en cytogénétique sous la forme de cassures chromosomiques. Aucun défaut de la recombinaison n'existe, car il est non viable à cause de son rôle prépondérant dans la mitose et la méiose. Par contre, on peut rencontrer un manque de contrôle de la recombinaison, sous la forme d'une *hyperrecombinaison* où la cellule casse elle-même son ADN et le recombine avec un grand risque d'erreurs aboutissant à la *cancérisation*. On retrouve ces événements en cytogénétique sous la forme des aberrations chromosomiques. Cependant, une fois encore, la nature des aberrations est multiple et seules des études en amont, sur l'ADN, permettent, avec moins de biais, d'obtenir des informations plus précises sur la cause du phénomène observé.

I.2.1.3 La redondance et/ou la complémentarité des voies de réparation

Un DB est généralement réparé par *excision-resynthèse* c'est-à-dire qu'il est transformé en CSB. Face à de nombreux DBs, la cellule produit donc, lors de sa réparation, de nombreuses CSBs qui peuvent, à leur tour, pendant leur réparation, devenir des CDBs tardives. Ainsi, la cellule peut activer successivement, à des temps post-stress plus ou moins longs (de la minute à quelques heures) tous les modes de réparation de l'ADN. Une mutation, peut donc intervenir à la fin ou au milieu d'un processus de réparation plus ou moins long. De plus, les réparations par suture ou par recombinaison peuvent intervenir en secours d'un dysfonctionnement des deux modes, augmentant donc le risque, sinon d'une réponse suraiguë (radiosensibilité), probablement d'un événement cancérogène. A noter que cette chaîne

d'événements se déroule indépendamment de la dose, ce qui place donc l'estimation du nombre de dommages voire *leur simulation théorique bien loin des effets biologiques effectivement enregistrés.*

I.2.1.4 L'importance de la condensation de l'ADN

La cellule au cours de son cycle naturel condense/décondense son ADN. La forme de l'ADN la plus décondensée est quand la double hélice de l'ADN est dénudée des histones pendant la phase du cycle cellulaire S. Les chromosomes en métaphase représentent la forme la plus compacte (Figure 11). Une décondensation ou une surcondensation anormale peuvent avoir le même effet qu'un défaut de réparation. Des particules à haut transfert d'énergie linéique (TEL, keV/ μm) peuvent, en percutant l'ADN, provoquer une décondensation violente et entraîner une génération de « trous » difficilement réparables dans la chromatine. La situation où la personne exposée aurait déjà une chromatine décondensée ou surcondensée la rendrait plus sensible à ce type de rayonnement. Dans ce cas, en plus de la condensation ou des effets du cycle, un nombre de cassures identiques peut aboutir à des effets biologiques et donc une réponse tissulaire différents.

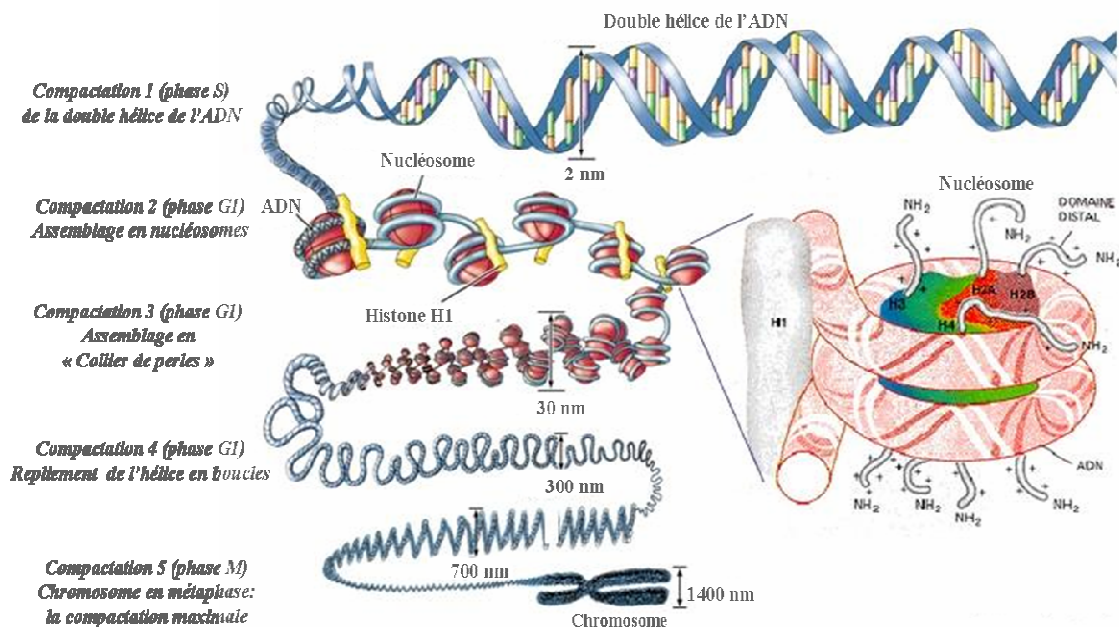


Figure 11 : Les différents degrés de l'assemblage de l'ADN et de la compaction de la chromatine en fonction des phases du cycle cellulaire (Grunstein 1992).

I.2.1.5 Le problème posé par les effets de voisinage (ou effets *bystander*)

L'effet *bystander* décrit des phénomènes biologiques spécifiques au voisinage de cellules directement touchées par un stress, notamment de type radiatif. Il s'agit en particulier d'un stress oxydant supplémentaire, des arrêts du cycle, d'une perte de la clonogénicité voire des effets membranaires. Une fois encore, cet effet pourrait être préférentiellement observé sur des cellules exposées aux particules lourdes qui dissémineraient leur action à distance, touchant ainsi d'autres tissus (sains par exemple).

I.2.1.6 L'hypersensibilité aux faibles doses et à de faibles débits

Depuis une dizaine d'années, les radiobiologistes et les radiothérapeutes ont observé des effets surprenants provenant de très faibles doses de radiations ionisantes. Suivant les cellules, les tissus et les individus on peut en particulier observer une hypersensibilité aux faibles doses de rayons X (typiquement 1 - 500 mGy), comparable à l'effet des doses 2 à 3 fois plus élevées. Le même phénomène a été observé pour les faibles débits. Bien que certaines observations puissent s'expliquer aujourd'hui par des biais techniques, il n'en reste pas moins important de répondre aux 2 questions suivantes : 1) Comment expliquer ce phénomène? 2) Est-il défavorable ? 3) Si oui, peut-il être prévu et existe-t-il des statuts à risque ?

I.2.1.7 Des marqueurs spécifiques des différentes voies de réparation

Aujourd'hui, il est possible de visualiser et de quantifier dans le noyau des cellules irradiées, presque immédiatement après l'irradiation (à partir de quelques minutes post-stress), la formation des dommages de l'ADN (DBs, CSB, et CDBs) et le déroulement étape par étape de leur réparation. De plus la signalisation post-stress peut être investiguée également par immunofluorescence avec des marqueurs de dommages, de réparation, d'effet du cycle et/ou de mort cellulaire. C'est notamment le cas des techniques de détection des dommages de l'ADN, qu'ils soient induits par des agents physiques (radiations, hyperthermie) ou chimiques (drogues chimiothérapeutiques). Nous verrons d'ailleurs plus loin quelle opportunité a représenté cette technique pour les travaux de cette thèse.

I.2.1.8 La découverte de nouveaux syndromes génétiques

Certaines maladies génétiques souvent rares (appelées orphelines) sont associées à une certaine radiosensibilité et/ou déficience dans la réponse moléculaire et cellulaire aux radiations. Dès le début de la radiobiologie, la collection de biopsies issues de patients ayant montré des réactions suraiguës à leur traitement de radio- et /ou chimiothérapie a fortement contribué à une meilleure connaissance des bases moléculaires de la réparation de l'ADN et de la radiosensibilité. Cependant, cet effort doit se poursuivre afin de dresser une carte complète de la radiosensibilité et de la chimiosensibilité chez l'homme. Cette thèse s'inscrit dans cette approche.

Ainsi, vu la complexité croissante des événements induits par un stress génotoxique, il paraissait plus raisonnable de ne détailler ici que les différents aspects concernant spécifiquement les travaux de thèse. En particulier, nous insisterons ici sur les différents voies de réparation des cassures double-brin (CDBs), leur évaluation et les conséquences de leur dysfonctionnement dans un contexte de traitement radio-chimiothérapique. Une place particulière sera notamment réservée à la modulation de la réparation et des voies de signalisation par des drogues telles que des inhibiteurs de tyrosines kinases dont certaines, comme on l'a dit précédemment, sont déjà utilisées en clinique.

I.2.2 Les événements radioinduits initiaux

I.2.2.1 La phase physique et l'importance des microdépôts d'énergie

On entend par rayonnement ionisant tout rayonnement susceptible d'ioniser une molécule d'air ou d'eau (à partir de 14 eV) (Tubiana, Dutreix et al. 1986). Lorsqu'un rayonnement pénètre dans la matière, il peut interagir avec les atomes rencontrés et perdre, à chacune de ses interactions, une partie de son énergie. Cette énergie cédée est transférée au milieu sous forme d'ionisations et/ou d'excitations constituant autant de microdépôts d'énergie dont la densité d'énergie conditionnera la nature biochimique des dommages induits dans l'ADN (Goodhead 1989).

L'interaction des rayons X avec la matière peut notamment s'effectuer selon trois processus aujourd'hui bien connus des physiciens : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la création de paires :

- Si un photon interagit avec la matière, il peut être *totalemment* absorbé par l'atome cible et désorganiser son nuage électronique : un ou plusieurs électrons des couches K, L, M,... sont alors expulsés (photoélectrons) de leur orbitale. *C'est l'effet photoélectrique*. L'atome retourne alors dans son état initial par des processus qui correspondent à l'émission de rayonnement dit de *fluorescence*. Le mode de désexcitation non radiatif ou électronique est également connu sous le nom de *cascade Auger*.

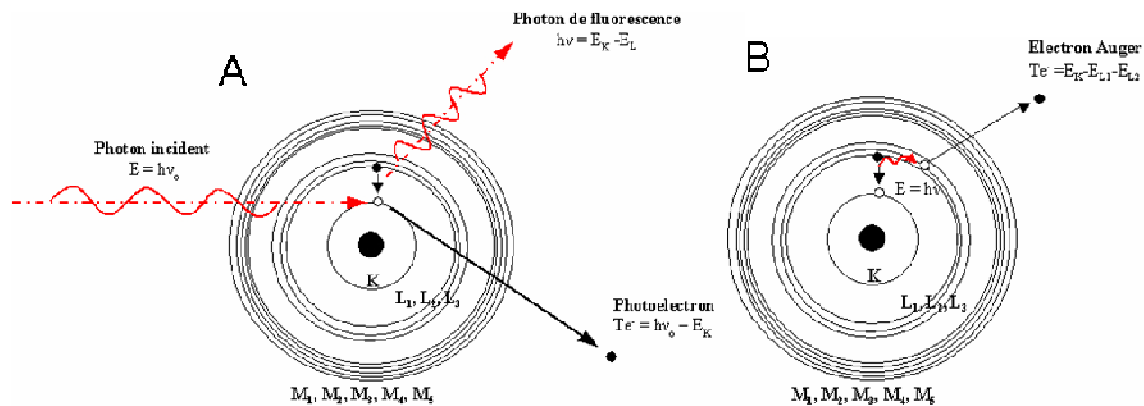


Figure 12 : (A) *L'effet photoélectrique* : Interaction d'un photon avec un atome, réarrangement du cortège électronique par fluorescence. (B) *L'effet Auger* : Réarrangement du cortège électronique par cascade Auger.

1.2.2.1.1 Les 3 effets majeurs de l'interaction rayonnement-matière

- Si le photon incident perd *une partie* de son énergie seulement, il peut mettre en mouvement un électron peu lié et sera finalement dévié de sa trajectoire initiale, dans une direction de l'espace dépendant de son énergie incidente : *C'est l'effet Compton* (Figure 13A).

- Si le photon incident possède une énergie supérieure à 1.022 MeV, il peut s'annihiler en émettant un électron et un

de trajectoires divergentes à 180°. *C'est l'effet de création de paire* (Figure 13B).

L'importance relative de ces principaux effets dépend directement de la gamme d'énergie utilisée et du milieu traversé. Notamment, l'effet Compton est le mode principal d'interaction pour des photons d'énergies comprises entre 1 et 5 MeV. Pour des énergies plus basses, l'effet

Compton prédomine seulement pour les matériaux légers (eau, tissus biologiques), laissant la place à l'effet photoélectrique pour les matériaux plus lourds.

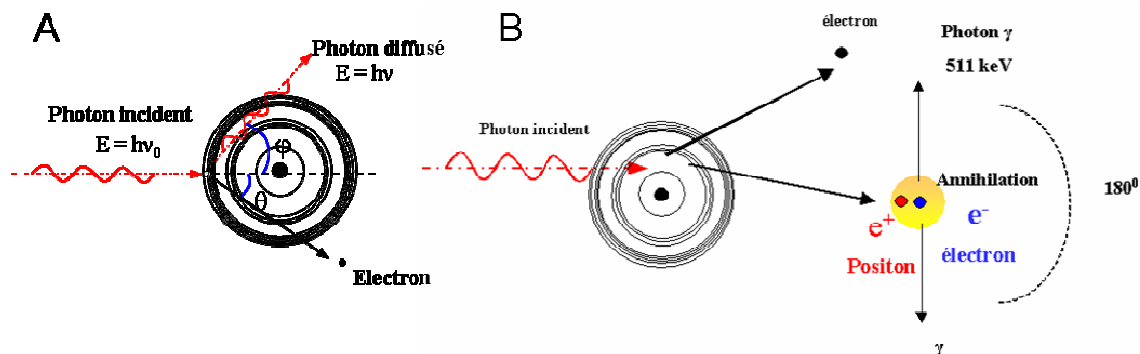


Figure 13 : (A) L'effet Compton. (B) L'effet de création paire.

1.2.2.1.2 Les microdépôts d'énergie

Couramment utilisée en radiobiologie, la notion de dose absorbée, exprimée en gray (Gy) a toutefois ses limites pour apprécier un effet biologique. En effet, à l'échelle *microscopique* l'énergie n'est pas délivrée de façon homogène mais *stochastique*, par paquets variables en nombre et en densité d'énergie : les microdépôts d'énergie. Dans les années 80, Dudley T. Goodhead a été l'un des premiers à s'y être intéressé et ses travaux ont conduit à plusieurs principes directement applicables aux radiations : le passage d'un photon dans le milieu biologique produit une arborescence de microdépôts d'énergie aléatoirement espacés et de densité d'énergie différente qui dépendent de la nature des radiations (Figure 14). Pour les rayons X, les microdépôts les moins denses en énergie (quelques $eV \cdot nm^{-3}$) sont les plus nombreux et les microdépôts de quelques centaines d'électronvolts par nm^3 sont les plus rares (Goodhead 1989). La variété de ces microdépôts est probablement la cause de la grande hétérogénéité biochimique des dégâts créés dans l'ADN. En effet, un parallèle existe entre la nature biochimique des lésions radioinduites de l'ADN et le quantum des microdépôts d'énergie. Les modifications de bases (1000 à 10000 par Gy) sont avec les CSBs (1000 par Gy), les évènements les plus fréquents : on chiffre à $1-10 eV \cdot nm^{-3}$ l'énergie nécessaire pour créer une modification de base et $10-100 eV \cdot nm^{-3}$ pour une CSB. Les CDBs (40 par Gy) sont des évènements beaucoup plus rares (Frankenberg-Schwager 1989). Il faut en effet plus de $100 eV \cdot nm^{-3}$ pour créer une seule CDB. De tels écarts dans la densité d'énergie conditionneront la « réparabilité » des lésions considérées (Foray, Monroco et al. 1998).

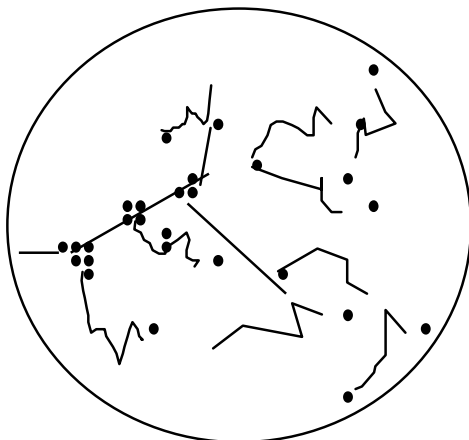


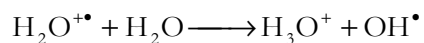
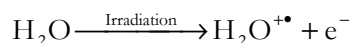
Figure 14 : Représentation schématique de la d'une arborescence de microdépôts aléatoirement espacés et de densité d'énergie différente .traversant le noyau d'une cellule, d'après Goodhead (Goodhead 1989).

I.2.2.2 La phase chimique et l'importance des produits radicalaires radioinduits

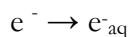
I.2.2.2.1 Les principaux produits de la radiolyse de l'eau

Constituants majeurs de la matière vivante, les molécules d'eau se dégradent sous l'effet des radiations ionisantes en des produits radicalaires et à des rendements bien connus des chimistes. L'ionisation d'une molécule d'eau nécessite environ 13 eV. La radiolyse de l'eau aboutit rapidement à la formation de deux ions radicalaires instables :

- l'ion $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ (qui donnera en 10^{-10} s l'ion hydronium (H_3O^+) et le radical hydroxyl OH^\bullet au contact d'une autre molécule d'eau)



- un électron (qui se liera à l'eau pour donner un électron aqueux (e^-_{aq})).



Les concentrations locales de ces deux produits primaires seront responsables respectivement d'une forte acidification du milieu et de réactions d'oxydations violentes. Par recombinaison chimique, ils se transformeront en e^-_{aq} , OH^\bullet , H^\bullet , H_3O^+ , O^{2-} , H_2O_2 (Figure 15).

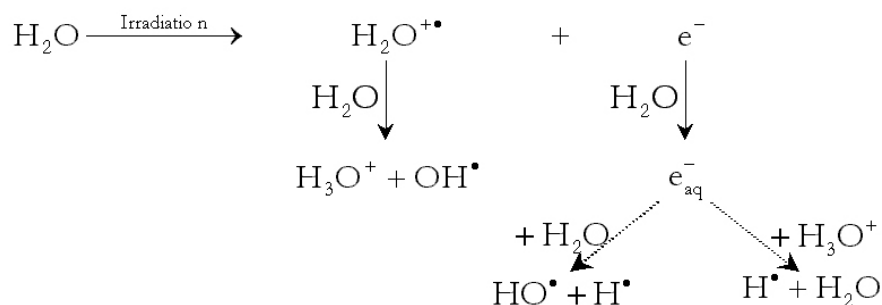


Figure 15 : Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.

1.2.2.2 Les conséquences de la radiolyse d'une solution aqueuse

Evidemment la présence de solutés peut favoriser l'une ou l'autre des nombreuses réactions radicalaires possibles entre les espèces citées dans le paragraphe précédent. Les radiations ionisantes décomposent également toute molécule en solution aqueuse en entités chimiques secondaires qui peuvent être elles-mêmes très réactives. Il faudra donc être vigilant en ce qui concerne une photo-décomposition possible de drogues chimiothérapeutiques dans le cas d'une radio-chimiothérapie ou d'une photo-décomposition d'agents de contraste dans le cas du radiodiagnostic (scanner). Deux exemples significatifs ont été récemment mis en évidence : d'une part, la décomposition des produits de contraste iodés sous irradiation, d'autre part, les conséquences des flux extranucléaires d'ions calcium qui sont libérés par la cellule irradiée.

Dans le premier cas, il a été montré que les rayons X produisent une dégradation des produits de contraste iodés en libérant notamment des ions iodures (I⁻). Rapidement combinés au potassium et au sodium du milieu biologique sous forme de NaI ou de KI, les iodures se fixent sur l'ADN (alors que les produits de contraste ne pénètrent pas les cellules), inhibent la réparation des cassures radioinduites et entraînent une forte toxicité pour les cellules qui ont capté des iodures. La photodégradation des produits de contraste constitue l'un des exemples les plus représentatifs de l'impact biologique de la radiolyse des molécules utilisées en clinique.

De nombreux échanges ioniques (pompes à protons, à sodium, ...) assurent l'intégrité de la membrane cellulaire. Après irradiation, la cellule subit une perturbation transitoire de ses équilibres ioniques. En particulier, dans la première heure post-irradiation se crée un flux massif d'ions calcium (Ca²⁺) hors de la cellule. Bien que cette observation soit ancienne, elle

a récemment retrouvé un intérêt à travers les recherches sur les effets de voisinage. Nous y reviendrons dans les chapitres suivants.

I.2.3 La phase biologique et l'importance de la qualité de la réparation de l'ADN

I.2.3.1 L'importance de l'ADN dans la réponse aux radiations

Une cellule doit lutter pour protéger l'intégrité de son matériel génétique. Toutes les altérations du génome constituent un dommage à l'ADN. Les déficiences dans la réparation ou de la signalisation de ces dommages de l'ADN sont à l'origine de la majorité des cancers. Parmi les sources extérieures, les radiations ionisantes produisent les lésions de l'ADN multiples.

Des expériences de micro-irradiation utilisant des émetteurs β ont montré que pour induire 50% de létalité chez un fibroblaste humain, il faut délivrer 200 à 500 Gy au cytoplasme alors que 1 à 3 Gy suffisent quand on irradie seulement le noyau. Le noyau est donc une cible privilégiée de l'effet létal des radiations ionisantes et nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les effets radioinduits sur l'ADN. Comme on l'a vu plus haut, l'action des radiations ionisantes sur l'ADN se distingue de celle des autres agents génotoxiques par la diversité des types biochimiques des lésions induites : les DBs, les CSBs et les CDBs. Chaque type de lésions se caractérise par sa fréquence de formation et les voies de réparation qu'il déclenche (Tableau 10, Figure 16).

Les DBs regroupent toutes les formes d'altérations telles que l'oxydation, le pontage entre les bases voisines ou la perte d'une base de l'ADN (Moustacchi 2000). Ces dégâts sont les plus fréquents et prépondérants (environ 1000 à 10000 par Gy et par cellule humaine pour une irradiation X) ; leur réparation est rapide (généralement exécutée en quelques minutes). Elle s'effectue par le processus d'*excision-resynthèse* assuré par les protéines du *BER* (*base excision-resynthesis*) ou du *NER* (*nucleotide excision-resynthesis*) (Lindahl and Wood 1999). Les CSBs sont formés par la rupture de la colonne sucre-phosphate de l'ADN, les liaisons covalentes sont rompues. On compte environ 1000 dommages par Gy par cellule humaine pour une irradiation X (Ward 1988). Leur réparation est généralement exécutée en quelques

dizaines de minutes par des processus d'*excision-resynthèse* mais aussi de *recombinaison* (Lindahl and Wood 1999).

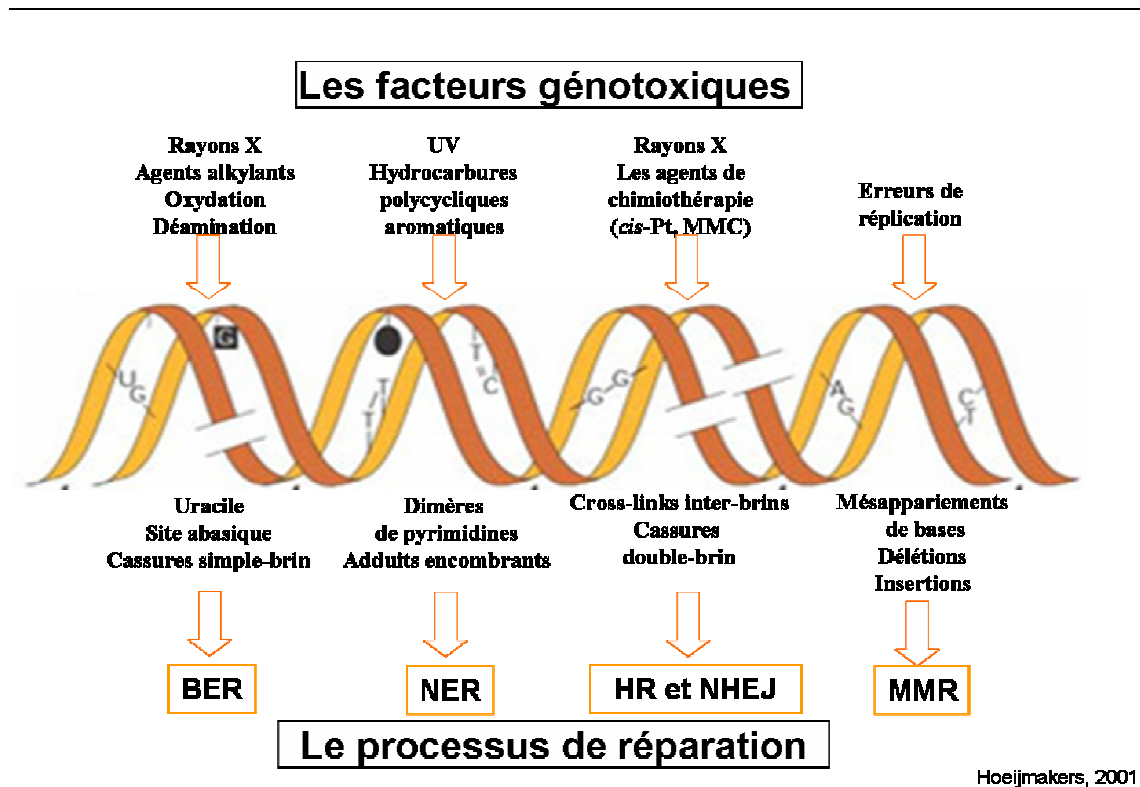
Tableau 10 : Les dommages de l'ADN radioinduits et leur spécifications physiques et biologiques: le dépôt d' énergie minimal nécessaire pour la formation de DB, CSB ou CDB, leur incidence par Gray de rayons X, leur demi-vie de réparation et la voie de réparation activée par ce type de dommage (Joubert and Foray 2006).

	Domage de base (DB)	Cassure simple-brin (CSB)	Cassure double -brin (CDB)
Energie nécessaire	>1 eV/nm ³	>10 eV/nm ³	>100 eV/nm ³
Incidence	~ 10 000 / Gy	~ 1000 / Gy	~ 40 / Gy
50 % de dommages réparés	5-10 min	10-20 min	>50 min
Mode de réparation		Recombinaison homologue	Suture
	Excision-Resynthèse		

La réparation par excision de nucléotides (NER) est principalement utilisé pour réparer les lésions encombrantes et gênantes la structure de l'ADN comme par exemple les dimères de pyrimidines causées par les UV. La lésion est détectée, l'ADN entourant la région affectée est déroulé par le complexe TFIIH, des endonucléases (ERCC-XPF et XPG) génèrent les coupures simple-brin du site de dommage et finalement l'ADN polymérase comble le site vacant en ajoutant les nucléotides adéquats

La réparation par excision de base (BER) sert principalement à replacer les bases modifiées ou combler les sites vacants laissés par une perte de base. Les glycosylases créent un site abasique et un ou plusieurs les nucléotides viennent remplacer les anciens.

Nos travaux se concentrent principalement sur les CDBs, nous ne détaillerons pas plus les voies de réparation des dommages de base et des CSBs. Contrairement aux idées reçues, une CDB radioinduite ne peut-être le résultat de deux CSBs radioinduites suffisamment proches et créées par deux traces de particules différentes. Une dose de 1 Gy de rayons X ne produit qu'environ 40 CDBs par cellule (Frankenberg-Schwager 1989; Goodhead 1989). En revanche, ces lésions sont plus lentement réparables que les CSBs ou les DBs (environ quelques heures). Plus que les autres lésions radioinduites de l'ADN, les CDBs ont focalisé l'attention des radiobiologistes car, non réparées, elles peuvent conduire à la perte définitive de l'information génétique et à la mort de la cellule.



Hoeijmakers, 2001

Figure 16 : Les différentes voies de réparation de l'ADN selon Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).

I.2.3.2 Les différentes voies de réparation des CDBs: suture, recombinaison

Dans les cellules eucaryotes, il existe deux systèmes de réparation des CDBs : la *recombinaison*, qui est une voie majoritaire au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire et la *suture* ou (*NHEJ : non-homologous end joining*), qui est prédominante pendant la phase G1. Ces deux mécanismes de réparation sont distincts et complémentaires.

La NHEJ consiste en une suture des deux extrémités de l'ADN (Figure 17, 18 et 19). La réparation par recombinaison consiste à remplacer la séquence endommagée par une séquence identique susceptible de s'apparier, prise en amont ou en aval de la région lésée, du chromosome homologue (*recombinaison homologue*). Tandis que la recombinaison homologue est le mode de réparation majoritaire chez la levure, c'est le NHEJ qui prédomine chez les cellules humaines. Chez les mammifères, l'augmentation de la fréquence de recombinaison (homologue ou non) c'est-à-dire l'*hyper-recombinaison*, joue un rôle essentiel dans la cancérogenèse (Thyagarajan, McCormick-Graham et al. 1996). Comme on l'a dit plus

haut, un défaut de NHEJ est toujours associé à une radiosensibilité alors qu'une hyper-recombinaison semble être à l'origine de mutations entraînant une forte instabilité génomique et une susceptibilité aux cancers.

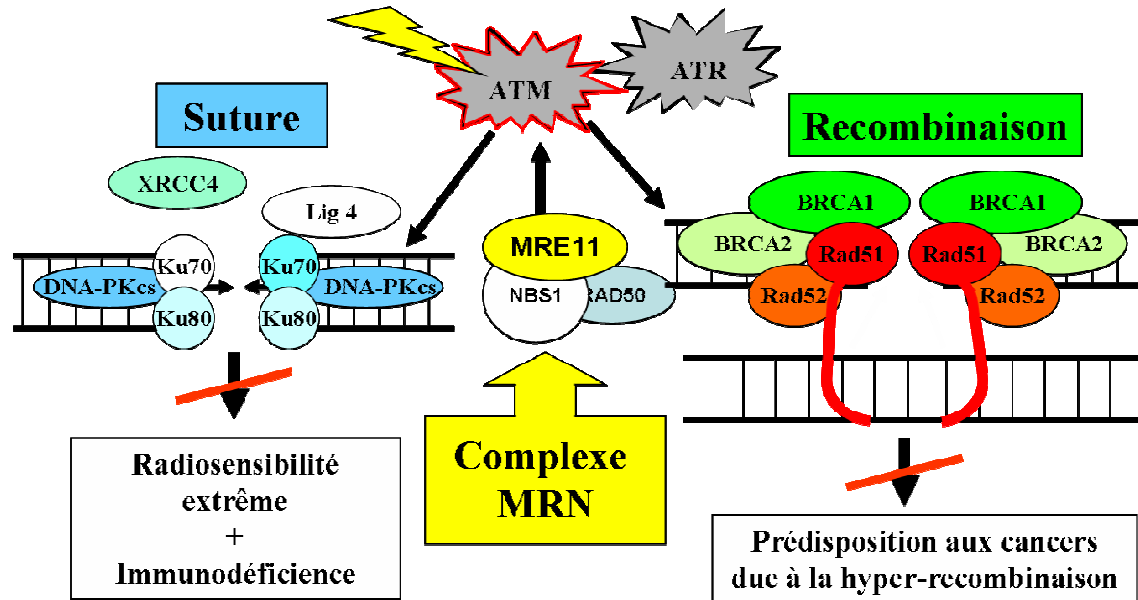


Figure 17 : Réparation des CDB par suture ou par recombinaison. La réparation par suture fait intervenir les protéines de réparation Ku et DNA-PKs. La réparation par recombinaison homologue fait intervenir le complexe RAD51/RAD52, couplé à BRCA1 et BRCA2 (Foray, Marot et al. 2002).

1.2.3.2.1 Réparation par suture

La protéine Ku80 s'associe à la protéine Ku70 (Walker, Corpina et al. 2001), et cet hétérodimère coulisse le long de l'ADN. Au niveau de la cassure, il recrute la protéine DNA-PKcs. Ces trois protéines forment le complexe DNA-PK, qui a une fonction essentielle de serine-thréonine kinase dans le processus de réparation NHEJ : cette kinase phosphoryle en effet certaines protéines comme le variant X de l'histone H2A. La phosphorylation de l'histone H2AX par DNA-PK produit une distorsion de l'ADN qui pousse le complexe DNA-PK à s'éloigner du site de la cassure. Les protéines de réparation par suture (Ligase 4 et XRCC4) sont ensuite recrutées pour réunir les deux extrémités de l'ADN. L'autophosphorylation du complexe DNA-PK provoque son détachement de l'ADN (Figure 17, 18 et 19). Les dommages chromosomiques typiques d'un défaut de suture NHEJ

sont généralement des délétions qui peuvent être associées à une forte radiosensibilité et une immunodéficience sévère (Dai, Kysela et al. 2003).

Certaines molécules de chimiothérapie peuvent produire un autre type de lésions de l'ADN: les pontages ADN-protéines ou les pontages ADN-ADN, dont l'exemple le plus représentatif est constitué par les adduits de l'ADN. L'adduit covalent peut gêner la réparation de la cellule. Les adduits intra- ou inter-brin bloquent stériquement l'accessibilité aux extrémités coupées de l'ADN des protéines de suture Ku80 et Ku70 (Turchi and Henkels 1996).

1.2.3.2 Réparation par recombinaison

La reconnaissance des CDBs réparées par recombinaison est assurée par l'anneau heptamérique Rad52 qui coulisse le long de l'ADN. Une fois l'anneau proche de la cassure, la protéine Rad51 est recrutée et forme un nucléofilament qui va rapprocher les brins homologues (ou non-homologues) près du site de réparation. La formation de ce nucléofilament met en jeu une multitude de protéines comme les protéines RPA (*Replication Protein A*), XRCC2 et XRCC3 ainsi que les protéines BRCA1 et BRCA2. Cependant, les étapes suivant la reconnaissance par Rad52-Rad51 sont encore méconnues (Wu, Davies et al. 2001). Singulièrement, alors que l'absence de toute recombinaison homologue est létale chez les mammifères, il a été montré au contraire qu'un manque de contrôle de la recombinaison pouvait contribuer à une forte instabilité génétique : c'est l'hyper-recombinaison (Lengauer, Kinzler et al. 1998; Zhou, Akgun et al. 2001). Par ailleurs, la surexpression de Rad51 a été observée dans de nombreuses cellules tumorales induisant un fort taux de recombinaison. Les aberrations chromosomiques typiques d'un manque de contrôle de la recombinaison sont les translocations, souvent associées à différents types de cancer (Khanna and Jackson 2001).

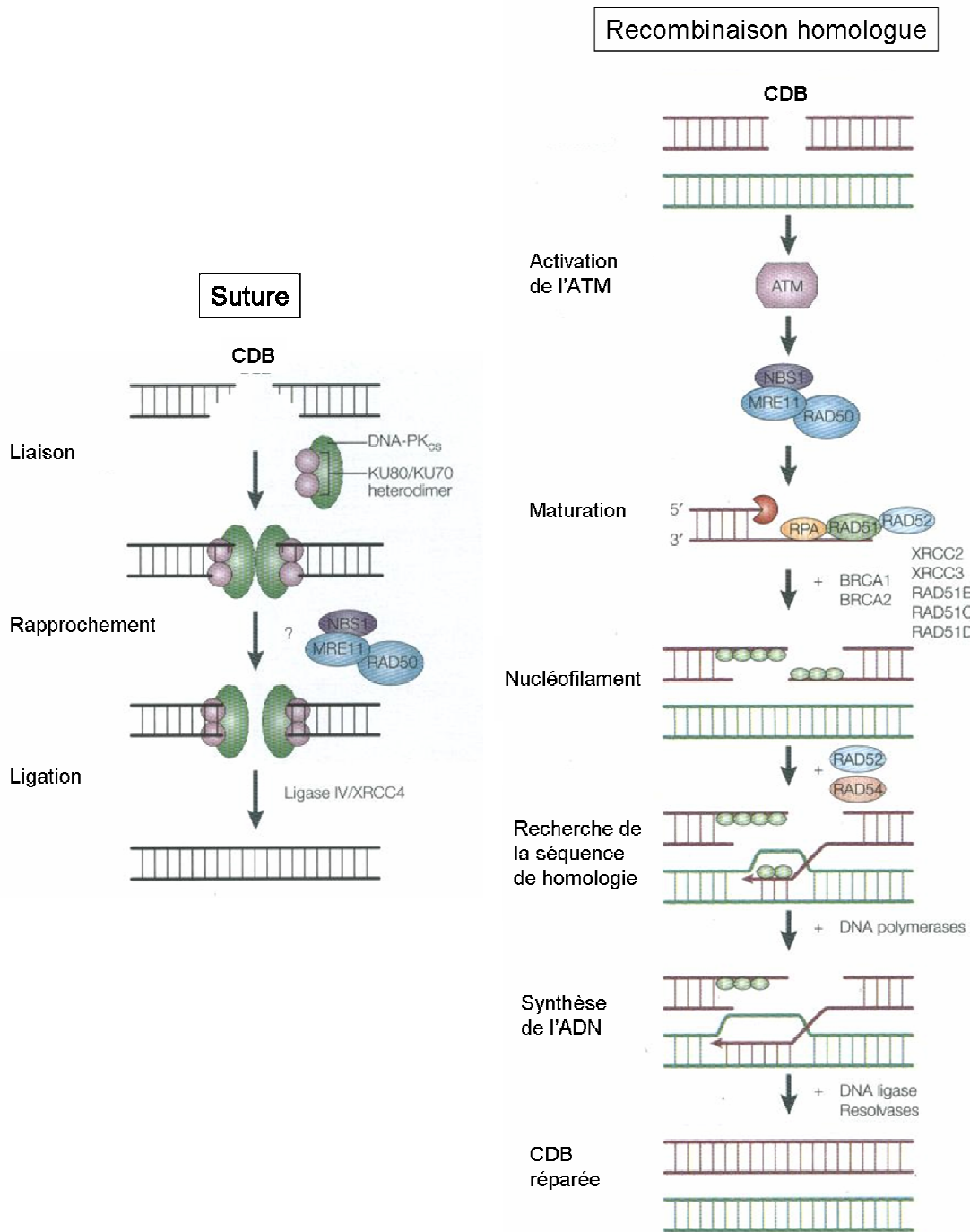


Figure 18: Les différentes étapes de la suture et de la recombinaison homologue selon www.focosi.immunesig.org/dnaturturnover.html.

I.2.3.2.2.1 Le rôle particulier de BRCA1

La protéine BRCA1 (*Breast cancer susceptibility*) est un suppresseur de tumeurs spécifique de sein et de l'ovaire dont les mutations sont responsables de la majorité des tumeurs héréditaires du sein (Futreal, Liu et al. 1994; Miki, Swensen et al. 1994) et de la majorité des syndromes cancéreux du sein et de l'ovaire (Easton, Ford et al. 1993). BRCA1 est une nucléoprotéine de 220 kDa de taille, situé sur le locus 17q21. Depuis le clonage du gène *BRCA1* et sa caractérisation (Miki, Swensen et al. 1994), de multiples fonctions de cette protéine ont été mises en évidence, telles que le contrôle du cycle cellulaire, l'ubiquitination des protéines et la remodelage de la chromatine.

Sa localisation et le niveau d'expression varient avec le cycle cellulaire dans les cellules proliférantes. La plus grande concentration nucléaire est observée pendant les phases S, G₂ et M (Chen, Farmer et al. 1996), pendant lesquelles des *foci* nucléaires distincts sont formés et visibles par immunofluorescence. Après traitements aux rayons X, UV ou par différentes drogues de chimiothérapie, cette protéine subit une hyper-phosphorylation en formant également des *foci*. Cette forme phosphorylée de BRCA1 est nécessaire pour son import nucléaire et pour son recrutement sur les sites des cassures de l'ADN. Ces sites de BRCA1 recrutent ensuite plusieurs protéines de réparation impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN. Ce mécanisme de phosphorylation de BRCA1 est essentiel pour ses fonctions au cours de la prolifération cellulaire et de la réparation de l'ADN (Scully, Chen et al. 1997).

Différents domaines fonctionnels ont été décrits (Figure 19):

- domaine Zinc ring finger amino-terminal impliqué dans les interactions protéines-protéines
- domaine carboxyterminal acide : domaine d'activation transcriptionnel constitué de 2 carbones terminaux : BRCT pour BRCA C-terminal
- domaine central comportant différentes régions, telles que des séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) et des domaines d'interactions avec d'autres protéines telle que Rad 51.

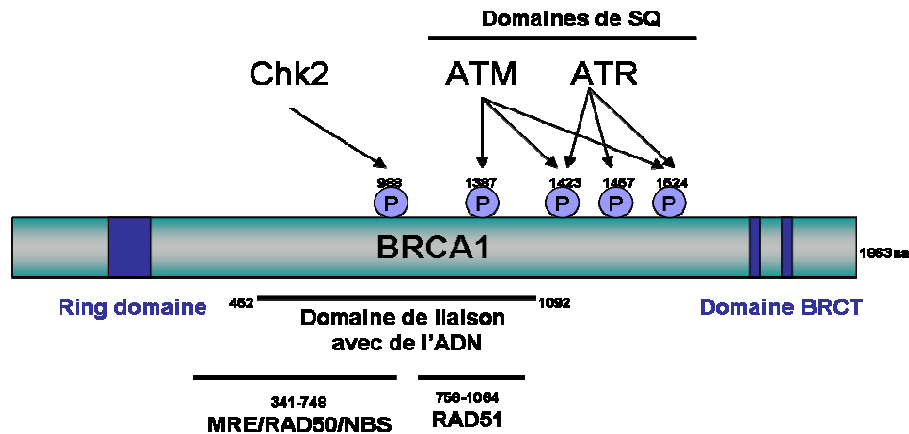


Figure 19 : Le schéma des sites fonctionnellement importants de la protéine BRCA1. La partie BRCT et les sites MRE11/RAD50/NBS1 et RAD51 sont les domaines importants pour les interactions avec les autres protéines de réparation, la partie centrale interagit avec l'ADN. Ring domaine participe à l'ubiquitination. Les sites de phosphorylation sont les cibles des kinases ATM et ATR..

Des progrès majeurs ont été réalisés au cours des dernières années dans la caractérisation de mutations génétiques importantes de BRCA1. Une radiosensibilité a été observée dans les lignées portant le gène *BRCA1* muté. La perte complète de BRCA1 conduit à une radiosensibilité cellulaire liée à une réduction des capacités de réparation des cassures doubles brins. Cette radiosensibilité semble par ailleurs être corrélée avec le statut génétique de BRCA1. En effet, les cellules avec deux copies sauvages de BRCA1 sont plus résistantes que les cellules avec une seule copie fonctionnelle, elles mêmes plus résistantes que les cellules sans BRCA1 (Abbott, Thompson et al. 1999; Foray, Randrianarison et al. 1999; Ruffner, Joazeiro et al. 2001).

Aujourd'hui, les changements d'ordre épigénétique peuvent également être à l'origine de dérégulations de l'expression de *BRCA1* dans des cancers spontanés. Par les altérations épigénétiques, nous entendons la méthylation des cytosines qui altère durablement la transcription du gène. La suppression de l'expression de BRCA1 par la hyperméthylation de son promoteur a été détectée dans certains tumeurs spontanées du sein, de l'ovaire, du pancréas ou du poumon (Scardocci, Guidi et al. 2006; Jacinto and Esteller 2007).

Les conséquences de l'altération de BRCA1 par voie génétique ou épigénétique est l'hypersensibilité aux traitements de chimiothérapie ou de radiothérapie. Parmi les drogues produisant les adduits ou les cassures double-brin sont les drogues platinées, mitomycine C ou

les inhibiteurs de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) (Turner, Tutt et al. 2004; McCabe, Turner et al. 2006).

I.2.3.3 La réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements de bases dans l'ADN joue un rôle important dans la stabilité génomique. Elle intervient au cours de la réplication pour corriger des erreurs d'incorporation se produisant au cours de la synthèse d'ADN. Le mécanisme principal est contrôlé par une famille de gènes conservés chez les eucaryotes ou MSH2 joue un rôle central. La réparation fait alors intervenir une excision sur un des brins de plusieurs centaines de nucléotides.

Il a été mis en évidence l'implication d'une déficience de cette voie de réparation dans l'étiologie de cancers héréditaires (HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) (Jiricny and Nystrom-Lahti 2000), d'où l'intérêt d'une étude approfondie des mécanismes sous-jacents de cette voie de réparation ainsi que la recherche de corrélations possibles entre l'apparition de mutations dans des gènes du MMR et l'induction de cancers (Aaltonen, Peltomaki et al. 1993).

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN est impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine. La déficience de ce système de réparation est reliée à une chimiorésistance des cellules cancéreuses au cisplatine.

I.2.3.4 L'immunofluorescence H2AX : une nouvelle technique de détection des CDBs.

Comme on l'a vu plus haut, lors de l'activation radioinduites des sérine-thréonine kinases de la famille des PI3-K (comme DNA-PKcs, ATM ou ATR (Smith and Jackson 1999; Zhu and Parada 2002)), le résidu sérine 139 (motif SQE) de l'histone H2AX est phosphorylé (Rogakou, Pilch et al. 1998; Burma, Chen et al. 2001; Brown and Baltimore 2003). Cette phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDBs. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (pH2AX), montre la présence de nombreux *foci* dans le noyau des cellules irradiées. Il existe une étroite corrélation entre le nombre de *foci* pH2AX et le nombre de CDBs induites après irradiation (Rogakou, Boon et al. 1999; Rothkamm and Lobrich 2003).

Récemment, une corrélation directe a été observée entre le nombre de *foci* et le nombre de CDBs produites par la désintégration de l'iode 125 incorporé dans l'ADN de cellules, démontrant que chaque *focus* représente une cassure et que chaque CDB forme un *focus* (Sedelnikova, Rogakou et al. 2002). L'immunofluorescence H2AX a révolutionné l'évaluation des CDBs en permettant la mesure de leur nombre *in situ* (dans chaque noyau). Limitée pour la discrimination de foci trop nombreux produits aux doses élevées, cette technique permet au contraire une étude plus fine à des doses faibles de radiation, de l'ordre du 2.5 cGy (soit 1/40^{ème} de Gy) correspondant environ à 1 CDB par cellule. Nous reviendrons dans cette thèse sur l'utilisation de cette technique d'immunofluorescence ainsi que sur ses artéfacts possibles.

I.2.3.5 Les différents types de morts radioinduites

La première réponse cellulaire aux radiations se traduit généralement par un arrêt dans les phases G1 et/ou G2 du cycle cellulaire, facilement détectable par cytométrie de flux sous la forme de pics gaussiens. Selon la dose et le statut génétique de la cellule (notamment p53), les arrêts en G1 et en G2 sont plus ou moins marqués et traduisent souvent la masse de dommages de l'ADN à réparer. Une CDB induite en G1 ou en S qui reste non réparée persiste tout au long du cycle de la cellule et peut devenir une cassure *chromosomique*. Le fragment chromosomique issu de cette cassure est soumis aux mêmes phénomènes d'aspiration que les chromosomes entiers. Cependant, si le fragment ne porte pas de centromère (il est dit *acentrique*), il est expulsé du noyau sous la forme d'un *micronoyau* (c'est l'*exonucléose*). Il peut rester dans le cytoplasme un certain temps, voire pendant un ou deux cycles et subir, comme le noyau principal, les condensations et décondensations de la chromatine suivant les phases du cycle. L'*exocytose* du *micronoyau* est la dernière étape de ce phénomène général appelé *mort mitotique*. Le nombre de micronoyaux augmente linéairement avec la dose et ces événements constituent les premiers événements de cytogénétique corrélés avec la mort radioinduite. En plus de la mort mitotique, deux autres types de morts ont été définis expérimentalement.

L'apoptose est une mort dite « programmée » déclenchée par une CDB non réparée (D'Amico and McKenna 1994). Elle se traduit par une libération d'endonucléases qui digèrent massivement l'ADN (Walker, Kokileva et al. 1993). L'apoptose requiert généralement que la protéine p53 soit fonctionnelle (Lowe, Ruley et al. 1993).

L'arrêt définitif en G1 est également associé à une CDB non réparée et dépend de p53 et de p21. Il peut être comparé à une forme de vieillissement, la sénescence (Di Leonardo, Linke et al. 1994).

En radiobiologie, la mort d'une cellule est définie par la perte irréversible de sa capacité à se diviser. Ainsi, une cellule encore présente au sein d'un tissu, et apparemment intacte, et encore capable de synthétiser des protéines ou de l'ADN, voire d'effectuer un petit nombre de mitoses peut être radiobiologiquement morte. Puck et Marcus ont établi dans les années 50, un seuil arbitraire de viabilité *in vitro* en considérant qu'une cellule irradiée subit rarement plus de 4 ou 5 divisions cellulaires si elle est « stérilisée » donc radiobiologiquement morte. Dans le test de survie *in vitro*, dit test des colonies, la survie d'une cellule se traduit par le développement d'une colonie qui est définie par la présence d'au moins 50 cellules (de 2^5 à 2^6) (Puck and Marcus 1956). L'apoptose, l'arrêt définitif en G1 (ou sénescence) et la mort mitotique sont les trois processus possibles de la mort radiobiologique. Suivant le protocole d'irradiation, le type de tissu irradié et le statut génétique du modèle cellulaire, les trois types de morts décrits précédemment participent de façon inégale à la perte de la capacité de prolifération après irradiation. Enfin, on peut ajouter à cette liste un quatrième type de mort, la mort en *intercinèse*, qui décrit la disparition physique quasi-immédiate de la cellule après des doses de radiations de plusieurs milliers de Gy, doses à partir desquelles les effets biochimiques exonucléases deviennent dominants thermique des radiations devient dominant. D'autres termes de mort cellulaire (comme par exemple l'*oncosé* ou la *pyknose*) ont été définis après observation au microscope et correspondent plutôt à des états particuliers des morts précédentes, notamment au niveau des tissus plutôt qu'au niveau de cellules individuelles.

1.2.4 Conclusion-bilan sur les rappels bibliographiques concernant les gliomes

Les différentes voies de réparation de l'ADN jouent un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité du génome. En plus de leur rôle dans la réparation des CDBs induites par les radiations ionisantes, la recombinaison et la suture sont essentielles pour réparer les CDBs produites lors de la réplication, lors de la méiose ou au cours du réarrangement des gènes codant pour les immunoglobulines (Morrison, Smith et al. 1997). Aujourd'hui, il est bien établi que les CDBs activent certaines fonctions cellulaires comme le contrôle du cycle

cellulaire, la mort cellulaire ou l'apoptose. De très nombreuses protéines interviennent dans les différentes voies de réparation de l'ADN. Cependant, un modèle mécanistique clair reste à proposer. En particulier, une des questions importantes qui restent à résoudre est de savoir comment DNA-PKcs, ATM ou ATR sont régulées, quel sont leurs rôles spécifiques ou comment elles interagissent précisément ensemble.

Ainsi, une meilleure compréhension des différentes voies de réparation de l'ADN pourrait mener à une évaluation plus juste de leur rôle dans la carcinogenèse et également conduire à des thérapies anticancéreuses plus efficaces. Ainsi, en modulant la NHEJ on pourrait influencer sur l'effet létal des radiations ionisantes sur les tumeurs et sur le différentiel entre tissus sains et malins. On pourrait également, par une meilleure connaissance de la relation phénotype-génotype, prédire une forte prédisposition au cancer, des réactions suraiguës aux radiations et/ou aux drogues chimiothérapeutiques. Finalement, le concept qui ressort des développements actuels tant en radiobiologie qu'en biologie moléculaire va dans le sens d'un *traitement personnalisé spécifique* non seulement pour chaque patient mais aussi pour chaque tissu. Cependant, les concepts et les moyens d'une telle démarche restent encore à définir.

II PROBLEMATIQUE DE LA THESE

II.1 Les questions posées par les traitements innovants contre les gliomes

Comme on l'a vu dans les chapitres précédents, une meilleure prise en charge thérapeutique des tumeurs du système nerveux central et périphérique représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Jusqu'à présent les traitements de ces tumeurs avaient été menés avec les outils classiques de la radiothérapie et de la chimiothérapie et sur la base de certains paradigmes comme celui de l'*excès de dose* ou de la barrière hémato-encéphalique (voir chapitre I.1). Le manque d'efficacité des traitements classiques contre les gliomes est venu le sentiment que de telles stratégies thérapeutiques resteraient inefficaces tant qu'une signature moléculaire évidente pour ce type de tumeurs ne serait pas découverte. Là encore, aucune spécificité moléculaire ne s'imposa pour stimuler les recherches sur des agents chimiques ciblés. Pourtant, au cours de ces cinq dernières années, l'émergence de traitements innovants mettant en œuvre des outils nouveaux proposés par les physiciens relança les recherches fondamentales et appliquées sur les tumeurs les plus récalcitrantes. Ce fut notamment le cas de l'hadronthérapie (radiothérapie par ions lourds) et des applications médicales du rayonnement synchrotron. On a pu mesurer, à travers les différents paragraphes du chapitre I.1 à quelle vitesse les industriels et les médecins ont alors collaboré pour mettre en place de telles approches.

En parallèle, la connaissance que l'on a de la réponse biologique aux radiations a aussi évolué considérablement : 1) dans le domaine *des concepts* (les notions de dose, d'efficacité biologique relative (EBR) ou de transfert d'énergie linéique (TEL) apparaissent de plus en plus imparfait pour décrire les événements radioinduits à l'échelle du nanomètre); 2) dans le domaine *fondamental* (avec notamment une meilleure connaissance des mécanismes de réparation de l'ADN, la découverte de nouveaux syndromes de radiosensibilité); 3) dans le domaine *technologique* (il est aujourd'hui possible de détecter les dommages de l'ADN en temps réel au sein même du noyau cellulaire) (Chapitre I.2). *Que pouvaient donc apporter à la thérapie des tumeurs du système nerveux central et périphérique ces notions, ces techniques, ces connaissances et ces outils nouveaux?*

II.2 Le contexte local

L'unité Inserm U836, dans laquelle ces travaux de thèse ont été effectués, est basée sur le site de l'Installation Européenne de Rayonnement Synchrotron (European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)). La photoactivation du cisplatine ainsi que la CT thérapie par agents de contraste iodés y occupent une part essentielle des recherches menées pour le développement de thérapies innovantes contre les gliomes qui avaient été déjà choisis comme modèles de tumeurs du système nerveux central. Cependant, la majeure partie des résultats provenait de transferts précliniques sur des rats du modèle F98 de gliome. En parallèle, sur le même site, certains utilisateurs du rayonnement synchrotron développaient une autre application médicale contre les gliomes, la technique des multifaisceaux parallèles (MRT), mais avec un modèle cellulaire différent (9L). Cette double différence rendait donc particulièrement hasardeuse toute intercomparaison, d'autant plus que la lourdeur des protocoles et l'accès limité aux faisceaux synchrotron permettaient difficilement la succession d'un nombre acceptable d'expériences (paragraphe I.1.4.6). *Ainsi le succès ou l'échec de telles modalités étaient-ils dus à la spécificité des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans chacun de ces trois modèles ou aux différences entre ces modèles de rongeur, ou bien encore aux deux ensemble?*

Nous nous sommes proposés de répondre à ces questions en quatre étapes.

II.3 Les différentes étapes de la thèse

II.3.1 Etape I - Nouveaux concepts de radiobiologie

Dans le même temps, un programme de recherche consistant à analyser systématiquement toute forme de radiosensibilité intrinsèque humaine, toute déficience de réparation des cassures double-brin de l'ADN et tout syndrome génétique pouvant y être associé avait été lancé au sein de l'U836 Inserm dès le début de cette thèse. Les techniques les plus récentes de biologie moléculaire et cellulaire nécessaires à un tel projet (immunofluorescence, électrophorèse en champs pulsés,...) y étaient déjà au point. Dans la

littérature, certains modèles de réparation de l'ADN furent basés sur des observations de co-immunofluorescence biaisée: les marqueurs pH2AX et MRE11 colocalisaient après irradiation alors que des immunofluorescences séparées montraient des apparitions de foci radioinduits complètement différents (Article I). Suite à l'analyse de ces artéfacts, une nouvelle voie de réparation dépendant de la protéine MRE11 fut mise en évidence et bouleversa l'analyse radiobiologique des bases de la radiosensibilité (Article II). Ces deux articles sont à la base de la première étape de cette thèse : *Etape I - Nouveaux concepts de radiobiologie* à laquelle j'ai participé en tant que co-auteur (*articles I et II*).

II.3.2 Etape II - Caractérisation radiobiologique des modèles de gliomes

Des premiers éléments sur les mécanismes biologiques déclenchés spécifiquement par chacune des trois modalités synchrotron (CT thérapie, PAT-Plat ou MRT) suggéraient la nécessité d'une étude systématique et approfondie de tous les paramètres radiobiologiques impliqués. Avec le but ultime de moduler ``à la carte`` la réponse des gliomes aux traitements radio-chimiothérapeutiques, les travaux de cette thèse se poursuivirent alors naturellement par l'analyse radiobiologique des trois modèles de gliomes de rongeurs les plus utilisés avec les marqueurs définis dans l'Etape I. Le statut fonctionnel de la protéine BRCA1, considérée comme un suppresseur de tumeur et dont les mutations hétérozygotes sont associées à des cancers familiaux du sein et de l'ovaire, apparut alors différent suivant le modèle de gliome : une analyse similaire sur des modèles humains s'imposa alors logiquement. Ces travaux constituèrent la seconde étape de cette thèse : *Etape II : Caractérisation radiobiologique des modèles de gliomes* (*articles III et IV*).

II.3.3 Etape III - Caractérisation radiobiologique de la neurofibromatose

Comme l'impact des conclusions de cette seconde étape semblait d'importance pour les tumeurs du système nerveux central, nous avons poursuivi notre analyse sur le système nerveux périphérique. La neurofibromatose, maladie génétique associée à une forte prédisposition aux schwannomes apparut alors comme un modèle d'étude intéressant, d'autant plus que ses caractères radiobiologiques n'avaient jamais vraiment été investigués. Un

parallèle entre BRCA1 et NF1 dont les mutations sont responsables de la neurofibromatose de type I (syndrome de Von Recklinghausen) fut alors recherché. Cette approche constitue la troisième étape de cette thèse (*Etape III: Caractérisation radiobiologique de la neurofibromatose (article V)*).

II.3.4 Etape IV - Pharmacomodulation de la recombinaison dans les gliomes

Enfin, la synthèse des travaux précédents ainsi que ceux obtenus à travers les différentes collaborations mit en lumière l'importance des réparations par recombinaison BRCA1-dépendantes dans la plupart des associations de radio-chimiothérapie. C'est particulièrement le cas pour la photoactivation du platine par rayonnement synchrotron. Il apparut alors évident que la synergie créée par la présence simultanée de cassures radioinduites de l'ADN et de dommages causés par les drogues de chimiothérapie mettait en œuvre une certaine compétition entre les différents modes de réparation de l'ADN. En particulier, l'action de certains inhibiteurs de tyrosines kinases qui commandent la réparation par recombinaison dépendant de RAD51 et BRCA1, voire de MRE11 fut alors évaluée (*Etape IV: Pharmacomodulation de la recombinaison dans les gliomes (article VI en préparation)*). Un travail de synthèse put alors être réalisé pour évaluer le potentiel des différentes stratégies contre les gliomes en tenant mieux compte des connaissances nouvelles de génotoxicologie pour réaliser une intercomparaison des différents traitements chimio-radiothérapeutiques des gliomes (revue I).

La figure 19 résume notre approche.

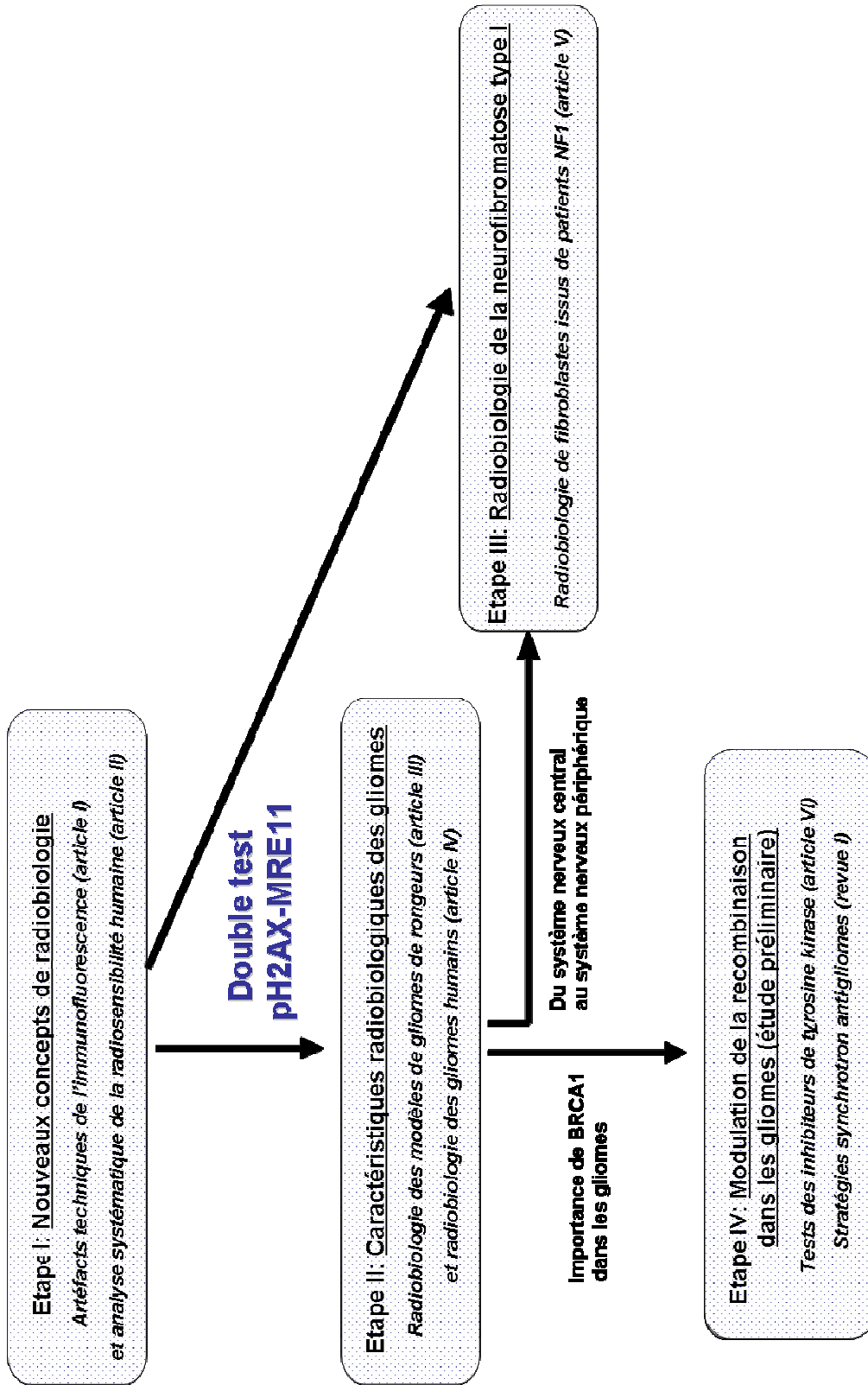


Figure 20: Logique de la démarche adoptée dans cette thèse.

III MATRIELS ET METHODES

Ce paragraphe résume succinctement les protocoles et les techniques utilisées dans cette thèse. Les articles fournissent des informations plus complètes.

III.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

III.1.1 Lignées de gliomes de rats

Les cellules de gliomes de rats C6, 9L et F98 (Tableau 11) ont été fournies par la collection ATCC (*American Type Cultures Collection*). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum medium, Gibco) complété par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et des antibiotiques (50000 UI.l⁻¹ de pénicilline, 50 mg.ml⁻¹ de Streptomycine; Gibco). Les cellules sont trypsinées au 1/5^e deux fois par semaine (Trypsin-EDTA, Eurobio). L'absence de mycoplasmes a été contrôlée par test DAPI (4,6-diamidine 2 phényl- indol dihydrochloré, Boehringer-Mannheim).

Ces modèles de gliomes de rats ont été décrits en détail par Barth et ses collaborateurs (Barth 1998). F98 est classé comme un gliome anaplasique ou indifférencié et C6 et 9L comme des gliosarcomes. Ces lignées sont connues pour leur croissance infiltrante et leurs propriétés non-immunogéniques, qui permettent leur implantation intracérébrale dans des rats syngéniques. Ces modèles sont largement utilisés dans les tests précliniques en neurooncologie. (Article III, Revue I).

Tableau 11 : Principales caractéristiques des lignées de gliome de rat.

Lignée	Type tumoral	Espèce de rat d'origine	Mutagène	Statut		Localisation de BRCA1	Dépositaire
				p53	p16/CDKn2a		
C6	Gliosarcome	Wistar	MNU, dose répétitive	Sauvage (Asai, Miyagi et al. 1994; Schlegel, Piontek et al. 1999)	Muté (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Cytoplasme	(Benda, Lightbody et al. 1968)
9L	Gliosarcome	CD Fisher	MNU, dose répétitive	Muté (Asai, Miyagi et al. 1994; Schlegel, Piontek et al. 1999)	Sauvage (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Nucleus Foci radioinduits	(Benda, Lightbody et al. 1968)
F98	Gliome anaplastique	CD Fisher	ENU, dose unique	Sauvage (Schlegel, Piontek et al. 1999) ou Muté (Senatus, Li et al. 2006)	Muté (Schlegel, Piontek et al. 1999)	Signal négatif	(Ko, Koestner et al. 1980)

III.1.2 Lignées humaines de gliomes

Les lignées de gliomes humains ont été fournies par le Pr. F ; Berger (INSERM U318, La Tronche, France). Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM ou RPMI 1640 (Gibco) complété par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et des antibiotiques (50000 UI.l⁻¹ de pénicilline, 50 mg.ml⁻¹ de Streptomycine ; Gibco). Les cellules ont été trypsinées et passées deux fois par semaine (Trypsin-EDTA, Eurobio). Leurs principales caractéristiques sont décrites dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Principales caractéristiques des lignées de gliomes humains.

Lignée	Type tumoral	Grade	Implantation dans la souris immunodéficiente	Dépositaire
U87MG (HTB 14)	Gliome anaplastique	III	OUI	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U118MG (HTB 15)	Gliome anaplastique	III	OUI	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U138MG (HTB 16)	Gliome anaplastique	III	NON	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
U373MG (HTB17)	Gliome anaplastique	III	OUI	J Ponten (Ponten and Macintyre 1968)
LN229	Gliome anaplastique	III	OUI	N de Tribolet (Diserens, de Tribolet et al. 1981)
CCF-STTG1	Glioblastome	IV	NON	ATCC
MO59J	Gliome anaplastique	III	NON	J Allalunis-Turner (Allalunis-Turner, Barron et al. 1993)

III.1.3 Les autres lignées utilisées dans cette thèse

Les lignées fibroblastiques non-transformées d'origines différentes (Tableau 13) ont été cultivées en routine dans du milieu DMEM (Gibco) complété par 20 % de sérum de veau fœtal (Gibco) Pour les lignées CHO (Chinese Hamster Ovary) le milieu F-12K avec 2 mM de L-glutamine (Gibco) et 10 % de sérum de veau fœtal ont été utilisés. Des antibiotiques (50000 UI.l-1 de pénicilline, 50 mg.ml-1 de Streptomycine ; Gibco) ont également été ajoutés. Les lignées fibroblastiques utilisées dans l'étape I sont détaillées dans l'article II.

Comme indiqué dans le tableau 13, 6 types des fibroblastes humains ont été choisis pour les étapes suivantes. Les cellules 1BR3 et CHO-K1 et AT5BR et CHO-Xrs6, dont les caractéristiques radiobiologiques ont été déjà décrites (Kemp, Sedgwick et al. 1984; Joubert and Foray 2006), en tant que témoins radiorésistantes et radiosensibles. Les fibroblastes de patients NF1 proviennent de la banque cellulaire Coriell (Camden, NJ, Etats-Unis). Les lignées GM01858 et GM01859 proviennent du même donneur souffrant de neurofibromatose 1.

Tableau 13 : Principales caractéristiques des lignées fibroblastiques humaines et des lignées de l'hamster chinois (CHO).

Nom	Espèce d'origine	Morphologie	Mutation du gène	Tissu d'origine
1BR3	Humain	Fibroblastes	Contrôle	Peau
GM01633	Humain	Fibroblastes	NF1 -/+, position inconnue	Peau
GM01858	Humain	Fibroblastes	NF1 -/+, position inconnue	Gliome cutané
GM01859	Humain	Fibroblastes	NF1 -/+, position inconnue	Tache « café-au-lait » cutané
GM07166	Humain	Fibroblastes	NBS1 -/-, (657del5)	Peau
AT1BR	Humain	Fibroblastes	ATM -/(5762ins137)	Peau
CHO-K1	Hamster	Epithélium	Contrôle	Ovaire
CHO-Xrs6	Hamster	Epithélium	DNA-PK	Ovaire

III.2 Procédure d'irradiation des cellules

III.2.1 Irradiation avec la source conventionnelle des rayons X

Les irradiations ont été effectuées avec un irradiateur clinique (200 kV Philips). Le faisceau de photons a été produit par une anode en tungstène, le voltage appliqué de 200 KV, l'intensité de 20 mA et l'utilisation d'un filtre de cuivre de 0.1 mm (Philips). Le champ d'irradiation était de 20 cm x 15 cm, la distance au foyer de 100 cm et le débit de dose de 1.234 Gy.min⁻¹. Les boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre dans lesquelles sont ensemencées les cellules, sont irradiées par série de six, dans une boîte de Plexiglas (Figure 20). Les flacons irradiés sont posés sur une plaque de plexiglas à la hauteur voulue.

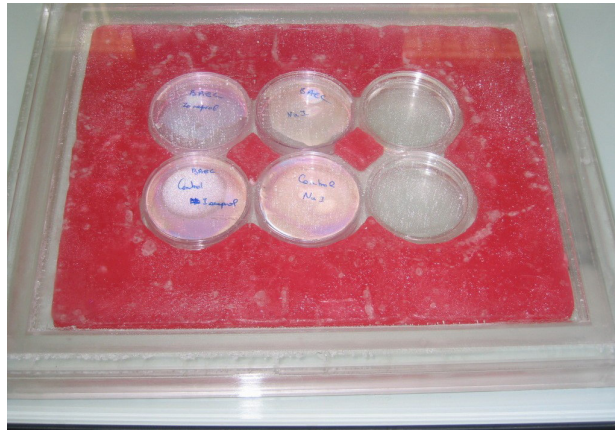


Figure 21: Boîte de Plexiglas renfermant les boîtes de Pétri contenant les cellules à irradier.

III.2.2 Irradiation synchrotron sur la ligne médicale de l'ESRF

Les irradiations synchrotron ont été effectuées sur la ligne médicale (ID 17) de l'ESRF (Grenoble) et réalisées à des énergies comprises entre 78 et 80 keV en utilisant un monochromateur constitué d'un cristal de silicium (Si <111>) en géométrie de Laue. La bande d'énergie sélectionnée couvre environ 80 eV. Le faisceau (1 mm de hauteur), définie par des lames de tungstène, est ajusté aux dimensions de nos échantillons. Le débit de dose, mesuré par une chambre d'ionisation, est en moyenne $1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules sontensemencées sur des lamelles de 4 cm^2 . Avant l'irradiation, les lamelles sont disposées verticalement dans des boîtes en plastiques remplies pas le milieu de culture. Ces boîtes sont alors disposées sur un socle, et irradiées grâce à une translation verticale de la lamelle dans le champ d'irradiation (Figure 21).

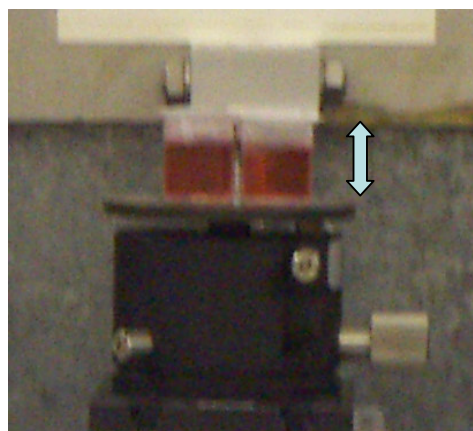


Figure 22: Le dispositif pour irradiation des lamelles dans le faisceau de rayonnement synchrotron.

III.3 Traitements pharmacologiques

III.3.1 Traitement par les sels de platine

Le sel de platine que nous avons utilisé est le cisplatine (Cisplatyl®, Merck) couramment utilisé en chimiothérapie (Figure 22) (Rixe 2000). La drogue platinée a été diluée à la concentration souhaitée (10 μ M, 24 h) directement dans le milieu de culture. En guise de comparaison, la figure 16 montre la forme chimique des composants platinés les plus utilisés.

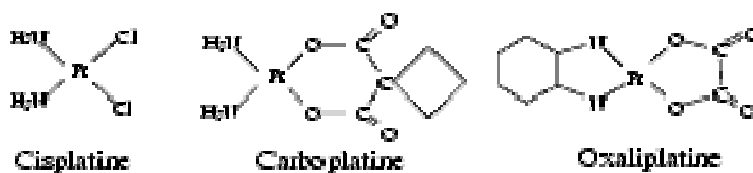


Figure 23 : Structure des molécules de cisplatine, de carboplatine et d'oxaliplatine.

III.3.2 Traitement par les inhibiteurs de kinases

Les drogues inhibitrices de kinases ont été fournies par la pharmacie centrale du CHU de Grenoble. Les composés poudreux ont été dilués dans le DMSO et conservés aliquotés à -80°C. Pour les contrôles, le même volume de DMSO seul a été utilisé. Les concentrations utilisées sont indiquées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Les inhibiteurs des protéines kinases utilisés.

Product (Synonymes)	Fournisseur	Concentration utilisé	Cibles moléculaires	Phase clinique	Référence
<i>Erlontinib</i> (<i>TARCEVA</i> ®)	Roche, France	5 µM	<i>EGFR</i> <i>PKCβ</i>	II-III I-II	(Bos, Mendelsohn et al. 1997)
<i>Sorafenib</i> (<i>NEXAVAR</i> ®, <i>BAY 43-9006</i>)	Bayer Pharma	1 µM	<i>PDGFR</i> <i>VEGFR</i> <i>Raf-1</i>	II-III	(Wilhelm, Carter et al. 2004)
<i>Sunitinib</i> (<i>SUTENT</i> ®, <i>SU11248</i>)	Pfizer	0.1 µM	<i>VEGFR</i> <i>PDGFRα</i> <i>cKit</i> <i>FLT3</i>	II-III	(O'Farrell, Abrams et al. 2003)
<i>Genisteine</i>	Calbiochem, Merck Biosciences	100 µM	<i>ITK non-spécifique</i> <i>Phosphorylations ATM dépendantes</i> <i>de</i> <i>pH2AX^{ser139}, ATM^{ser1981},</i> <i>p53^{ser6,9,15,20,46,392},</i> ↑ <i>expression de BRCA1 et BRCA2</i> <i>Activation Chk2</i>	I	(Ye, Goodarzi et al. 2004) (Fan, Meng et al. 2006) (Darbon, Penary et al. 2000)
<i>LFM-A13</i>	Calbiochem, Merck Biosciences,	20 µM	<i>Bruton tyrosine kinase (BTK)</i> <i>Polo-like kinase (PLK)</i>	-	(Mahajan, Ghosh et al. 1999) (Uckun, Dibirdik et al. 2007)
<i>Erbstatine</i> <i>analogue</i>	Calbiochem, Merck Biosciences	5 µM	<i>EGFR</i> <i>v-Abl</i>	-	(Kawada, Tawara et al. 1993)
<i>Quercetine</i>	Sigma-Aldrich	100 µM	<i>PI3K non-spécifique</i> <i>DNA-PKcs</i> <i>Phosphorylations</i> <i>ATM indépendantes de</i> <i>pH2AX^{ser139}, ATM^{ser1981}, p53 sites</i> <i> multiples</i> <i>HSP</i>	I	(Izzard, Jackson et al. 1999) (Ye, Goodarzi et al. 2004) (Koishi, Hosokawa et al. 1992)

III.4 Survie clonogénique

En radiobiologie, on admet qu'une cellule est viable ou survivante lorsqu'elle peut donner naissance à un clone contenant plus de 50 cellules. En pratique cependant, le nombre de colonies visibles est inférieur au nombre de cellules remises en culture. On appelle coefficient de clonage (Plating Efficiency ou PE) le rapport du nombre de colonies de plus de 50 cellules au nombre de cellulesensemencées. Ce coefficient varie considérablement avec la nature de la lignée cellulaire et est déterminé au cours de chaque expérience à l'aide de plusieurs boîtes témoins. Le calcul de la survie de chaque boîte expérimentale est donné par :

$$\text{Survie(dose)} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{PE} \times \text{Nombre de cellules}}$$

Le dénombrement des colonies survivantes a été réalisé manuellement. Les colonies de cellules sont fixées et colorées pendant 1 min avec 2 ml d'une solution de cristal violet (75% alcool à 95°, 25% cristal violet (Prolabo), Figure23).

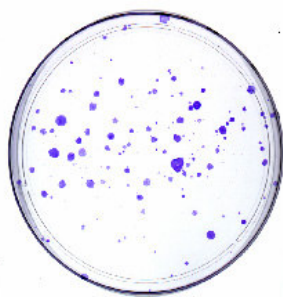


Figure 24 : Image d'une boîte de Pétri dans laquelle les colonies de cellules ont été fixées et colorées au cristal violet.

Le modèle le plus couramment utilisé pour ajuster les données de survie est le modèle linéaire-quadratique qui définit la survie par (Tubiana, Dutreix et al. 1986):

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Le paramètre α détermine la pente de la courbe de survie aux faibles doses (pente initiale) donc l'amplitude de l'épaule, tandis que le paramètre β détermine l'augmentation de la pente de la courbe aux fortes doses.

III.5 Immunofluorescence

Environ 5×10^5 de cellules sont déposées par lamelle (4 cm²) et celles-ci sont disposées par deux au fond de boîtes de Pétri et incubées à 37°C jusqu'à la confluence (2-3 jours). Après le traitement, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde (Sigma) à 3% pendant 15 min à température ambiante. Après rinçage au tampon phosphate salin PBS (Gibco), les cellules sont perméabilisées avec une solution de lyse (5% de Triton-100X) appliquée pendant 3 min à température ambiante (Foray, Marot et al. 2003). Les lamelles sont ensuite rincées au PBS, puis incubées avec l'anticorps primaire (40 min à 37°C). L'anticorps anti-pH2AX^{ser139} (Upstate, Euromedex) est dilué au 1/800e, anti-pATM^{ser1981} (Upstate, Euromedex) au 1/200, les anticorps anti-MRE11 (QED Bioscience, Abcys), anti-53BP1 (Upstate, Euromedex), anti-pDNA-PK^{thr2609} (Abcam), anti-pP53^{ser15} (Santa Cruz, Tebu-Bio), anti-BRCA1 (C-20, Santa Cruz, Tebu-Bio), anti-pBRCA1^{ser1423} (Upstate, Euromedex), anti-Rad51 (Abcam), anti-pCHK1^{ser345} (Cell Signalling), anti-pCHK2^{thr68} (Cell Signalling), anti-p-c-Jun^{ser63} (Santa Cruz, Tebu-Bio) et anti-NF1 (Abcam) sont dilués au 1/100e dans une solution de l'albumine d'origine bovine (bovine sérum albumine; BSA-Fraction V; Sigma-Aldrich), diluée à 2% dans du PBS. Les anticorps secondaires anti-souris couplés avec les fluorochrome FITC ou TRITC sont dilués au 1/100e (20 min à 37°C) et appliqués après un rinçage au PBS. Les lames sont montées avec du produit de montage contenant du DAPI (Vectashield® Hardset H-1500). Les lames sont examinées sous microscope à fluorescence (Olympus, programme AnalySys).

III.6 Etude du cycle cellulaire

La distribution des populations de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2M) est évaluée par cytométrie en flux. Environ 1×10^6 des cellules sont ensemencées dans les flacons de 75 cm². Après le traitement, les cellules sont récoltées par trypsination, rincées deux fois au PBS, fixées dans 1 ml de l'éthanol de 70 % glacial. Les échantillons sont maintenus à -20°C jusqu'à l'analyse. Pour l'analyse au cytomètre de flux (FACStarPlus, BD Biosciences, San Diego, CA - unité INSERM U548 (CEA, Grenoble), les cellules préalablement fixées sont décongelées, rincées deux fois au PBS et ensuite marquées

avec 0.1 mg.ml⁻¹ d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich). Les spectres ont été exploités par le logiciel Winmdi version 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

III.7 Extraits nucléaires et immunoblots

Les cellules sont décollées dans leur milieu de culture avec un grattoir, puis soumises à leur traitement (irradiation) en suspension dans des boîtes de Pétri. Après le traitement, les cellules ont été centrifugées, puis rincées deux fois au PBS. Les culots à secs sont conservés à - 80°C. Pour séparer les extraits nucléaires, le culot cellulaire est repris dans un tampon hypotonique (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) complété par des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Calbiochem®, Darmstadt, Allemagne) pendant 10 min à 4°C. Les noyaux ainsi isolés sont récupérés par centrifugation (4000 tours/min pendant 10 min, 4°C) et récupérés dans un tampon hypertonique (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10% de glycérol) complété par des inhibiteurs de phosphatases et de protéases pendant 10 min à 4°C. Pour préparer les extraits totaux, le culot cellulaire est repris directement dans le tampon hypertonique et les échantillons sont homogénéisés avec l'aide d'un sonicateur. La concentration des protéines est mesurée par la méthode de Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA). Pour l'immunoblot, 100 µg d'extraits de protéines sont bouillis dans du tampon de charge pendant 3 minutes à 95°C, puis déposés dans un gel d'électrophorèse SDS-PAGE pour être dissociés par migration dans le système des minigels (Bio-Rad Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA). Le transfert des protéines a été effectué sur membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell, Dassel, Allemagne) pendant 2 h dans un système de transfert semi-sec (Biorad, Hercules, CA, USA). La solution de base pour les rinçages ou préparation des anticorps est PBS-T (PBS 1 % Tween 20). Après un rinçage au PBS-T suivi d'une incubation dans une solution PBS-T complétée par 2 % de BSA-Fraction V (pour les études des phosphorylations) ou par du lait en poudre à 5% (pour les autres protéines). La membrane plongée dans une solution de TBS-T-ainsi bloquée et contenant l'anticorps primaire est hybridée pendant une nuit à 4°C. Après les rinçages successifs dans du TBS-T bloqué, l'anticorps secondaire dilué est appliqué pendant 40 min à la température ambiante. Après rinçage, les protéines sont révélées par chimioluminescence en utilisant le kit ECL (Amersham, Burckingshire, UK).

IV RESULTATS

Les résultats sont présentés par étape. Un condensé en français de chaque article précède la dernière version acceptée, en cours de révision ou soumise.

IV.1 Etape I - Nouveaux concepts de radiobiologie

Article I

Consequences of the *bleed-through* phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci.

Wendy Rénier, Aurélie Joubert, Zuzana Bencokova, Jérôme Gastaldo, Catherine Massart and Nicolas Foray

Accepté dans International Journal of Radiation Biology le 4 avril 2007.

IV.1.1 Contexte

Depuis quelques années, la technique d'immunofluorescence a bouleversé la vision des radiobiologistes pour les événements précoces comme les phosphorylations qui surviennent au niveau moléculaire et cellulaire après un stress génotoxique. En effet, l'immunofluorescence permet de suivre facilement les relocalisations et l'association-dissociation des nombreuses protéines notamment après irradiation (Nelms, Maser et al. 1998; D'Amours and Jackson 2002). La technique d'immunofluorescence est basée sur l'hybridation des complexes de protéine-anticorps conjugués avec des marqueurs fluorescents. Des marqueurs fluorescents sont excités par des longueurs d'onde spécifiques (souvent dans le spectre UV) et émettent une lumière visible spécifique. Cependant, en dépit des efforts fournis par les fabricants, des chevauchements des spectres de longueurs d'onde d'excitation et/ou

d'émission sont généralement inévitables (Figure 1 de l'Article I). Les conséquences pratiques de ce phénomène de chevauchement (« *bleed-through* ») de fluorescence sont des signaux double-positifs produits en co-immunofluorescence. La très grande majorité des expériences de co-immunofluorescence exécutées jusqu'ici en radiobiologie ont été réalisées avec les marqueurs rouges et verts (notamment avec la fluorescéine (FITC) et la rhodamine (TRITC)) qui justement favorise le phénomène de chevauchement (Figure 1 de l'Article I). Malheureusement, la description de tels artefacts est restée limitée à un certain nombre de notes techniques fournies par les fabricants et complètement ignorés en littérature scientifique.

IV.1.2 But de l'article

Comme on l'a vu dans les rappels bibliographiques, l'enthousiasme pour l'immunofluorescence s'explique surtout par l'utilisation massive de l'anticorps pour marquer la phosphorylation de l'histone variable H2AX (pH2AX) et ainsi détecter les cassures double-brin (Rothkamm and Lobrich 2003). Tandis que la grande majorité d'anticorps contre les protéines d'intérêt en radiobiologie sont généralement appliqués à une dilution de 1/100, les anticorps commerciaux contre les formes phosphorylées de pH2AX sont si puissants que la dilution généralement utilisée est 1/800e. Malgré cela, les foci nucléaires pH2AX sont généralement clairs et distincts avec une forte intensité de signal qui pourrait amplifier les artefacts dus au chevauchement. L'article I a pour but de mieux étudier les conséquences des artefacts de chevauchement. Nous y présentons deux exemples représentatifs de la fausse colocalisation artéfactuelle: 1°) une co-immunofluorescence entre pH2AX et une protéine cytoplasmique (HSP70) qui ne forme pas de foci nucléaires après irradiation ; 2°) une co-immunofluorescence entre pH2AX et la protéine MRE11 qui forme des foci après irradiation.

IV.1.3 Résultats principaux

En particulier, ce dernier exemple montre que dans le cas d'une co-immunofluorescence TRITC-FITC, pH2AX et MRE11 montrent une cinétique d'apparition et disparition des foci identique (Figure 2 de l'Article I). A l'inverse une simple immunofluorescence séparée montre que les foci MRE11 radioinduits n'apparaissent qu'à partir de 1-2 h post-irradiation alors que la totalité des foci pH2AX sont déjà présents dès les premières minutes.

IV.1.4 Conclusions et impact sur la thèse

Les conséquences de tels artefacts sont d'importance. En effet, comme il l'a été dit dans les rappels bibliographiques, un certain consensus existait depuis une dizaine d'années dans la littérature concernant les différentes voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN : d'une part la suture, plus active en G1 (la phosphorylation de H2AX y est un événement majeur); d'autre part, la recombinaison homologue, plutôt active en S-G2/M (RAD51 y joue un rôle essentiel). Dans ce modèle, la protéine MRE11, qui ne co-localise pas avec RAD51 figurait dans la voie de réparation par suture, notamment sur la bases des co-immunofluorescences avec pH2AX (Tableau 1 de la Figure 1). L'existence d'artefacts de chevauchement remet donc en cause cette théorie. L'article qui suit (Article II) donne d'autres éléments pour considérer MRE11 comme une protéine appartenant à une troisième voie de réparation des cassures de l'ADN.

Article II

DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?

Aurélie Joubert, Kristin M. Zimmerman, Zuzana Bencokova, Jérôme Gastaldo, Nicole Chavaudra,

Vincent Favaudon, Colin F. Arlett, and Nicolas Foray

En cours de révision depuis mars 2007.

IV.1.5 Contexte

Dans certains cas cliniques, la radiothérapie doit être modifiée ou abandonnée si un patient exhibe des réponses aiguës au rayonnement. En 1981, une corrélation entre la réponse clinique (mesurée *in vivo* par le contrôle local de la tumeur) et la radiosensibilité intrinsèque (évaluée *in vitro* par les courbes de survie clonogénique) a été établie (Fertil and Malaise 1981). La technique des courbes de survie nécessite l'établissement de lignée cellulaire après la biopsie (soit environ 3 semaines). Afin de réaliser la prédiction des radiosensibilités plus rapidement, des efforts considérables ont été fournis pour développer des tests moléculaires prédictifs. Cependant, rassembler des cellules des patients exhibant de diverses réactions à leur traitement anticancéreux soulève un certain nombre de questions pratiques. Dans un premier temps, les radiobiologistes se sont donc naturellement concentrés sur les maladies génétiques humaines connues pour être liées aux réponses graves et aiguës de rayonnement et qui partagent un tableau commun de symptômes cliniques et biologiques comme l'instabilité génomique et les rendements anormaux d'aberrations chromosomiques et d'immunodéficiences. C'est notamment le cas des syndromes cités dans les rappels bibliographiques comme l'ataxia-telangiectasia, les syndromes de Nimègue, Cockayne, Bloom, Fanconi, Xeroderma Pigmentosum, ATLD, LIG4, etc... Généralement, ces syndromes ne montrent pas la même gamme de radiosensibilité. Cependant, la radiosensibilité peut différer à l'intérieur d'un groupe isogénique donné (par exemple AT classique et AT variant) et, réciproquement, les cellules avec des mutations de différents gènes peuvent montrer une radiosensibilité cellulaire semblable (des mutations de gène XP et de CS, de BLM et de FANC). Le développement de tests prédictifs moléculaires appropriés nécessite une corrélation *quantifiée* entre les marqueurs moléculaires et la survie, quel que soit le gène considéré.

IV.1.6 But de l'article

Nous avons travaillé avec une collection de 40 lignées fibroblastiques humaines représentant au moins 8 syndromes génétiques différents et couvrants le plus grand spectre de la radiosensibilité humaine étudiée. La survie clonogénique après 2 Gy (SF2) ainsi que la plupart des tests moléculaires de la réparation des CDBs (immunofluorescence, électrophorèse en champs pulsés, tests plasmidiques, etc...) ont été appliqués à cette collection de lignées. Le but principal de cette étude était de fournir une indication claire sur le choix des tests prédictifs de la radiosensibilité les plus fiables et les plus indépendants des mutations de gènes considérées.

IV.1.7 Résultats principaux

Une corrélation quantitative, valable pour les mammifères, entre la radiosensibilité et le pourcentage des CDBs non réparées a été obtenue. Toutefois, suivant le test moléculaire utilisé, la nature de cette corrélation peut changer. Cependant, aucune analyse ne distingue la gamme complète de la radiosensibilité humaine. En particulier, l'immunofluorescence pH2AX ne prévoit pas des radiosensibilités modérées souvent associées à de forte prédisposition au cancer. A l'inverse de tels syndromes se distinguent par des foci MRE11 absents. Ainsi, nos résultats suggèrent l'existence de deux voies de réparation des CDBs indépendantes, dont les dysfonctionnements peuvent être détectés par immunofluorescence pH2AX d'une part et immunofluorescence MRE11 d'autre part. Une classification des maladies associées à une radiosensibilité et tenant compte des caractéristiques de la réparation par H2AX ou MRE11 est proposée.

IV.1.8 Conclusions et impact sur la thèse

En plus des conclusions de l'Article I, les résultats de cet article II ont conditionné notre analyse radiobiologique des événements radioinduits en appliquant systématiquement l'immunofluorescence H2AX et l'immunofluorescence MRE11 afin de sonder les possibles dysfonctionnements de ces deux voies de réparation. Ce modèle est donc nouveau par rapport aux hypothèses établies depuis quelques années dans la littérature et cette thèse en bénéficie donc pleinement.

IV.2 Etape II : Caractérisation radiobiologique des modèles de gliomes

Article III

Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin

Zuzana Bencokova¹, Laurianne Pauron¹, Clément Devic¹, Aurélie Joubert^{1,2}, Jérôme Gastaldo¹,

Catherine Massart¹, Jacques Balosso^{1,3} and Nicolas Foray^{1*}

Accepté en mars 2007 dans Journal of Neuro-Oncology.

Article IV

Response of human glioma models to radiation and cisplatin: impact of DNA repair and BRCA1-dependent stress signaling pathway

Zuzana Bencokova, Clément Devic, Aurélie Joubert, Jérôme Gastaldo, Catherine Massart, Jacques Balosso, and

Nicolas Foray*

En révision depuis février 2007.

IV.2.1 Contexte pour les articles III et IV

La plupart des gliomes sont réfractaires aux traitements de chimio-radiothérapie standard. La médiane de survie des patients atteints d'un gliome de grade IV (glioblastome) n'excède pas un an même après chirurgie agressive et un traitement de radiothérapie. Trois caractéristiques spécifiques pour les gliomes doivent être évoquées:

- la survie clonogénique après l'irradiation n'est pas un bon test prédictif pour la curabilité de glioblastomes (Taghian, Ramsay et al. 1993);

- les modèles animaux portant un gliome ne reflètent pas toutes les spécificités moléculaires des gliomes humains (Holland 2001);

- la capacité de réparation des CDBs dans gliomes malins après un traitement de chimiothérapie ou radiothérapie reste inconnue et la plupart des investigations sont dirigées plutôt sur les acteurs de la transduction du signal et du contrôle du cycle cellulaire (Zhu and Parada 2002)

Dans les recherches des stratégies thérapeutiques anti-gliomales plusieurs modèles de gliomes de rongeurs ont été utilisés en préclinique. Les lignées C6, 9L et F98 sont les plus fréquemment choisis. D'ailleurs leur choix n'est presque jamais argumenté et c'est souvent la disponibilité ou les capacités de prolifération qui sont mis en exergue. En ce qui concerne les lignées humaines, ce sont les mêmes motivations.

Récemment, notre équipe a obtenu une très forte prolongation de survie dans des conditions de photoactivation du cisplatine (Biston, Joubert et al. 2004). Là encore, le choix du modèle (F98) n'a pas été plus motivé. Il a été cependant suggéré que la réponse à un tel traitement est dépendante du statut fonctionnel de BRCA1 (Biston, Joubert et al. 2004). Ces résultats *in vivo* nous ont donc incités à étudier le statut fonctionnel de BRCA1 et des capacités de réparation des CDBs de la lignée F98, puis des autres modèles de gliomes de rongeurs (Article III). Nous avons ensuite adopté la même approche sur des lignées d'origine humaine (Article IV). Des avancées récentes ont facilité une telle approche :

- l'interaction entre deux voies principales de réparation des CDBs : la suture (NHEJ) et la recombinaison, notamment quand la chimiothérapie est appliquée simultanément avec l'irradiation (Corde, Balosso et al. 2003) ;

- l'existence d'une hiérarchie temporelle entre les phosphorylations successives des partenaires de ATM (Foray, Marot et al. 2003);

- la possibilité de visualiser et quantifier les CDBs à partir de foci nucléaires formés dans le noyau et les marqueurs de la signalisation du stress (Rothkamm and Lobrich 2003).

IV.2.2 Buts de l'article III

L'article III décrit la réponse moléculaire et cellulaire aux rayons X ou au cisplatine de 3 lignées de gliomes de rat C9, 9L et F98 les plus largement utilisées comme les modèles orthotopiques dans les essais précliniques. Les voies de réparation des CDBs, les voies de signalisation des arrêts du cycle cellulaire et de la mort cellulaire un stress génotoxique (rayons X ou cisplatine) ont été étudiées.

IV.2.3 Résultats de l'article III

Mort cellulaire. Ces modèles de rongeurs montrent déjà des différences évidentes morphologiques ou génétiques (Tableau 1, Article III). Nous avons étudié d'abord la survie clonogénique après les rayons X ou cisplatine. La lignée 9L est la plus radiorésistante ($SF2=71.9$ de ± 2.0 %) alors que C6 ($SF2=53.0 \pm 2.0$ %) et F98 ($SF2=41.4 \pm 2.5$ %) peuvent être considérées comme faiblement radiosensibles pour des lignées de mammifères (Figure 1A, Article III). En réponse au cisplatine C6 est la lignée la plus résistante (Figure 1B, Article III). Le nombre de micronoyaux corrèle les résultats de survie pour tous les traitements. Par contre, il faut noter que seule la lignée 9L (la plus radiorésistante) montre des corps apoptotiques. En conséquence, ni le statut de p53 ni l'apoptose ne prévoient la réponse cellulaire au rayonnement et au cisplatine dans ces modèles de gliomes (Tableau 1, Article III).

Arrêts du cycle. C6 et 9L n'ont pas montré d'arrêts radioinduits G1 ou G2 très marqués. Par contre, F98 a montré une grande diminution de la population en G1 et un arrêt marqué en G2. Après traitement au cisplatine, toutes les lignées ont montré une diminution relative de la population en G1, (une absence de l'arrêt en G1). Un arrêt impressionnant en S a été observé pour 9L, alors que l'arrêt en S était absent après $3 \mu\text{M}$ de cisplatine pour C6 et F98 (Figure 2, Article III).

Réparation des CDBs. La cinétique de réparation des CDBs par suture a été trouvée plus rapide pour 9L. C6 a montré une réponse intermédiaire et F98 un nombre élevé de CDBs résiduelles (par pH2AX ou pDNA-PK_{cs}) (Figure 3A, Article III). Ces données sont en accord avec la corrélation quantitative obtenue entre radiosensibilité et pourcentages de CDBs non réparées (Figure 3B, Article III) (Chavaudra, Bourhis et al. 2004).

Statut fonctionnel de BRCA1. Nous avons examiné le statut fonctionnel de BRCA1 par l'immunofluorescence et l'immunoblotting. Par immunofluorescence, 9L est la seule lignée présentant les foci BRCA1 classiques spontanées ou induites par le traitement. Nous avons trouvé une expression de BRCA1 très faible dans la lignée F98. BRCA1 est localisée au niveau du cytoplasme dans C6 (Figure 4A, Article III). Les immunoblots ont validé les conclusions sur l'expression forte dans la lignée 9L. De plus, l'analyse par immunoblot révèle une forme tronquée de BRCA1 pour F98 (Figure 4B, Article III). Ces résultats suggèrent que

BRCA1 est altéré dans C6 et F98. 9L semble être le seul modèle de gliome de rongeur avec une réponse normale aux rayons X et au cisplatine.

IV.2.4 Discussion de l'article III

La plupart des stratégies thérapeutiques des gliomes ont été testées dans des modèles de rongeur. Cependant, l'extrapolation des résultats aux gliomes humaines reste incertaine (Holland 2001). Les gliomes de rongeur sont généralement induits par l'action d'un mutagène, notamment par des nitrosourées. L'action de tels agents semble favoriser des mutations des gènes comme BRCA1 (Zan, Haag et al. 2003). Les investigations sur les marqueurs moléculaires spécifiques pour les gliomes sont généralement focalisées sur des acteurs de la prolifération (Ueki, Nishikawa et al. 2002; Zhu and Parada 2002; Bredel, Bredel et al. 2005). Très peu de recherches portent sur p53 et aucune sur BRCA1 dans les gliomes. Plusieurs des protéines de signalisation sont des partenaires de BRCA1 mais jouent plutôt le rôle des « *gatekeepers* » que de « *caretakers* ». C'est notamment le cas du p16/Cdkn2a/Ink4a (cycline dépendante kinase 2a) dont les mutations homozygotes ont été détectées dans C6 et F98 mais pas dans 9L (Schlegel, Piontek et al. 1999). p16/Cdkn2a/Ink4a fait partie d'une cascade d'événements dépendants de BRCA1, provoqués par le stress génotoxique. Cette protéine co-précipite avec BRCA1, et elle phosphoryle BRCA1 à la sérine 1497 comme réponse à la progression dans le cycle cellulaire et aux dommages d'ADN (Ruffner, Jiang et al. 1999). Le groupe de Deans a découvert les cellules BRCA1-négatives montrent une haute activité de p16/Cdkn2a/Ink4a et ces lignées sont 2 à 4 fois plus sensibles aux inhibiteurs de CDK que les lignées BRCA1-positives (Deans, Khanna et al. 2006). Les mutations de *p16/Cdkn2a/Ink4a* dans C6 et F98, ainsi que nos résultats sur le dysfonctionnement de BRCA1 suggère un modèle reliant les événements de signalisation et de réparation après un traitement génotoxique qui serait dépendant des phosphorylations de BRCA1, d'ATM et de la voie p16/Cdkn2a/Ink4a.

Quelles sont les conséquences moléculaires du dysfonctionnement de BRCA1? Le dysfonctionnement de BRCA1, facilité par l'instabilité génomique, peut être à l'origine de formation des gliomes. BRCA1 altéré pourrait contribuer au manque de contrôle des voies de tyrosine kinase et ainsi modifier la prolifération cellulaire (Foray, Marot et al. 2002). Nos

résultats ont soulevé la question de l'implication de cette protéine dans la cancérogenèse des tumeurs cérébrales. Cette idée s'appuie sur le fait que l'activité BRCA1 comme suppresseur de tumeur n'est pas limitée au cancer de sein et/ou ovaire. Notamment, les expériences de Marot et al ont précisé le rôle de BRCA1 dans les tumeurs de poumon et de colon (Marot, Opolon et al. 2006).

IV.2.5 Conclusions et impact sur la thèse de l'article III

Nos résultats ont renforcé l'importance du choix du modèle de gliome de rat sur les bases génétiques et radiobiologiques, puisque tous ces modèles utilisés en préclinique sont induits par la mutagénèse chimioinduite (nitrosourée) ce qui peut favoriser des mutations spécifiques de certaines gènes en préférence. En particulier, le statut fonctionnel de BRCA1 peut conditionner la réponse aux traitements anti-gliomales. Comme BRCA1 agit en tant que le suppresseur de tumeurs dans un certain nombre de cancers, nos résultats soulèvent également la question de l'implication de BRCA1 dans la gliomagenèse.

IV.2.6 Buts de l'article IV

Dans cet article, la réponse moléculaire et cellulaire aux rayons X et au cisplatine a été analysée pour 7 modèles de gliomes humains. Nous avons étudié la réparation des CDBs et les voies de signalisation du stress. Le rôle potentiel de BRCA1 a été étudié dans ces lignées. Les mêmes techniques que dans l'article III ont été utilisées.

IV.2.7 Résultats principaux de l'article IV

Réparation des CDBs: Les lignées gliomales humaines présentent une large gamme de foci persistants (8 - 58 foci pH2AX après 2 Gy et 24 h de réparation). La lignée MO59J, utilisée comme témoin extrêmement radiosensible a montré le défaut massif de réparation par suture (Lees-Miller, Godbout et al. 1995; Chavaudra, Bourhis et al. 2004). Parmi les autres lignées, deux groupes ont été définis selon les réponses au traitement. Un groupe plutôt radioradiorésistant avec U87, U373 et LN229 qui ont montré peu de foci pH2AX persistants

(8 - 12 foci pH2AX après 2 Gy et 24 h de réparation); un groupe plutôt radiosensible aux traitements avec U118, U138 et CCF qui ont montré plus que 20% de foci irréparables (23 – 36 foci pH2AX après 2 Gy et 24 h de réparation) (Figure 1A). Ces données sont en accord avec une corrélation générale, précédemment publiée, établissant un lien quantitatif entre SF2 et CDBs irréparables (Chavaudra, Bourhis et al. 2004). Les lignées prétraitées par cisplatine montrent un nombre de foci pH2AX systématiquement plus grand. En accord avec l'hypothèse que la suture est inhibée par cisplatine (Turchi, Henkels et al. 2000), nos données confirment que le traitement combiné génère un effet additif.

La question de l'appartenance du complexe MRE11-RAD50-NBS1 à la suture ou à la recombinaison homologue reste controversée (Di Virgilio and Gautier 2005). Notre article II présente l'hypothèse que la protéine MRE11 serait impliquée dans une troisième voie de réparation indépendante de RAD51 et de la suture. Nous avons quantifié les foci MRE11 après 2 Gy à 4 h. Le nombre de foci MRE11 à 4 h est proportionnel au nombre de pH2AX restants à 24 h. La formation des foci pH2AX et MRE11 exigent l'activité kinase de ATM. Nous avons donc quantifié son activation après 2 Gy (à 10 min et 4 h) par l'intermédiaire de nombre de foci associés à l'auto-phosphorylation de ATM (Bakkenist and Kastan 2003). A l'exception de MO59J qui présente un délai de l'activation radioinduite de ATM car il possède une mutation de *ATM* (Tsuchida, Yamada et al. 2002), les autres lignées de gliomes ont montré un nombre maximal de foci pATM à 10 minutes après 2 Gy (Figure 2C).

Statut fonctionnel de BRCA1. Toutes les modèles de gliomes ont montré des foci RAD51 spontanés mais aussi après un stress génotoxique (rayons X ou cisplatine). Par immunoblot, BRCA1 migre à la taille prévue pour toutes les lignées mais son niveau d'expression et la phosphorylation radioinduite de la serine1423 varie énormément d'une lignée à l'autre. U118 et U373 ont l'expression spontanée la plus faible, l'U87 et MO59J la plus forte (Figure 3A). Seulement 2 (MO59J, U87) sur 7 lignées irradiées ont montré une phosphorylation radioinduite de BRCA1. U373 et LN229 ont montré une deuxième bande au-dessus de BRCA1 qui semble trop haut pour représenter une forme hyper-phosphorylée de BRCA1 (Figure 3A). Par immunofluorescence, les foci BRCA1 radioinduits sont observés seulement dans MO59J et l'U87. Pourtant, dans toutes les lignées, les foci spontanés (dus à la phase S-G2/M) sont visibles. Ce dernier résultat peut s'expliquer par le fait que les phosphorylations des sérines de BRCA1 liées au cycle cellulaire, aux rayons X ou au cisplatine ne sont pas dépendantes des mêmes kinases (Xu, Kim et al. 2001) (Figure 3B). La phosphorylation au niveau de serine 1423 est un événement ATM- et ATR-dépendant (Foray, Marot et al. 2003).

Nous avons examiné la présence des formes phosphorylées de BRCA1^{ser1423} par l'immunofluorescence. Seulement MO59J et U87 montrent des signaux positifs de pBRCA1^{ser1423}, confirmant une fois encore que le statut fonctionnel de BRCA1 est en cause dans la majorité des lignées testées mais qu'il n'est pas prédictif de la radiosensibilité (U87 est la plus radiorésistante et MO59J la plus radiosensible).

Arrêts du cycle. BRCA1 facilite les phosphorylations en cascade des substrats ATM- et ATR-dépendantes. L'existence de cette hiérarchie de substrats, conditionne les arrêts du cycle cellulaire (Foray, Marot et al. 2003). Nous avons identifié une vaste gamme de réponse dans les arrêts du cycle cellulaire qui semble à la fois conditionnée par le statut de BRCA1 mais également la nature du stress. L'étude des arrêts du cycle a également été renforcée par l'analyse de la phosphorylation de p53 (pP53^{ser15}) par immunofluorescence (voir Article III). Les différences dans la fonctionnalité de BRCA1 peuvent produire des réponses négatives après irradiation mais par contre positives après le traitement par cisplatine (comme nous l'avons observé dans LN229 et U373). Seules les lignées U87 et MO59J (BRCA1 positif) présentent des arrêts du cycle normaux.

IV.2.8 Discussion de l'article IV

Les caractéristiques radiobiologiques de 7 lignées de gliomes ont été examinées avec les techniques les plus récentes (l'immunofluorescence de pH2AX, MRE11, pATM, RAD51 et BRCA1) : nous avons observé un large spectre de la capacité de réparation des CDB, (comme c'était prévu dans les tumeurs). Étonnamment, les fonctions de la protéine BRCA1 ont une fois encore été trouvées endommagées dans la majorité (5 sur 7) des lignées après exposition aux rayons X. Quelles conséquences peuvent avoir ce dysfonctionnement de BRCA1 dans le choix des stratégies thérapeutiques ? Jusqu'ici, les chercheurs se sont concentrés sur des acteurs de prolifération des gliomes, mais il ne existe aucun consensus pour une signature moléculaire spécifique dans cette pathologie (Zhu and Parada 2002; Bredel, Bredel et al. 2005). Aucun rapport ne précise par ailleurs le statut et le rôle de BRCA1 dans les gliomes. Cependant, tous les acteurs des voies majeures de signalisation responsables de la gliomagenèse (les voies de transduction du signal : EGFR/RAS/PTEN et les voies de contrôle du cycle cellulaire : P53/MDM2/p14, RB1/CDK4/P16) sont des partenaires de

BRCA1 (Zhu and Parada 2002; Bredel, Bredel et al. 2005). D'autres investigations sont donc nécessaires pour éclaircir le rôle de BRCA1 dans les gliomes.

D'autre part, on voit bien que la survie à 2 Gy (SF2) n'est pas un facteur prédictif de la radiosensitivité des gliomes, car ils possèdent une grande hétérogénéité cellulaire (Taghian, Suit et al. 1992; Taghian, Ramsay et al. 1993). L'apoptose n'est pas non plus un bon facteur prédictif de radiocurabilité. Enfin, BRCA1 n'est pas indispensable pour la suture (la voie majoritaire de réparation de CDB) ; le dysfonctionnement de BRCA1 n'a donc pas d'impact significatif sur la radiosensibilité. Par contre, le dysfonctionnement de BRCA1 pourrait propager plus rapidement à travers un manque de contrôle du cycle des dommages non réparés.

IV.2.9 Conclusions et impact sur la thèse de l'article IV

BRCA1 s'est avéré être fonctionnellement altéré dans 5 sur 7 lignées de gliomes humains, favorisant l'instabilité génomique, les arrêts du cycle cellulaire non contrôlés et la tolérance aux dommages d'ADN irréparables. Nos résultats renforcent une fois encore l'importance du choix du modèle dont le statut BRCA1 peut conditionner la réponse au rayonnement et/ou au cisplatine.

IV.3 Etape III : Caractérisation radiobiologique de la neurofibromatose I

Article V

The neurofibromatosis type I protein participates to the ATM-dependent signaling and DNA repair pathways in response to ionising radiation

Zuzana Bencokova[†], Clément Devic, Aurélie Joubert^{†,§}, Catherine Massart[†] and Nicolas Foray^{†,#}

Soumis en mai 2007.

IV.3.1 Contexte

Signes cliniques. La *neurofibromatose de type I* (NF1) est un désordre neurocutané autosomal dominant qui a été identifié pour la première fois par Friedrich Von Recklinghausen en 1882, d'où son autre nom : la maladie de Von Recklinghausen, plus connue comme étant *la maladie d'Elephant-Man*. NF1 est le syndrome de prédisposition de cancer le plus commun, avec une incidence de 1/2500 naissances. NF1 est principalement associé à la formation de *tumeurs bénignes* le long des nerfs périphériques et optiques et de accumulations des melanocytes appelées *taches de café-au-lait* (Zhu and Parada 2002; Ferner 2007). NF1 est également répertorié comme syndrome de *cancer héréditaire* puisque les patients souffrant de NF1 montrent une incidence élevée de *tumeurs malignes* telles que des neurofibrosarcomes, des astrocytomes et des rhabdomyosarcomes. En dépit d'un pénétrance de 100% (Riccardi and Lewis 1988), la manifestation clinique de NF1 peut varier énormément à travers la même lignée. Ainsi, dans certains cas, le diagnostic de la maladie reste parfois difficile malgré ses manifestations spectaculaires (Ferner, Huson et al. 2007).

Fonctions biologiques. Au niveau moléculaire, on connaît encore peu de choses sur les fonctions du gène dont les mutations sont responsables de la maladie. Le gène NF1 est situé sur le chromosome 17q11 et code pour une protéine de 2818 acides aminés appelée neurofibromine (Wallace, Marchuk et al. 1990; Gutmann, Wood et al. 1991). La neurofibromine est fortement conservée à travers l'évolution. En particulier, la neurofibromine porte des séquences que l'on retrouve dans les protéines de type GTPase, notamment impliquées dans l'inhibition du proto-oncogene Ras qui joue un grand rôle dans la

tumorigénèse (Basu, Gutmann et al. 1992). Ainsi, si la neurofibromine est altérée, elle compromettrait l'inactivation de Ras ce qui favoriserait une prolifération anormale, une certaine instabilité et une forte prédisposition au cancer. Aucun autre modèle n'a été proposé pour expliquer la forte prédisposition au cancer associé à NF1, ce qui reflète bien la pauvreté des données moléculaires sur cette maladie.

Caractéristiques radiobiologiques de la neurofibromatose de type 1. Puisque le syndrome NF1 est associé à une susceptibilité élevée des tumeurs bénignes et malignes, leur traitement a donc soulevé très tôt le problème de la réponse moléculaire et cellulaire des tumeurs et des tissus sains des patients NF1 aux radiations et aux drogues de chimiothérapie. Pourtant, de façon surprenante, peu de données sont disponibles et les protocoles expérimentaux sont difficilement comparables, ce qui nous incite à une grande prudence quant à l'interprétation de l'ensemble des données existantes. En effet, depuis trois décennies, la grande majorité des auteurs ont conclu à une réponse normale ces cellules NF1 au rayonnement. Notamment, aucune différence dans la réponse clonogénique (capacité à former des colonies) après traitements aux rayons X entre les cellules des patients NF1 et les témoins radiorésistants. De même, les taux d'aberrations chromosomiques radioinduites des cellules NF1 apparaissent normaux. Pourtant, des études plus récentes révèlent des taux d'apoptose radioinduite et un risque plus important de seconds cancers après traitement de radiothérapie des tumeurs de patients NF1. De plus, il apparaît que les cellules NF1 sont plus radiosensibles quand l'irradiation est étalée (fractionnée) dans le temps. Les données historiques ne peuvent expliquer ces réponses anormales (Tableau 2, Article V).

IV.3.2 But de l'Etape III

Les travaux de l'Etape I ont démontré que les CDBs induites par les rayons X peuvent être également réparées par une mode de réparation dit de *recombinaison* et dépendant de MRE11. L'un des premiers événements de la réparation par recombinaison MRE11-dépendante en G1 est l'action nucléasique (coupure des brins de la séquence choisie) de la protéine MRE11. Tous les syndromes génétiques testés au laboratoire associés à une faible radiosensibilité et à une forte prédisposition au cancer (groupe II) ont montré une réparation par suture quasi-normale (peu de pH2AX foci restant après irradiation) et des taux de foci MRE11 très élevés (Joubert, Gamo et al. 2007). Le but de l'Etape III donc pour but de caractériser la réponse radiobiologique de cellules issues de patients NF1 et, en particulier, de déterminer si le

syndrome NF1 appartient au groupe de maladie de suture normale mais de recombinaison MRE11-dépendante anormale. Pour ce faire, trois lignées fibroblastiques de peau ont été utilisées. Deux d'entre elles provenaient d'un même patient mais les biopsies avaient été réalisées soit dans une région d'apparence normale, soit dans une tache *café-au-lait*. Ce dernier détail permettait d'envisager également dans mon étude si des différences existaient dans la réponse radiobiologique de ces deux types de tissus comme certains auteurs l'avaient suggéré. Nous avons pensé que la caractérisation radiobiologique de l'un des rares syndromes génétiques associés à des gliomes pourrait être utile dans la compréhension de la réponse de ces tumeurs à la radio-chimiothérapie.

IV.3.3 Résultats de l'Etape III

Localisation et expression de la protéine NF1 dans les fibroblastes d'origine différente.

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation et l'expression (intensité lumineuses) spontanées et radioinduites de la protéine NF1 dans des fibroblastes de peau d'origine différente en employant la technique d'immunofluorescence. Un anticorps monoclonal anti-NF1 couplé à un fluorophore vert (fluorescéine FITC) a été utilisé. Dans les fibroblastes témoins 1BR3, NF1 est apparue essentiellement cytoplasmique, avec une expression particulièrement élevée dans le complexe de Golgi. Des signaux NF1 faibles mais significatifs ont été systématiquement observés dans les noyaux, suggérant une localisation nucléaire non-négligeable de la protéine. La localisation et le taux d'expression de NF1 n'ont pas changé profondément après une irradiation aux UV (5 J.m²) ou aux rayons X (2 Gy). Un transport de la protéine du cytoplasme au noyau (*nucleo-shuttling*) a été observé seulement après les doses très élevées de rayons X (15 Gy). Dans les fibroblastes issus de patients NF1, aucune différence n'a été observée en ce qui concerne la localisation même si le niveau d'expression est apparu plus bas. Par contre, dans des fibroblastes issus de patients atteints d'ataxia-telangiectasia (mutations d'ATM) et du syndrome de Nimègue (mutations de NBS1, protéine partenaire de MRE11), le niveau d'expression observé apparut comme sensiblement inférieur à toutes autres variétés de cellule examinées avec une localisation uniquement cytoplasmique. Ces derniers résultats suggèrent donc que :

- 1) la neurofibromatose type 1 n'implique pas nécessairement la disparition physique de la protéine NF1

-
- 2) un taux d'expression et une localisation normale de la protéine NF1 requiert les protéines ATM et NBS1.

Bien que volontairement *très qualitatifs*, ces résultats sont d'importance car la plupart des études moléculaires réalisées sur NF1 ont mis en jeu des lignées cellulaires transfectées dans lesquelles la protéine NF1 était systématique surexprimée.

Réparation des CDB par suture dans les fibroblastes issus de patients NF1.

L'immunofluorescence d'anti-pH2AX a été appliquée aux fibroblastes NF1 après une irradiation à 2 Gy de rayons X suivie par une incubation à 37°C de 0 à 24 h permettant la réparation. Dans les témoins radiorésistants 1BR3, le nombre de foci pH2AX immédiatement après l'irradiation fut de 37 ± 4 soit environ 40 CDBs par Gy par cellule conformément à la littérature. Le nombre de foci pH2AX par cellule diminue avec le temps de réparation. A 24 h, aucun foci pH2AX ne reste, suggérant une réparation complète. De façon intéressante, dans les fibroblastes NF1, le nombre de foci pH2AX par cellule immédiatement après l'irradiation était systématiquement inférieur à celui des témoins 1BR3 (0.8 ± 0.4). Ces résultats seront approfondis dans le chapitre suivant. De plus, les fibroblastes NF1 montrèrent plus de foci pH2AX résiduels à 24 h que les témoins (NF1a: 10.4 ± 2.1 ; NF1b: 12.4 ± 1.43 , NF1c: 8.8 ± 1.2), suggérant une réparation des CDBs plus lente ($p < 0.01$, ANOVA).

Bien que statistiquement significatives à 24 h, les différences entre les cellules NF1 et témoins doivent s'inscrire dans un cadre plus général pour être validées. Récemment, une corrélation quantitative a été obtenue entre les survies clonogéniques à 2 Gy (SF2 : surviving fraction at 2 Gy) et les taux de CDBs non réparées à 24 h sur une collection de lignées fibroblastiques d'origine et de radiosensibilité différente. Une relation inverse existe entre la SF2 et le taux de foci pH2AX résiduels. Les données de NF1 décrites ici obéissent à cette corrélation et suggèrent que la NF1 est une maladie associée à une faible radiosensibilité associée à un défaut de réparation de suture modéré mais significatif.

Les CDBs non réparées qui se propagent tout au long du cycle cellulaire peuvent devenir des fragments chromosomiques irréversiblement endommagés qui sont éjectés en dehors du noyau puis de la cellule au moment de la mitose sous forme de *micronoyaux*. Le taux de micronoyaux a été observé pendant les expériences d'immunofluorescence grâce à la contre-coloration au DAPI qui marquent spécifiquement l'ADN (donc le noyau). Le pourcentage de cellules avec des micronuclei a été trouvé plus élevé dans les cellules NF1 après 2 Gy que dans les témoins 1BR3.

Activité kinases de DNA-PK et ATM dans les fibroblastes issus de patients NF1. Comme décrit ci-dessus, le nombre de foci pH2AX marqués juste après l'irradiation NF1 était systématiquement inférieur dans les fibroblastes à celui des témoins 1BR3. Ces résultats pouvaient suggérer une plus faible activité des kinases responsables de la phosphorylation de H2AX. ATM et DNA-PK sont les deux kinases en question. ATM et DNA-PK ont la propriété de s'autophosphoryler et se relocalisent dans le noyau sous formes de foci (pATM et pDNA-PK, respectivement). La mesure de l'activité de ces kinases peut donc s'effectuer en par immunofluorescence avec des anticorps spécifiques contre l'autophosphorylation.

Dans les témoins 1BR3, une exposition à 2 Gy produit autant de foci le pDNA-PK que de foci pH2AX et disparaissent également avec le même rythme. Ce fut également le cas dans les fibroblastes NF1 où taux de foci pH2AX et de taux pDNA-PK apparaissent et disparaissent au même rythme.

Dans les témoins 1BR3, une exposition à 2 Gy produit immédiatement des foci pATM mais dans un nombre inférieur (43.8 ± 8.1) que celui de pH2AX. Le nombre de foci pATM disparaît progressivement au cours du temps de réparation (33 ± 6.5 à 1 h, 17 ± 3 à 4 h et 2.7 ± 1.4 à 24). Dans les fibroblastes NF1, le nombre de foci pATM produit immédiatement après l'irradiation fut sensiblement inférieur que celui des témoins (NF1a: 1.5 ± 1.5 ; NF1b: 25 ± 5 , NF1c: 15 ± 6.2), suggérant une réparation des CDBs plus lente (Significative pour NF1a et NF1c, $p < 0.01$, ANOVA).

Par contre, on n'a observé aucune différence significative pour les foci pATM résiduels à 24 h. Ces données suggèrent donc que l'activité kinase ATM pourrait être plus faible dans les premières heures qui suivent l'irradiation et pourrait être responsable d'un taux de reconnaissance de CDBs également plus faible. A l'inverse, l'activité DNA-PK semble normale dans les fibroblastes NF1.

La réparation MRE11-dépendante dans les fibroblastes NF1. Il a été montré que la kinase ATM peut phosphoryler un certain nombre de protéines impliquées dans la cascade d'événements moléculaires qui suit une irradiation. C'est notamment le cas de la protéine MRE11, un composant du complexe RAD50-MRE11-NBS1 qui forme des foci nucléaires radioinduits. Comme on l'a dit plus haut, les chercheurs du laboratoire d'accueil ont démontré que la voie de réparation MRE11-dépendante est une alternative à la suture pour les cellules irradiées en G1, c'est-à-dire pour tous les fibroblastes irradiés de cette étude. Les foci MRE11 apparaissent de 2 à 8 h après 2 Gy dans les témoins 1BR3 (maximum à 4 h). De façon

intéressante, les trois lignées fibroblastiques NF1 montrèrent une incidence de foci MRE11 plus (environ 2 h après irradiation) et avec un plus grand nombre des foci (NF1a 20 ± 2 ; NF1b 22 ± 8 ; NF1c 15.5 ± 0.5 vs 1BR3 1.3 ± 0.4 , $p < 0.01$ ANOVA). A 24 h, le nombre de foci MRE11 est également plus grand que dans les témoins 1BR3. Ces résultats soutiennent donc une stimulation plus élevée des voies de réparation de MRE11-dépendantes dans les fibroblastes NF1, suggérant que la présence d'instabilité génomique.

IV.3.4 Conclusions de l'Etape III

Jusqu'à présent, la plupart des études traitant de NF1 soutenaient que ce syndrome prédispose à de nombreuses tumeurs bénignes ou malignes, sans pour autant proposer de véritables modèles moléculaires et cellulaires pour l'expliquer. D'autre part, alors que dans de nombreux syndromes, la prédisposition aux cancers est associée à une forte sensibilité au rayonnement (rayons X pour l'ataxia-telangiectasia, rayons UV pour Xeroderma Pigmentosum), la littérature soutenait une certaine radiorésistance pour NF1, ce qui n'incitait pas les chercheurs à approfondir un rôle possible de NF1 dans la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN. Cependant, différents protocoles expérimentaux furent utilisés pour la survie pour l'évaluation de la radiosensibilité cellulaire des NF1. Par exemple, Mao et al, (Mao, Krone et al. 1985) ont soumis dix lignées fibroblastiques NF1 aux rayons X juste après leur ensemencement : ils ont conclu que la radiosensibilité des cellules NF1 était normale. Inversement, alors qu'Hannan et al. (Hannan, Smith et al. 1990) tiraient la même conclusion avec l'irradiation gamma aiguë (fort débit de dose), ces mêmes auteurs observèrent une radiosensibilité plus élevée dans les fibroblastes NF1 après une irradiation gamma chronique à faible débit de dose (7.8 cGy par minute). Ainsi, tout se passait comme si des taux très faibles de cassures résiduelles n'avaient que peu d'impact sur la létalité en dose unique, mais, en s'accumulant progressivement, ils atteignaient un seuil à partir duquel les cellules devenaient radiosensibles. Pour la première fois, les marqueurs moléculaires pH2AX, pDNA-PK, pATM et MRE11 ont été appliqués à des lignées NF1. En ce qui concerne la suture, c'est également la première fois qu'une analyse par immunofluorescence révèle une déficience faible mais significative de la réparation par suture, probablement liée à une activité kinase ATM insuffisante après les premières heures de la réparation. La protéine NF1, on l'a vu, est essentiellement cytoplasmique. On sait aujourd'hui qu'ATM passe du

cytoplasme au noyau pour intervenir dans la réponse au stress. Ainsi, il est fort probable que la protéine NF1 aide ATM soit à passer dans le noyau, soit à agir conjointement avec elle pour son activation nucléaire. Des investigations plus poussées seront bien entendu nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

Concernant la voie MRE11-dépendante, les cellules NF1 sont caractérisées par une activité anormale, suggérant fortement une grande instabilité génomique qui pourrait expliquer (enfin) la forte prédisposition au cancer du syndrome NF1. Dans le cadre des études systématiques de la réponse radiobiologique des cellules humaines, les chercheurs du laboratoire d'accueil ont défini un groupe de syndrome (Joubert, Gamo et al. 2007) caractérisé par :

- 1) une radiosensibilité faible mais significative accompagnée de l'absence de ou d'un faible défaut de suture
- 2) une forte prédisposition au cancer accompagnée de taux élevés de foci MRE11

Comme des taux élevés de foci MRE11 révèlent une activité nucléasique importante, de nombreuses cassures simple et double-brin contribuent à débobiner la chromatine, donnant ainsi une taille impressionnante aux noyaux des cellules de ces syndromes : ce fut exactement le cas pour les cellules NF1 dont les noyaux apparurent énormes lors des analyses par immunofluorescence.

Ainsi, nos résultats suggèrent très fortement que la neurofibromatose de type 1 appartienne à ce groupe de syndromes ce qui donnerait des éléments de réponse concernant la réponse aux radiations ainsi que la prédisposition aux cancers, qu'ils soient bénins ou malins.

IV.4 Etape VI : Modulation de la réparation par suture et par la recombinaison MRE11-dépendante par les inhibiteurs de tyrosine kinases dans les tumeurs cérébrales.

Afin de rappeler les enjeux de l'Etape IV, rappelons brièvement les acquis des deux premières étapes:

- l'étape I a permis de mettre en évidence que le double test pH2AX-MRE11 a un vrai caractère prédictif pour la radiosensibilité.
- l'étape II a mis en exergue la fréquence des dysfonctionnements de BRCA1 dans les gliomes. De façon intéressante, de nombreuses études montrent que la protéine BRCA1 est essentielle pour une réponse normale au cisplatine, l'une des drogues chimiothérapeutiques les plus utilisées. En parallèle, BRCA1 apparaît également comme un inhibiteur naturel de nombreuses tyrosine kinases comme tels que c-Abl (Foray, Marot et al. 2002) ou autres (Tableau 14, Chapitre III.3.2).

Aujourd'hui, il existe plus que 90 protéines inhibitrices de tyrosine kinases déjà testées sur plusieurs types de cancers. Le principe d'action de ces drogues est de bloquer les voies de prolifération ou de rendre les cellules plus sensibles aux thérapies génotoxiques. Nous nous proposons donc de tester les drogues les plus utilisées.

IV.4.1 Quelles étaient les drogues inhibitrices de tyrosine kinases qui mériteraient d'être testées ?

Dans un premier temps, le choix des drogues inhibitrices de tyrosine kinase s'est porté sur des composés chimiques non-utilisés dans les traitements mais connus des biologistes. Nous avons ensuite concentré nos efforts sur les produits pharmaceutiques commercialisés. La fusion des gènes BCR et Abl confère de fortes prédispositions aux leucémies myéloïdes chroniques (de Klein, van Kessel et al. 1982). De plus, c-Abl, tyrosine kinase portant les domaines consensus SH3 et SH3, est une tyrosine qui peut, sous l'effet d'un stress génotoxique passer du cytoplasme au noyau (Yoshida and Miki 2005). A ce titre, la protéine c-Abl est partenaire de BRCA1 (Foray, Marot et al. 2002). L'une des drogues inhibitrices des protéines de la famille Abl est l'imatinib (Glivec®) (Druker, Tamura et al. 1996). Toutefois, la spécificité de son action pour la seule activité de c-Abl a été récemment remise en cause (Rubin, Singer et al. 2001). A l'inverse, l'erbstatine analogue complémente l'action de BRCA1

dans son inhibition de l'activité kinase de c-Abl (Kawada, Tawara et al. 1993). Comme l'erbstatine analogue a été utilisée précédemment dans l'étude des interactions entre BRCA1 et c-Abl, nous l'avons préféré, dans un premier temps, à l'imatinib.

En parallèle de l'erbstatin analogue, la genisteine est un des inhibiteurs de tyrosine kinases les plus efficaces bien que son action soit moins spécifique que l'erbstatin analogue (Peterson 1995). Notamment, l'action inhibitrice de la genisteine a été démontrée sur EGFR qui est une cible favorite des scientifiques et de l'industrie pharmaceutique. Il a été trouvé récemment, que la genisteine inhibe la prolifération des tumeurs du sein BRCA1 mutées (Tominaga, Wang et al. 2007), augmente l'expression certaines gènes impliqués dans la signalisation BRCA1/BRCA2 dépendante (Darbon, Penary et al. 2000; Fan, Meng et al. 2006) et que son activité est hautement ATM-dépendante (Ye, Goodarzi et al. 2004).

Les mutations de BTK (Bruton tyrosine kinase) sont responsables de la maladie de Bruton, associée à une forte immunodéficience (Ochs and Smith 1996). Des recherches en cours dans notre laboratoire d'accueil ont montré que la maladie de Bruton faisait partie des syndromes du groupe II avec une radiosensibilité non négligeable, une déficience modérée de la suture et un sursaut de l'activité radioinduite de MRE11 (Joubert, Gamo et al. 2007). La molécule LFM-A13 est l'un des rares inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase BTK (Mahajan *et al.*, 1999). Il a été montré récemment une efficacité dans les tumeurs du sein Her2 positives et une toxicologie *in vivo* favorable (Mahajan, Ghosh et al. 1999; Uckun, Dibirdik et al. 2007).

La quercétine a été la première drogue ciblant une activité tyrosine kinase (tyrphostines) testée en phase I (Ferry, Smith et al. 1996). Cependant, une fois encore, l'action de la quercétine n'est pas spécifique aux tyrosine kinases (Izzard, Jackson et al. 1999). Par exemple, il a été démontré que cette drogue inhibe l'action des œstrogène récepteurs II (Piantelli, Maggiano et al. 1995) et des protéines de choc thermique (HSP) qui jouent un rôle important dans la signalisation de nombreux types de stress (Koishi, Hosokawa et al. 1992). Toutes les molécules décrites sont des composés chimiques et ne sont pas utilisés dans la clinique.

Le sunitinib (Sutent®) est un inhibiteur de multiples cibles à tyrosine kinases associées à la prolifération cellulaire et à l'angiogenèse comme PDGFR, VEGFR et le FLT3 (fms-related tyrosine kinase/Flk2/Stk-2) (O'Farrell, Abrams et al. 2003). Le serafenib (Nexavar®) est également un inhibiteur non spécifique mais qui ciblerait plutôt le Raf-1 (la voie de RAF/MAPK/ERK) ainsi que la famille des facteurs de croissance VEGFR-2 VEGFR-3. Enfin, l'erlotinib (Tarceva®) est un traitement avec une efficacité impressionnante sur les

tumeurs EGFR positives (Bos, Mendelsohn et al. 1997). Plusieurs études ont montré une relation positive entre le niveau d'expression de l'EGFR et la résistance à la radiothérapie (Sheridan, O'Dwyer et al. 1997). Les glioblastomes sont les cibles potentielles pour ce traitement, car plus de 40 % de ces tumeurs expriment l'EGFR (Salomon, Brandt et al. 1995).

IV.4.2 Quels sont les modèles cellulaires les plus pertinents pour tester l'efficacité des traitements combinés ?

Dans le cadre de l'Etape II, nous avons pu classer les différentes lignées de gliomes humaines mises à notre disposition suivant la fonctionnalité de la protéine BRCA1. Le statut de BRCA1 semblait particulièrement important pour la réponse au cisplatine. Par contre, concernant son influence sur la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinases, peu de données existent. En revanche il y a plus d'études sur la potentialisation de l'effet de la radiothérapie si elle est accompagnée par les inhibiteurs de tyrosine kinases (McKenna and Muschel 2003). Il était donc impératif de tester les traitements combinés sur des lignées cellulaires montrant des statuts fonctionnels de BRCA1 différents. Nous avons délibérément choisi les lignées U87 (BRCA1 positif), U118 (BRCA1-négatif) et U373 (BRCA1 négatif) pour leur capacité à proliférer chez la souris nude. Ce choix nous permettra ainsi à long terme de vérifier nos hypothèses dans le cadre de tests précliniques sur ces modèles animaux.

IV.4.3 Choix du protocole expérimental

Concernant les irradiations effectuées avec un irradiateur médical classique (200 kV, rayons X), nous nous sommes proposés de mesurer systématiquement le nombre de foci pH2AX après un prétraitement d'inhibiteur de tyrosine kinase et/ou de cisplatine suivi par une irradiation à 2 Gy puis une incubation de 24 h permettant la réparation. Le nombre de foci MRE11 est mesuré 4 h post-irradiation, comme le suggère l'article II. Vu le nombre important de drogues différentes (9), il faut noter que nous n'avons testé qu'une seule concentration par drogue, estimée après quelques expériences préliminaires et d'après les résultats déjà publiés de la littérature. Concernant la photoactivation du cisplatine combiné à des inhibiteurs de tyrosine kinases, l'énergie d'irradiation de 78.8 keV, correspondant à une énergie légèrement supérieure au seuil K du platine a été délivrée par le synchrotron de Grenoble dans des conditions de PAT-Plat déjà décrites (Corde, Balosso et al. 2003; Biston, Joubert et al. 2004).

IV.4.4 Description de la réponse pH2AX sur les lignées humaines U87, U118 et U373

Les nombres de foci pH2AX 24 h après une dose de 2 Gy sont conformes à ceux décrits dans l'article IV. Nous rappelons qu'U87 montre une réparation par suture très efficace, qu'U118 a un défaut de suture particulièrement marqué alors qu'U373 présente une situation intermédiaire.

Effets du cisplatine seul (Figure 18A): Après irradiation des cellules soumises à un prétraitement au cisplatine, une légère augmentation du nombre de foci pH2AX a été observée pour toutes les lignées bien que celle-ci ne soit pas significative. Le cisplatine bloque le coulisement des protéines Ku sur l'ADN ce qui entraîne une déficience en réparation par suture. Cependant, comme ces expériences ont été effectuées sur des cellules en croissance, il n'est pas impossible que les effets du cycle cellulaire limitent la portée de l'action du cisplatine. D'autre part, il faut noter qu'U87 est très radiorésistante et possède un statut BRCA1 normal suggérant également une forte résistance au cisplatine. D'autre part, les taux de foci pH2AX de la lignée U118 sont très élevés et une inhibition supplémentaire de la suture est difficile à envisager. C'est justement U373 qui montre une situation intermédiaire et l'augmentation relative de foci pH2AX la plus importante.

Effets des drogues inhibitrices seules: Quand l'irradiation suit un prétraitement des cellules avec des drogues inhibitrices, les réponses deviennent clairement spécifiques des lignées testées et des drogues utilisées.

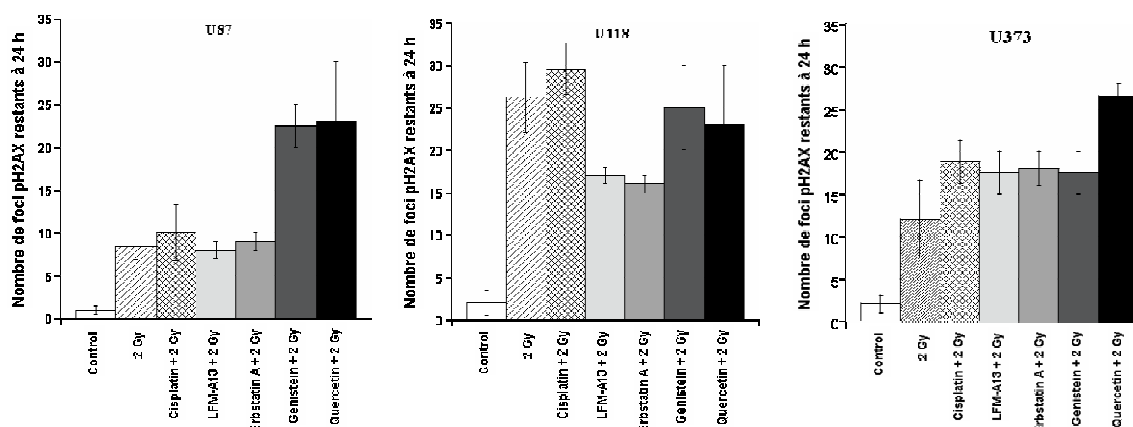
Actions de LFM-A13 et de l'erbstatine analogue (Figure 18A): Pour la lignée U87 (radiorésistante avec statut fonctionnel de BRCA1 normal), le prétraitement avec LFM-A13 et avec l'erbstatin analogue n'induit aucune synergie par rapport à l'irradiation seule. C'est également le cas pour la lignée U373 et on note même des effets négatifs pour les deux drogues avec U118.

Actions de la génistéine et de la quercétine (Figure 18A): Pour U87, le prétraitement à la génistéine et à la quercétine double le taux de foci pH2AX résiduels à 24 h suggérant une implication forte de l'action de ces drogues dans la réparation par suture. C'est le cas pour U373 uniquement avec la quercétine (on passe de 17 à 25 foci pH2AX par cellule). A l'inverse, pour U118, l'usage des deux drogues a un impact comparable à l'effet du cisplatine ou de l'irradiation seule.

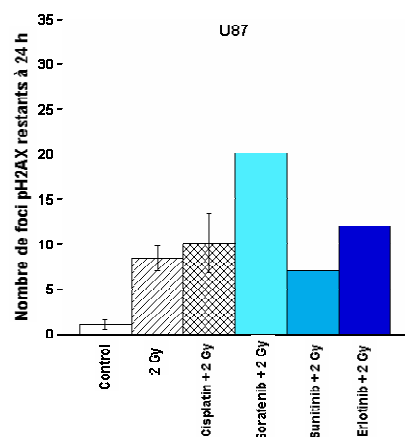
Actions de l'erlotinib, du sunitinib et du sorafenib (Figure 18B): Ces trois drogues n'ont été appliquées que sur U87: Seul le sorafenib double le nombre de foci pH2AX mettant l'effet de cette drogue au même niveau quantitatif que la génistéine et la quercétine.

Actions de LFM-A13, de la erbstatine analogue et de la quercétine en conditions de la photoactivation du cisplatine par le rayonnement synchrotron (PAT-Plat) (Figure 18C) n'ont pas donné des dommages supplémentaires pas rapport à la PAT-Plat seule.

A



B



C

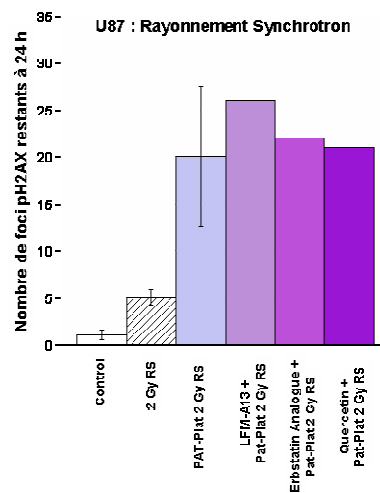
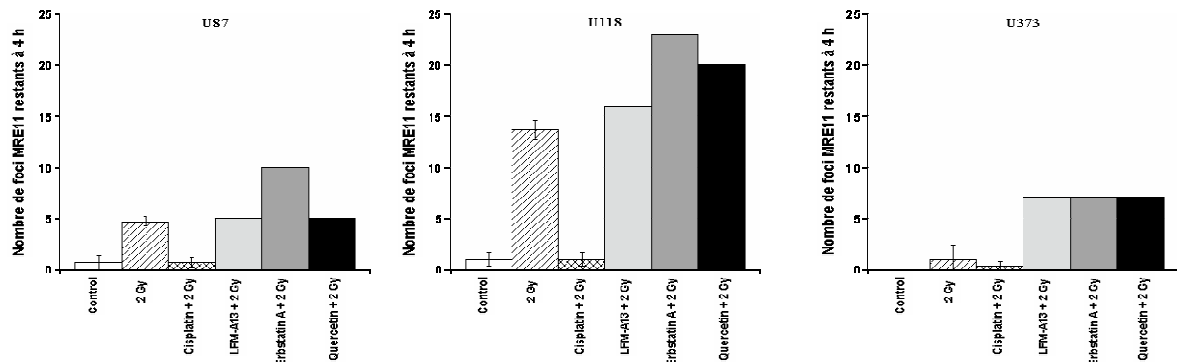


Figure 18 : La modulation de la réparation par suture, les CDB sont marquées par pH2AX dans les trois lignées gliomales U87, U118, U373. (A, B) Avant l'irradiation au générateur des rayons X classique (2 Gy) ou (C) par le rayonnement synchrotron en conditions PAT-Plat (2 Gy), les cellules sont prétraitées pendant 4 h par le cisplatine ou par les inhibiteurs des tyrosine kinases. Les concentrations des drogues sont marquées dans le Tableau 14, Chapitre III.3.2.

IV.4.5 Description de la réponse MRE11 sur les lignées humaines U87, U118 et U373

Le nombre de foci MRE11 4 h après irradiation a été également analysé. Considérant que le nombre de 2-7 foci MRE11 par cellule représente une fenêtre normale, nous avons analysé les effets des mêmes prétraitements décrits plus haut. Les nombres de foci MRE11 4 h après une dose de 2 Gy sont conformes à ceux décrits dans l'article IV. Nous rappelons qu'U87 montre une activité MRE11 normale. Pour U118, le nombre de foci MRE11 est trois fois plus haut que la normale alors que celui relatif à U373 est anormalement bas (Figure 19A).

A



B

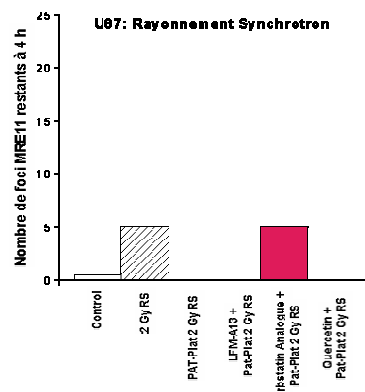


Figure 19 : La réparation MRE11-dépendante des CDB dans les trois lignées des tumeurs cérébrales U87, U118, U373. (A) Avant l'irradiation au générateur des rayons X classique (2 Gy), ou (B) par le rayonnement synchrotron en conditions PAT-Plat, les cellules sont prétraitées pendant 4 h par le cisplatine ou par les inhibiteurs des tyrosine kinases. Les foci MRE11 n'ont pas été détectés après la PAT-Plat seule ou après la PAT-Plat combiné avec le LFM-A13 ou avec la genisteine.

Effets du cisplatine seul: D'une façon surprenante, le prétraitement au cisplatine réduit presque à néant le nombre de foci MRE11 après 4h (Figure 19A).

Effets des drogues inhibitrices seules: De la même façon que le montrent les données pH2AX, quand l'irradiation suit un prétraitement des cellules avec des drogues inhibitrices, les réponses de MRE11 deviennent clairement spécifiques des lignées testées et des drogues utilisées. Pour U87, seule l'erbstatine analogue double le taux de foci MRE11. L'action du LFM-A13 et de la quercétine est comparable à une irradiation seule. Pour U373 et pour U118, ces trois drogues ne montrent aucune action significative par rapport à la normale mais augmentent significativement le taux de MRE11 par rapport à l'action de l'irradiation appliquée séparément (Figure 19A). Un seul essai en combinaison de la photoactivation du cisplatine par le rayonnement synchrotron et LFM-A13, l'erbstatine analogue et la quercétine n'ont pas donné des foci MRE11 (sauf l'erbstatine), ce que nous expliquons par l'effet inhibiteur du cisplatine sur la formation des foci MRE11 (Figure 19B).

IV.4.6 Conclusions préliminaires

Il apparaît une très nette spécificité des réponses suivant le modèle cellulaire de statut BRCA1 différent et la nature de la drogue inhibitrice. Les meilleurs résultats sont enregistrés pour U87 avec la quercétine, l'erbstatine analogue et le soresfenib qui semblent toutes trois accroître le nombre de CDBs à réparer. Cela reste également le cas pour U373 avec la quercétine. Par contre, pour U118, le cisplatine apparaît pleinement comme le meilleur des prétraitements avant l'irradiation, comme si, plus le statut fonctionnel de BRCA1 est endommagé, plus le bénéfice de l'utilisation du cisplatine est important. Enfin, les taux de foci MRE11 apparaissent relativement bas pour les deux lignées U87 et U373 alors que pour U118, il est fort probable que la déficience en suture soit telle qu'elle entraîne une compensation massive de la recombinaison MRE11-dépendante.

V DISCUSSION

V.1 Etape I : Nouvelles notions de radiobiologie.

L'Etape I de cette thèse concernait les notions nouvelles de radiobiologie, notamment la mise en évidence d'une nouvelle voie de réparation des CDBs en G1 dépendant de la protéine MRE11. J'ai participé activement en tant que co-auteur aux publications concernant cette Etape qui constituait un programme de recherche de grande ampleur dans le laboratoire où j'ai passé ma thèse. Ces publications représentent *la base conceptuelle et technique* de mes travaux. En effet, l'analyse radiobiologique des gliomes humains et de rongeurs, celle des fibroblastes issus de la neurofibromatose et de celle de l'action des inhibiteurs de tyrosine kinases a bénéficié de ces acquis innovants : des réponses originales ont donc été ainsi apportées.

L'Etape I se basait sur trois constats :

- des artefacts techniques de chevauchement peuvent exister lors de la co-immunofluorescence, notamment quand le couple FITC-TRITC d'une part et le marqueur pH2AX d'autre part, sont utilisés. *Ces observations posent le problème des surinterprétations des résultats acquis par co-immunofluorescence.*

- certains syndromes génétiques montrent une radiosensibilité modérée mais significative en G1 et sont caractérisés par des taux faibles de foci pH2AX résiduels. *Ces observations posent le problème de la détection et de la prédiction des faibles radiosensibilités.*

- ces mêmes syndromes associés à une radiosensibilité modérée peuvent montrer des survies clonogéniques radioinduites et des déficiences de réparation *quantitativement* identiques alors qu'ils sont causés par la mutation de gènes différents. *Ces observations posent le problème de l'existence d'une corrélation entre survie et défauts de réparation qui serait valable quel que soit le gène considéré.*

V.1.1 Le problème des surinterprétations des résultats acquis par co-immunofluorescence.

Des artéfacts techniques de chevauchement (*bleed-through*) peuvent entacher l'interprétation des résultats acquis par co-immunofluorescence. En particulier les co-immunofluorescences entre pH2AX et MRE11 sont pour la plupart erronées (voir tableau 1 de l'article I) et ont longtemps influencé les modèles de réparation les plus consensuels. Ainsi, de nombreux chercheurs ont évoqué la colocalisation des foci radioinduits pH2AX et MRE11 pour soutenir l'hypothèse que MRE11 participe à la réparation par suture. Comme l'un des rares exemples de non-colocalisation est donné par la co-immunofluorescence de MRE11 avec RAD51, indispensable pour la recombinaison homologue, il n'en fallait pas moins pour classer définitivement MRE11 dans le groupe des protéines de suture. Pourtant, l'activité nucléasique du complexe MRE11-RAD50-NBS1 intriguait. Le terme de *micro-homology end-joining* fut proposé pour désigner un sous-groupe dans lequel MRE11 participait effectivement à un certain type de suture requérant clivage et analogies de séquences d'au moins 50 bp (Paull and Gellert 2000). Cependant, le fait que certaines radiosensibilités en G1 n'étaient pas le résultat d'un défaut de suture (voir point suivant) contredit cette théorie. Ainsi, on voit combien la meilleure connaissance des limites d'une technique est importante dans l'exploitation des données. Il faudra encore du temps pour ré-analyser l'ensemble des données de co-immunofluorescence de la littérature afin de déterminer si le phénomène de chevauchement concerne d'autres conclusions importantes de la radiobiologie. Concernant la protéine BRCA1 qui joue un rôle central dans notre travail, il n'est justement pas impossible que certains résultats de co-immunofluorescences et cinétiques de colocalisation de BRCA1 avec MRE11, RAD50, BRCA2, RAD51, etc... publiées antérieurement à ce travail aient pu être biaisées par le *bleed-through* phénomène. Ce sera sans doute le sujet d'une autre publication.

V.1.2 Le problème de la détection et de la prédiction des faibles radiosensibilités

Certains syndromes génétiques montrent une radiosensibilité modérée mais significative en G1 mais sont caractérisés par des taux faibles de foci pH2AX résiduels, suggérant l'absence d'un défaut de suture (article II). C'est notamment le cas de certains

groupes de Xeroderma Pigmentosum et des syndromes de Cockayne, Bloom et Fanconi. Ainsi, le marqueur pH2AX ne peut être considéré comme un test prédictif universel pour la réponse clonogénique après irradiation, contrairement à ce que beaucoup de chercheurs pensaient (Joubert and Foray 2007). Inversement, de tels radiosensibilités en G1 ne pouvaient être expliquées par une dysfonction de la recombinaison homologue dépendante de RAD51 puisque cette protéine n'est active que de S à G2/M. De telles constatations suggéraient donc l'existence d'une troisième voie de réparation, alternative à la suture en G1. Une telle voie influencerait la radiosensibilité si elle était endommagée. L'observation que les foci MRE11 étaient soit systématiquement absents soit plus nombreux que la normale nous a incité naturellement à proposer un modèle innovant avec une nouvelle voie de recombinaison dépendante de MRE11 et active en G1 (article II). De façon intéressante, la suractivité nucléasique de MRE11 observée dans les syndromes cités plus haut conduit à la formation de cassures simple-brin spontanées nombreuses, pouvant entraîner une décondensation de la chromatine. Un tel phénomène se reflète notamment dans une taille de noyau plus grande que la normale (Puvion-Dutilleul and Sarasin 1989). D'autre part, l'implication de la recombinaison dépendante de MRE11 dans la réponse à certaines drogues alkylantes peut également entraîner une certaine chimiosensibilité. Ainsi, toute étude radiobiologique présentée dans cette thèse a mis en œuvre une mesure systématique des foci pH2AX mais aussi des foci MRE11. Dans le cas des gliomes humains (Article IV), bien que les investigations sur MRE11 soient inédites pour ce genre de tissus, le taux de foci MRE11 semble confirmer celui des foci pH2AX. Par contre, dans le cas de la neurofibromatose, l'immunofluorescence MRE11 a révélé des foci MRE11 plus nombreux et d'apparition plus précoce, confirmant un défaut de suture faible mais significatif (article V). Comme on le verra plus loin, ces résultats permirent de classer la neurofibromatose type I dans le groupe des syndromes précités avec notamment une taille des cellules impressionnante. Dans le cas de l'étude comparative des inhibiteurs de réparation, l'étude sur MRE11 prend toute son importance puisqu'il est justement question de réponse à la chimiothérapie. En conclusion, tous nos résultats montrent la complémentarité et donc la nécessité du double test pH2AX et MRE11 dans l'étude des réponses moléculaires et cellulaires au stress génotoxique et notamment dans le cas des faibles radiosensibilités.

V.1.3 Existence d'une corrélation quantitative entre survie et défauts de réparation indépendante de la nature du gène muté.

Certains syndromes associés à une radiosensibilité modérée peuvent montrer des survies clonogéniques radioinduites et des déficiences de réparation quantitativement identiques alors qu'ils sont causés par la mutation de gènes différents : certaines réponses cliniques à la radio- et /ou chimiothérapie pourraient donc être communes à des affections très diverses. Ainsi la recherche d'une corrélation quantitative entre survie et déficience de réparation indépendante des gènes mutés se justifie. Que nous apprend l'article II ? A partir des quarante lignées fibroblastiques analysées, la radiosensibilité intrinsèque paraît avoir des limites inférieures et supérieures. En effet, les SF2 sont systématiquement comprises entre 1 et environ 72% (*figure 7 de l'Article II*). On peut alors parler de *radiorésistance maximale* comme s'il y avait toujours des cellules stériles (est-ce dû à la culture de cellules ?) et une *radiosensibilité maximale* comme s'il y avait toujours des cellules survivantes (est-ce dû à l'hétérogénéité de l'exposition aux radiations ?). A l'intérieur de ces deux limites, on retrouve trois groupes de radiosensibilité significativement distincts : 1) Les lignées radiorésistantes couvrent une gamme de SF2 comprises entre 45 et 72 %. 2) Les lignées provenant de syndromes associés à de faibles radiosensibilités mais à de forte prédisposition (ex: anémie de Fanconi, syndrome de Bloom, certaines formes de *xeroderma pigmentosum*) montrent des SF2 comprises entre 7 et 45%. 3) Les lignées très radiosensibles - c'est le cas des lignées déficientes en suture et de celles provenant de patients atteints d'*ataxia telangiectasia* -, montrent des SF2 comprises entre 1 et 7%). En plaçant sur une même courbe SF2 et les pourcentages de CDBs non réparées mesurés par électrophorèse en champs pulsés ou par immunofluorescence pH2AX, une relation inverse apparaît suggérant que *moins la cellule répare, plus elle est radiosensible (figure 7)*. La survie clonogénique après irradiation semblerait donc liée au nombre de CDBs non-réparées d'une façon inversement proportionnelle. Cette corrélation est également vérifiée pour les cassures chromosomiques non réparées. Ces résultats montrent qu'il suffit de 1.2 ± 0.6 cassures chromosomiques ou de 3.5 ± 1.5 CDBs par cellule humaine pour produire un événement létal. Cette corrélation établie sur des fibroblastes humains est valable quelles que soient les mutations génétiques. Obtenue sur des lignées fibroblastiques humaines cette corrélation reste également valable pour d'autres types cellulaires (lymphocytes, cellules endothéliales, etc...) ainsi que pour les tumeurs. On remarquera seulement que certaines tumeurs peuvent paraître encore plus radiorésistantes (mais pas plus radiosensibles) et réparer plus vite les CDBs que les

fibroblastes humains. En ce qui concerne les cellules de mammifères, des lignées provenant du bœuf, du cheval ou du singe obéissent aussi à cette corrélation. C'est le cas également des mutants hyperradiosensibles de rongeurs : il est donc aujourd'hui possible de prédire quantitativement la radiosensibilité intrinsèque issue de n'importe quelle situation à partir de la mesure du rythme de réparation des CDBs (article II).

V.2 Etape II : Mise en évidence d'altérations fonctionnelles de BRCA1 dans les gliomes

L'étape II concernait les deux études menées à la fois sur les modèles de gliomes de rongeurs et les lignées humaines mises à notre disposition. La mise en évidence de certaines dysfonctions de BRCA1 dans les gliomes est tout d'abord issue d'une approche systématique consistant à tester sur toutes les lignées gliomales la fonctionnalité de la plupart des substrats de phosphorylation d'ATM comme pH2AX, pDNA-PK, MRE11, RAD51, CHK1, CHK2, p53 et c-jun. Il faut d'ailleurs noter qu'une fois encore, une telle approche innovante et libre des modèles prévalents, a permis de mettre en évidence des résultats originaux (Foray, Marot et al. 2003). En effet, il faut insister sur trois constats :

- les marqueurs moléculaires considérés jusqu'à présent pour la recherche de *signatures spécifiques aux gliomes* étaient toujours des acteurs de la prolifération et du contrôle du cycle et non de fonctions biologiques plus en amont.

- la fréquence des dysfonctions de BRCA1 dans les gliomes pourrait poser la question du *rôle de BRCA1 dans la gliomagénèse*.

- mettre en évidence des dysfonctions de BRCA1 dans les gliomes est d'importance pour la réponse de ceux-ci *aux traitements radio-chimiothérapeutiques* puisque cette protéine y est naturellement impliquée.

V.2.1 A la recherche d'une signature moléculaire pour les gliomes

Les caractéristiques radiobiologiques de 8 lignées de gliomes humaines et 3 lignées de rongeurs ont été examinées dans cette thèse. Alors qu'un large un spectre de capacité de réparation des CDBs a été observé, la protéine BRCA1 a été trouvée fonctionnellement altérée dans une proportion non négligeable de lignées, quelle que soit l'espèce considérée.

Evidemment, vu le nombre relativement faible de lignées testées, la statistique nous incite à la prudence quant à la généralisation d'une telle conclusion. Cependant, il est intéressant de s'interroger sur les raisons pour lesquelles ce type de données n'a pas été obtenu plus tôt. Dans un premier temps, nous pensons que l'approche qui consiste à analyser systématiquement la fonctionnalité des substrats d'ATM dans un type de tissu tumoral donnée est récente, simplement parce que la notion de cascades de phosphorylations post-stress est encore peu répandue dans la communauté scientifique et que les premiers modèles ne datent que de quelques années (Foray, Marot et al. 2003). La deuxième raison, plus logique, est que les protéines BRCA1 et BRCA2 évoquent naturellement plutôt les cancers du sein et de l'ovaire que les gliomes. En effet, les mutations hétérozygotes de ces deux protéines sont respectivement les causes majeures de syndromes familiaux de cancer du sein et de cancers sein+ovaire, respectivement (Gudmundsdottir and Ashworth 2006). Pourtant, probablement comme conséquence des deux raisons précédentes, il faut admettre que les recherches sur les signatures moléculaires spécifiques aux gliomes se sont focalisées essentiellement sur les acteurs de la prolifération en général. Nous avons d'ailleurs résumé dans l'Introduction de cette thèse toutes les voies étudiées. C'est le cas notamment des voies de transduction du signal (voie EGFR/PDGFR, voie Ras/MAPK ; PI3-Kinase/PTEN) et les voies du contrôle du cycle cellulaire (voie p16-CDK4-RB et voie p14ARF-MDM2-p53) (voir chapitre I). De façon intéressante, toutes ces protéines visées sont des partenaires de BRCA1. De plus, les acteurs principaux de ces voies jouent le rôle de gardiens du contrôle du cycle (« gatekeeper ») plutôt que gardiens de l'intégrité génomique (« caretakers »). Ainsi, il n'est pas impossible que les dysfonctions de BRCA1 observées dans la plupart des lignées testées soient la cause et non la conséquence de perturbations dans les voies précitées. D'autres études plus ciblées sur chacune des voies en question sont donc évidemment nécessaires pour documenter cette hypothèse. Cependant, il faut encore insister sur un point important déjà évoqué dans les articles : nous avons focalisé nos efforts sur la recherche des *dysfonctions* de BRCA1 et notamment sur l'absence de sa phosphorylation par ATM et non pas sur *l'analyse des séquences* de gène dans chacune des lignées. En effet, vu l'hétérogénéité caractéristique des tumeurs, il nous paraissait vain de déterminer les séquences de gène dans ces tissus par définition instables. La protéine BRCA1 agit en amont des principales voies évoquées, ce qui donne un caractère plus étendu à nos conclusions. Il faut cependant noter que l'absence de phosphorylation de BRCA1 peut être causée par une activité kinase d'ATM diminuée. Ainsi, il ne faut pas négliger la possibilité que certains gliomes soit notamment associés à des mutations hétérozygotes de la protéine ATM (voir aussi section suivante). Ces conclusions

posent alors la question suivante : les dysfonctions de BRCA1 sont-elles responsables de la genèse des gliomes ?

V.2.2 Rôle possible de BRCA1 dans la gliomagénèse

Jusqu'ici, deux modèles de formation de gliomes ont été proposés: la génération de gliomes serait le résultat :

- soit d'une grande instabilité génomique voire d'une différenciation non contrôlée
- soit d'une transformation rapide de quelques cellules tumorales dites souches préexistantes (chapitre I).

Dans le cadre de ces deux théories, il paraît clair que les dysfonctions de BRCA1 mises en évidence dans cette thèse s'inscrivent naturellement dans le cadre de la première hypothèse. Peu après sa découverte, BRCA1 a été considéré comme suppresseur de tumeur et une somme considérable de données ont été accumulées pour caractériser la relation entre mutations de BRCA1 et phénotypes des cancers héréditaires du sein : la très grande majorité des cancers héréditaires du sein sont causés par des mutations de BRCA1 (Honrado, Osorio et al. 2006). Cependant, l'action de BRCA1 n'est pas nécessairement limitée aux cancers du sein. BRCA1 est fortement exprimée dans les tissus hormono-dépendant comme le sein, l'ovaire et la prostate. Pour les autres tissus, les expériences d'adénovirus ont précisé le rôle antiprolifératif potentiel de BRCA1 dans des malignités de poumon et du colon. Mais d'autres données s'accumulent progressivement reliant des mutations de BRCA1 avec de fortes incidences de cancers colorectaux (Marot, Opolon et al. 2006). Concernant les tumeurs cérébrales, l'analyse de la littérature historique fournit encore moins de données. Pourtant récemment, une étude systématique de l'Institut Gustave Roussy a révélé que 67% des porteurs de mutations BRCA1 développent des métastases cérébrales avec une médiane d'apparition d'environ 8 mois après le diagnostic. Les auteurs de cette même étude insistent d'ailleurs sur le fait que les tumeurs cérébrales issues de patients BRCA1-mutés sont particulièrement résistants aux traitements anti-cancer et notamment dans les cas (30-40%) où la tumeur surexprime Her2 (Albiges, Andre et al. 2005). En conclusion, les dysfonctions de BRCA1 observées dans les gliomes suggèrent le caractère universel (quelque soit la nature du tissu) de la fonction de suppresseur de tumeur de cette protéine. L'importance d'une telle hypothèse, si elle est vérifiée, amène deux questions : 1) quelles sont les conséquences pratiques des dysfonctions de BRCA1 pour les traitements anti-gliomes ? (voir section suivante) 2) cette hypothèse est-

elle vérifiée également dans les tissus du système nerveux périphérique ? (voir chapitre suivant).

V.2.3 Conséquences de dysfonctions de BRCA1 dans les traitements radio-chimiothérapeutiques des gliomes

Comme on l'a vu dans les articles III et IV, BRCA1 est plus impliqué dans la réponse aux drogues chimiothérapeutiques, notamment les agents alkylants, plutôt que dans la réponse aux radiations. BRCA1 est particulièrement impliqué dans la réparation des adduits de l'ADN. Un exemple représentatif de drogue chimiothérapeutique qui requière une protéine BRCA1 fonctionnelle est le cisplatine (Scully, Xie et al. 2004). Les mutations de BRCA1 confèrent une très forte sensibilité au cisplatine. Dans le cadre de nos résultats, les dysfonctions de BRCA1 n'affectent pas de manière significative sur la réponse aux radiations puisqu'une telle protéine n'est pas exigée dans le processus de NHEJ, la voie principale de réparation de CDBs. Cependant, les dysfonctions de BRCA1 sont susceptibles d'être responsables de l'hétérogénéité des tumeurs, notamment en augmentant l'instabilité génomique. Cette conséquence consoliderait alors les conclusions de A. Taghian qui soutient que la SF2 *in vitro* n'est pas un bon facteur prédictif de la radiocurabilité des gliomes (Taghian, Suit et al. 1992; Taghian, Ramsay et al. 1993). De plus, une protéine BRCA1 altérée empêche plutôt qu'elle ne stimule le phénomène d'apoptose, qui n'est donc pas non plus un facteur prédictif de la radiocurabilité des tumeurs. A l'inverse, la réponse des modèles de gliomes testés au cisplatine semble être BRCA1-dépendante, comme dans n'importe quel autre tissu. Dans des gliomes BRCA1-positifs, un prétraitement au cisplatine produit une synchronisation significative dans la phase de synthèse qui est radiorésistante, limitant donc ainsi l'avantage potentiel de la combinaison radiation-cisplatine. A l'inverse, dans les gliomes où la fonction de BRCA1 est altérée, le succès d'une combinaison radiation-cisplatine est plus probable, même si elle demeure dépendante de la capacité de réparation de CDBs radioinduites. Pourtant, les traitements anti-gliomes impliquant le cisplatine sont aujourd'hui toujours un échec. Il faut cependant noter que la très grande majorité des études *in vivo* ont été effectuées avec une administration intraveineuse de cisplatine alors que le cisplatine est plus efficace une fois injecté localement (Sheleg, Korotkevich et al. 2002). Nos conclusions encouragent donc le développement de l'injection intra-crânienne de cisplatine, notamment

dans des tumeurs où BRCA1 est altérée. La pertinence d'une telle hypothèse est notamment illustrée par le succès du traitement de PAT-Plat appliqué aux rats porteurs de gliomes F98 où BRCA1 n'est pas fonctionnelle et dans lequel le cisplatine a été injecté intracérébralement (Corde, Balosso et al. 2003; Biston, Joubert et al. 2004). A l'inverse, il apparaît plus hasardeux d'appliquer un tel traitement au modèle 9L, BRCA1-positif (Revue I). A ce stade de réflexion, on peut donc poser pour le cisplatine le même genre de question qu'avec les signatures moléculaires : pourquoi n'avait on pas pensé jusqu'à présent à des injections intracrâniennes pour les tumeurs cérébrales ? Sans doute par ce que le paradigme soutenant que des drogues devaient traverser la barrière hémato-encéphalique était fort. Aujourd'hui, avec les moyens technologiques de la neuro-chirurgie, les risques liés à des injections intracrâniennes paraissent bien plus faibles que le bénéfice d'une action locale de cisplatine combinée à un traitement de radiothérapie. Enfin, avec le cisplatine, de nombreux inhibiteurs de tyrosines kinases sont aujourd'hui utilisés avec succès dans le traitement des cancers (Steeghs, Nortier et al. 2007). Ces agents peuvent-ils avoir une action sur les gliomes ? La protéine BRCA1 est un partenaire privilégié de nombreuses tyrosines kinase comme c-Abl ou Her2/neu (Zhang, Zhang et al. 1997; Foray, Marot et al. 2002). A ce titre, une protéine BRCA1 sauvage semble jouer à la fois de partenaire protéique et d'inhibiteur naturel de certaines activités tyrosine kinases (Zhang, Zhang et al. 1997; Foray, Marot et al. 2002) Quelques études ont en particulier montré que l'altération de BRCA1 peut libérer l'activité de la tyrosine kinase. Cette activité se retrouve alors incontrôlée et agit sur la prolifération cellulaire. Ainsi, d'après ce modèle, l'action de drogues inhibitrices d'activité tyrosine kinases pourrait être particulièrement bénéfique dans le cas de gliomes où la protéine BRCA1 est altérée. C'était l'objet de l'Etape IV. Notons cependant qu'une grande prudence est nécessaire dans l'interprétation de la littérature concernant ce domaine : en effet, beaucoup d'auteurs font état des expressions des protéines BRCA1 et de certaines kinases et non véritablement de tests fonctionnels d'activité kinase, de phosphorylation et d'interaction entre les protéines.

V.3 Etape III : Analyse radiobiologique de la neurofibromatose type I

L'analyse radiobiologique de la neurofibromatose de type 1 était la suite logique de certaines conclusions issues des étapes précédentes :

- Les conclusions de l'Etape I incitent à analyser systématiquement n'importe quel syndrome génétique en mesurant à la fois les foci pH2AX et les foci MRE11 après une irradiation. A ce titre, on peut se demander dans quel groupe défini dans l'article II appartient la neurofibromatose 1. Il faut également noter que la neurofibromatose se caractérise fréquemment par une forte incidence de taches café-au-lait que l'on rencontre également dans le cas de mutations de MRE11 et de NBS1 (partenaire de MRE11 dont les mutations causent le syndrome de Nimègue).

- Les dysfonctions nombreuses de BRCA1 dans les gliomes nous ont encouragé à consolider nos observations avec d'autres tissus, notamment les tissus sains, et d'autres syndromes. A ce titre, la neurofibromatose de type 1, syndrome associé aux tumeurs bénignes et malignes le plus répandu, apparaissait naturellement comme un modèle de prédisposition aux tumeurs du système nerveux périphérique. Ainsi, quelles nouvelles informations pouvions-nous tirer de l'analyse radiobiologique de fibroblastes issus de patients porteurs de la maladie concernant le rôle de la protéine BRCA1?

V.3.1 La neurofibromatose de type 1: un syndrome associé à une radiosensibilité modérée mais significative.

Jusqu'à présent, peu d'auteurs avaient considéré la neurofibromatose comme un syndrome associé à une radiosensibilité (Article V). Cependant, comme le montre l'article V, peu de données de survie comparables en terme de protocole expérimental étaient disponibles. De plus, la confirmation par les données cytogénétiques d'une certaine radiorésistance semblait également insuffisante vu le faible nombre d'études sur le sujet. Dans le cadre de notre étude systématique des foci pH2AX et MRE11, inédite pour un tel syndrome, les résultats obtenus confirmèrent deux points importants :

- le faible nombre de foci pH2AX résiduels après 2 Gy suggérait fortement une faible déficience en réparation par suture (si déficience il y a), ce qui confirmait l'absence de radiosensibilité extrême pour ce syndrome.

- à l'inverse, le taux élevé de foci MRE11 renforçait l'idée, d'après notre modèle, à la fois d'un défaut de suture faible mais significatif mais surtout d'une grande instabilité génomique, responsable d'une forte prédisposition au cancer. De plus, la taille impressionnante des noyaux des fibroblastes NF1 soutenait une fois encore une décondensation spontanée de la chromatine, comparable à celle observée dans les fibroblastes mutés pour XPD de l'article II et qui montraient une survie quantitativement identique. D'ailleurs, le hasard fit que pendant l'analyse des résultats sur la neurofibromatose, dans le cadre d'un autre programme de recherche, des fibroblastes issus de parents d'enfants atteints de l'ataxia telangiectasia, (donc porteurs de mutations ATM hétérozygotes) montrèrent également les mêmes caractéristiques (nombre faible de foci pH2AX, nombre élevé de foci MRE11 et radiosensibilité modérée mais significative) (N. Foray, communication personnelle). Ainsi, la forte prédisposition au cancer de la NF1 peut facilement être expliquée par MRE11. En ce qui concerne la radiosensibilité, l'explication est plus subtile. Certains auteurs ont démontré une radiosensibilité évidente pour les tumeurs et les tissus sains provenant des patients NF1, radiosensibilité particulièrement évidente lorsque que l'irradiation est prolongée, comme dans le cadre de traitements de radiothérapie fractionnés ou à faibles débits de doses. Il n'est alors pas impossible que de tels traitements aboutissent à l'accumulation de cassures de l'ADN non réparées dont le taux en une seule séance (dose unique) est insuffisant pour influencer sur la clonogénicité mais qui, multiplié par le nombre de séances, peut être responsable de fortes toxicités (article V). Telles seraient les caractéristiques cliniques des syndromes du groupe II. Cette hypothèse est notamment consolidée par les observations effectuées sur les patients XPD, assez souvent radiosensibles. Ainsi notre approche pourrait éclairer d'un jour nouveau la prédiction de réactions suraiguës de patients traités pour un cancer mais n'ayant jamais montré auparavant de signes cliniques particuliers (Joubert and Foray 2007).

V.3.2 Y-a-t-il un lien entre BRCA1 et NF1?

La synthèse de nos résultats des trois premières étapes nous a incité naturellement à étudier le lien possible entre les deux protéines BRCA1 et NF1. Tout d'abord, il faut noter que BRCA1 et NF1 sont situées sur le même chromosome (17q12-q21 et 17q11.2). Ainsi, certaines mutations du chromosome 17 comme les aberrations chromosomiques peuvent conduire à la perte concomitante de ces deux gènes. Ainsi quelques *Case Reports* concernant de patients atteints à la fois de cancers du sein et de neurofibromatose 1 (Ceccaroni, Genuardi

et al. 2002; Guran and Safali 2005). Cependant, il faut souligner que la perte totale des deux gènes entraîne une létalité embryonnaire et donc seuls les cas de pertes d'hétérozygotie doivent être considérés. Par contre, une mutation germinale survie par une mutation somatique peut expliquer de fortes affections neuronales chez les patients BRCA1+/- . On en revient d'ailleurs aux conclusions tirées des résultats de l'étape II. Les dysfonctions des protéines BRCA1 et de NF1, quelles soient instantanées ou successives pourrait donc expliquer l'incidence de cancers du sein dans la maladie de Von Recklinghausen (NF1) et inversement, l'incidence de métastases cérébrales chez le porteurs BRCA1+/- . Pourtant, au niveau cellulaire, la localisation de ces deux protéines est, à première vue, bien différente. BRCA1 a été en effet décrite comme essentiellement nucléaire alors que NF1 est connue comme principalement cytoplasmique. Nous avons décrit que les radiations ionisantes peuvent induire un transport de NF1 du cytoplasme au noyau (nucleo-shuttling) où NF1 pourrait alors s'associer à BRCA1. Cependant, ce phénomène a été observé pour des doses de radiation fortes (15 Gy) et ne peuvent donc expliquer une synergie constante. A l'inverse, les fonctions de BRCA1 dans le cytoplasme ont été récemment mises en évidence, notamment à travers les interactions de PABP, DAP5 et ACCA qui interviendrait dans la synthèse lipidique (Dizin, Gressier et al. 2006; Moreau, Dizin et al. 2006). De telles fonctions sont très impliquées dans le métabolisme des cellules de Schwann (les schwannomes sont des tumeurs fréquemment associées à la NF1). Cependant, ce lien éventuel doit être documenté scrupuleusement. Plus attrayante est la recherche d'une interaction entre les formes cytoplasmiques de BRCA1, de NF1 et de p16/INK4. L'expression de p16/ink4 est généralement très faible voire absente dans les tissus (sains ou tumoraux) de patients NF1. La surexpression ectopique des cyclines D1 et Cdk4 stimulent le promoteur de BRCA1. Ce processus est inhibé par la co-expression de l'inhibiteur de cycline p16/INK4a. Ainsi BRCA1 et p16/ink4 agissent ensemble dans le contrôle de la prolifération. Une telle voie a été évoquée dans l'Introduction pour expliquer la gliomagenèse (Wang, Schneider-Broussard et al. 2000). De façon intéressante, comme pour BRCA1, p16/INK4 était jusqu'à lors considérée comme uniquement nucléaire. Un article récent nous montre que les formes cytoplasmiques de INK4 existent et sont spécifiques à des tumeurs de faible pronostic (Evangelou, Bramis et al. 2004). Ainsi, nos résultats soulèvent la question des formes cytoplasmiques d'acteur de la surveillance du génome qui pourraient jouer un rôle important dans la réponse aux traitements anti-cancer.

V.4 Etape IV: Effets des inhibiteurs de tyrosine kinases

Cette dernière étape présente des données très préliminaires, initiatrices d'un programme de recherche d'envergure qui consistera à faire des intercomparaisons d'effets en fonction des différents statuts de BRCA1. Ainsi, il faut voir dans les données présentées un premier dégrossissage avec le double test pH2AX-MRE11. Comme on l'a vu plus haut, cette étape s'inscrit dans une démarche logique très argumentée :

- les différents statuts fonctionnels de BRCA1 observés dans les tumeurs cérébrales vont agir différemment dans la réponse à la chimiothérapie pour deux raisons essentielles: 1) la protéine BRCA1 sauvage est requise pour une réponse normale au cisplatine; 2) BRCA1 est un inhibiteur naturel de certaines tyrosine kinases comme c-Abl et HER2/neu mais également un partenaire régulateur de nombreux facteurs de croissance ciblées par les drogues inhibitrices.

- on favorise l'étude des événements radioinduits précoces c'est-à-dire que l'on s'abstrait de tout *a priori* concernant l'action des drogues inhibitrices de tyrosine kinases sur les facteurs de croissance, les acteurs de la prolifération ou l'angiogenèse. D'ailleurs la plupart ne sont pas spécifiques et la littérature fournit la preuve de plus en plus évidente que ces drogues ne peuvent qu'agir sur plusieurs niveaux. Le fait d'étudier les événements plus en amont permet de mieux comprendre la globalité de ces actions.

- enfin, à travers les résultats publiés par le laboratoire d'accueil sur la photoactivation du cisplatine, il était également naturel d'évaluer l'effet des drogues inhibitrices des tyrosine kinases sur la photoactivation du cisplatine. Le modèle cellulaire choisi était le modèle de gliome humain de notre collection le plus radio- et chimio- radio-résistant pour explorer le phénomène de PAT-Plat combiné avec ces drogues inhibitrices des tyrosine kinases, mais le manque de temps nous n'a hélas pas permis de réaliser une étude complète.

Comme annoncé dans les premières conclusions de l'Etape IV, il apparaît une très nette spécificité des réponses suivant le modèle cellulaire de statut BRCA1 différent, ce qui confirme nos hypothèses mais surtout ce qui incite à la prudence pour le choix de la stratégie anticancéreuse.

Les meilleurs résultats sont enregistrés pour U87 avec la quercétine, la génistéine et le sofefenib qui semblent toutes trois accroître le nombre de CDBs non-réparées. Cela reste

également le cas pour U373 avec la quercétine. Le nombre élevé des CDBs après le traitement par ces deux isoflavonoïdes est certainement le résultat de l'activation de l'ATM et de ses substrats H2AX et p53 (Ye, Goodarzi et al. 2004). Par contre, pour U118, le cisplatine apparaît pleinement comme le meilleur des prétraitements avant l'irradiation, comme si, plus le statut fonctionnel de BRCA1 est endommagé, plus le bénéfice de l'utilisation du cisplatine est important.

Enfin, les taux de foci MRE11 apparaissent relativement bas pour les deux lignées U87 et U373 alors que pour U118, il est fort probable que la déficience en suture soit telle qu'elle entraîne une compensation massive de la recombinaison MRE11-dépendante.

Le nombre de CDBs est le double en condition PAT-Plat par rapport au traitement classique combiné, l'utilisation de LFM-A13, de l'erbstatine analogue et de la quercétine ne semble pas créer les cassures double-brin supplémentaires. Les expériences complémentaires avec le rayonnement synchrotron sont nécessaires pour pouvoir s'exprimer.

VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse s'inscrivait dans le cadre d'un programme de recherche en radiobiologie fondamentale. La relation entre la radiosensibilité intrinsèque et le défaut de réparation, valable pour n'importe quelle affection est une donnée nouvelle, de même que la considération de la voie MRE11-dépendante. Les résultats décrits dans la première étape de cette thèse montrent bien que le test prédictif unique que tous les radiothérapeutes et les radiobiologistes attendaient n'existe pas. Au contraire, les tests pH2AX et MRE11 s'avèrent nécessaires mais peut-être pas encore suffisants pour prédire toutes les radiosensibilités.

L'opportunité et l'intérêt de travailler sur les gliomes s'expliquent par le contexte local où des modalités de chimio-radiothérapie innovantes impliquant le synchrotron sont en plein développement. Les premières observations que la présence, la localisation et/ou la phosphorylation de BRCA1 sont anormales dans la plupart des modèles de gliomes testés relèvent, dans un premier temps, du hasard puisque ces tests faisaient partie de l'approche systématique adoptée. Cela prouve d'ailleurs l'absence de tout *a priori* dès le départ de nos travaux. Nous avons ensuite, avec enthousiasme, voulu délibérément vérifier ce qu'une telle approche, même appliquée de façon préliminaire, pouvait apporter à la compréhension de syndromes associés à des tumeurs cérébrales comme c'est le cas pour la neurofibromatose. Nous nous sommes également demandés quelles étaient les conséquences du statut fonctionnel de BRCA1 dans la réponse aux traitements radio-chimiothérapiques. Comme l'ensemble de ces travaux s'est effectué en seulement 3 ans, il est ainsi évident qu'un approfondissement de chacune des étapes est nécessaire pour construire un modèle solide où évolueraient BRCA1, NF1, ATM, p16, etc...

En conclusion, le statut fonctionnel de la BRCA1 comme le résultat le plus important de cette thèse ouvre les perspectives de recherche des mécanismes d'inactivation d'expression dans ces lignées de gliomes. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire sont indispensables pour détecter les changements génétiques ou épigénétiques de *BRCA1* ou de ses partenaires dans ces lignées. La compréhension de ces mécanismes sera indispensable pour progresser. Toutefois, la connaissance des nouveaux mécanismes moléculaires

impliquant la BRCA1 dans les gliomes qui pourrait déterminer la réponse aux traitements de radio ou chimiothérapie mérite à être approfondie.

La phase suivante serait la vérification du statut de BRCA1 dans les gliomes issus des biopsies. On peut espérer que la compréhension des voies de signalisation BRCA1-dépendantes permettrais de mieux adapter les traitements des gliomes aux besoins et aux réactions du chaque patient, comme c'est dans le cas des tumeurs du sein.

Cette thèse doit donc être considérée comme une première application de concepts et de techniques nouveaux dont nous nous sommes efforcés de considérer tous les pièges dans un domaine – les tumeurs cérébrales – où les données sont très souvent contradictoires et les dogmes nombreux. Il faut en effet rappeler que les premières publications concernant l'immunofluorescence pH2AX et ses applications en radiobiologie datent des années 2003-2004, ce qui correspond au tout début des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Il faut aussi rappeler que les principes actuels tels le fait de favoriser l'usage des drogues qui traversent la barrière hémato-encéphalique ou qui ont une action sur l'angiogénèse sont à l'opposé de notre démarche plutôt fondamentale et moléculaire. Plusieurs années seront donc encore nécessaires pour prendre toute la mesure des premiers résultats que nous présentons ici.

Citons les aspects majeurs qui s'imposent à nous en cette fin de thèse et qui constituent à nos yeux les 7 axes de perspectives :

- le risque des surinterprétations des tests basés sur l'image
- la possibilité de prédire la radiosensibilité à partir de données moléculaires
- le problème de santé publique que peut poser des syndromes associés à de faibles radiosensibilités lors de traitements de radiothérapie
- la mise en évidence que, même d'apparence très hétérogène, les tumeurs cérébrales peuvent montrer des dysfonctions de protéines dont l'action est en amont de celles testées actuellement.
- la forte probabilité que des protéines comme BRCA1 ou ATM, connues pour être essentiellement nucléaires aient des fonctions cruciales également dans le cytoplasme
- l'existence d'une possible interaction entre BRCA1, ATM, NF1 et p16
- le fait que la réponse aux drogues inhibitrices de tyrosine kinase peut varier significativement d'une tumeur à l'autre, dépendant au moins du statut fonctionnel de BRCA1.

Ainsi, nous espérons que cette thèse va dans le sens de la nécessité d'approfondir les connaissances fondamentales afin de personnaliser les traitements anticancéreux, de les rendre plus efficaces et de mieux sécuriser leur application.

VII BIBLIOGRAPHIE

- Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." Science **260**(5109): 812-6.
- Abbott, D. W., M. E. Thompson, et al. (1999). "BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair." J Biol Chem **274**(26): 18808-12.
- Adam, J. F., M. C. Biston, et al. (2005). "Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry." Int J Radiat Oncol Biol Phys **61**(4): 1173-82.
- Adam, J. F., H. Elleaume, et al. (2003). "Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: first trial on rats bearing F98 gliomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **57**(5): 1413-26.
- Albiges, L., F. Andre, et al. (2005). "Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases." Ann Oncol **16**(11): 1846-7.
- Allalunis-Turner, M. J., G. M. Barron, et al. (1993). "Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs." Radiat Res **134**(3): 349-54.
- Asai, A., Y. Miyagi, et al. (1994). "Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy." J Neurooncol **19**(3): 259-68.
- Bailey, P. and H. Cushing (1926). A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis.
- Bajenaru, M. L., M. R. Hernandez, et al. (2003). "Optic nerve glioma in mice requires astrocyte Nf1 gene inactivation and Nf1 brain heterozygosity." Cancer Res **63**(24): 8573-7.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-60.
- Barth, R. F. (1998). "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas." J Neurooncol **36**(1): 91-102.
- Basu, T. N., D. H. Gutmann, et al. (1992). "Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients." Nature **356**(6371): 713-5.
- Becher, O. J. and E. C. Holland (2006). "Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies." Cancer Res **66**(7): 3355-8, discussion 3358-9.
- Behin, A., K. Hoang-Xuan, et al. (2003). "Primary brain tumours in adults." Lancet **361**(9354): 323-31.
- Benda, P., J. Lightbody, et al. (1968). "Differentiated rat glial cell strain in tissue culture." Science **161**(839): 370-1.
- Biston, M., A. Joubert, et al. (2007). "X-rays photoactivation of platinum against a glioma model: advantages of synchrotron radiation

-
- and intercomparisons carboplatin/cisplatin." Submitted.
- Biston, M. C., A. Joubert, et al. (2004). "Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays." Cancer Res **64**(7): 2317-23.
- Bos, M., J. Mendelsohn, et al. (1997). "PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner." Clin Cancer Res **3**(11): 2099-106.
- Bredel, M. (2001). "Anticancer drug resistance in primary human brain tumors." Brain Res Brain Res Rev **35**(2): 161-204.
- Bredel, M., C. Bredel, et al. (2005). "High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors." Cancer Res **65**(10): 4088-96.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2003). "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance." Genes Dev **17**(5): 615-28.
- Burma, S., B. P. Chen, et al. (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-7.
- Cairncross, J. G., W. Seiferheld, et al. (2004). An intergroup randomized controlled clinical trial (RCT) of chemotherapy plus radiation (RT) versus RT alone for pure and mixed anaplastic oligodendroblastomas: Initial report of RTOG 94-02. New Orleans.
- Castro, M. G., R. Cowen, et al. (2003). "Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors." Pharmacol Ther **98**(1): 71-108.
- Ceccaroni, M., M. Genuardi, et al. (2002). "BRCA1-related malignancies in a family presenting with von Recklinghausen's disease." Gynecol Oncol **86**(3): 375-8.
- Chavandra, N., J. Bourhis, et al. (2004). "Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin." Radiother Oncol **73**(3): 373-82.
- Chen, Y., A. A. Farmer, et al. (1996). "BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner." Cancer Res **56**(14): 3168-72.
- Corde, S., J. Balosso, et al. (2003). "Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways." Cancer Res **63**(12): 3221-7.
- Curran, W. J., Jr., C. B. Scott, et al. (1993). "Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials." J Natl Cancer Inst **85**(9): 704-10.
- D'Amico, A. V. and W. G. McKenna (1994). "Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy." Radiother Oncol **33**(1): 3-10.
- D'Amours, D. and S. P. Jackson (2002). "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 317-27.
- Dai, Y., B. Kysela, et al. (2003). "Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2462-7.
- Darbon, J. M., M. Penary, et al. (2000). "Distinct Chk2 activation pathways are triggered by genistein and DNA-damaging agents in human melanoma cells." J Biol Chem **275**(20): 15363-9.
- Daston, M. M., H. Scoble, et al. (1992). "The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes." Neuron **8**(3): 415-28.
- Daumas-Duport, C., F. Beuvon, et al. (2000). "[Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]." Ann Pathol **20**(5): 413-28.

-
- de Klein, A., A. G. van Kessel, et al. (1982). "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* **300**(5894): 765-7.
- Deans, A. J., K. K. Khanna, et al. (2006). "Cyclin-Dependent Kinase 2 Functions in Normal DNA Repair and Is a Therapeutic Target in BRCA1-Deficient Cancers." *Cancer Res* **66**(16): 8219-26.
- DeClue, J. E., A. G. Papageorge, et al. (1992). "Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis." *Cell* **69**(2): 265-73.
- Di Leonardo, A., S. P. Linke, et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." *Genes Dev* **8**: 2540-51.
- Di Virgilio, M. and J. Gautier (2005). "Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11." *J Cell Biol* **171**(5): 765-71.
- Ding, H., L. Roncari, et al. (2001). "Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas." *Cancer Res* **61**(9): 3826-36.
- Diserens, A. C., N. de Tribolet, et al. (1981). "Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18." *Acta Neuropathol (Berl)* **53**(1): 21-8.
- Dizin, E., C. Gressier, et al. (2006). "BRCA1 interacts with poly(A)-binding protein: implication of BRCA1 in translation regulation." *J Biol Chem* **281**(34): 24236-46.
- Druker, B. J., S. Tamura, et al. (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nat Med* **2**(5): 561-6.
- Easton, D., D. Ford, et al. (1993). "Inherited susceptibility to breast cancer." *Cancer Surv* **18**: 95-113.
- Evangelou, K., J. Bramis, et al. (2004). "Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) "nuclear" cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas." *Biotech Histochem* **79**(1): 5-10.
- Fan, S., Q. Meng, et al. (2006). "BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells." *Br J Cancer* **94**(3): 407-26.
- Favaudon, V. and G. Noel (2005). "[Biological basis for concomitant chemoradiotherapy in carcinomas]." *Bull Cancer* **92**(12): 1027-31.
- Ferner, R. E. (2007). "Neurofibromatosis 1." *Eur J Hum Genet* **15**(2): 131-8.
- Ferner, R. E., S. M. Huson, et al. (2007). "Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1." *J Med Genet* **44**(2): 81-8.
- Ferry, D. R., A. Smith, et al. (1996). "Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition." *Clin Cancer Res* **2**(4): 659-68.
- Fertil, B. and E. P. Malaise (1981). "Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **7**(5): 621-9.
- Figarella-Branger, D. and C. Bouvier (2005). "[Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]." *Bull Cancer* **92**(4): 301-9.
- Fine, H. A., K. B. Dear, et al. (1993). "Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults." *Cancer* **71**(8): 2585-97.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-47.
- Foray, N., D. Marot, et al. (2003). "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein." *Embo J* **22**(11): 2860-71.

-
- Foray, N., D. Marot, et al. (2002). "Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation." Mol Cell Biol **22**(12): 4020-32.
- Foray, N., C. Monroco, et al. (1998). "Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability." Int J Radiat Biol **74**(5): 551-60.
- Foray, N., V. Randrianarison, et al. (1999). "Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2." Oncogene **18**(51): 7334-42.
- Frankenberg-Schwager, M. (1989). "Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation." Radiother Oncol **14**(4): 307-20.
- Frappaz, D., O. Chinot, et al. (2003). "[Standards, Options and Recommendations 2002 for the management of adult patients with intracranial gliomas (summary report)]." Bull Cancer **90**(10): 873-86.
- Futreal, P. A., Q. Liu, et al. (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." Science **266**(5182): 120-2.
- Galli, R., E. Binda, et al. (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res **64**(19): 7011-21.
- Glantz, M. J., P. C. Burger, et al. (1991). "Influence of the type of surgery on the histologic diagnosis in patients with anaplastic gliomas." Neurology **41**(11): 1741-4.
- Goodhead, D. T. (1989). "The initial physical damage produced by ionizing radiations." Int J Radiat Biol **56**(5): 623-34.
- Gray, F., K. Mokhtari, et al. (2004). Epidemiologie. Tumeurs cérébrales. Du diagnostique au traitement. P. Masson: 3-6.
- Grunstein, M. (1992). "Histones as regulators of genes." Sci Am **267**(4): 68-74B.
- Gudmundsdottir, K. and A. Ashworth (2006). "The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability." Oncogene **25**(43): 5864-74.
- Guran, S. and M. Safali (2005). "A case of neurofibromatosis and breast cancer: loss of heterozygosity of NF1 in breast cancer." Cancer Genet Cytogenet **156**(1): 86-8.
- Gutmann, D. H., D. L. Wood, et al. (1991). "Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9658-62.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hannan, M. A., B. P. Smith, et al. (1990). "Radiosensitivity of fibroblasts obtained from a cafe-au-lait spot and normal-appearing skin of a patient with neurofibromatosis (NF-6)." Cancer Genet Cytogenet **47**(2): 191-6.
- Heim, R. A., L. M. Silverman, et al. (1994). "Screening for truncated NF1 proteins." Nat Genet **8**(3): 218-9.
- Hoang-Xuan, K., A. Idbaih, et al. (2005). "[Towards a molecular classification of gliomas]." Bull Cancer **92**(4): 310-6.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-74.
- Holland, E. C. (2001). "Brain tumor animal models: importance and progress." Curr Opin Oncol **13**(3): 143-7.
- Holland, E. C. (2001). "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." Nat Rev Genet **2**(2): 120-9.
- Honrado, E., A. Osorio, et al. (2006). "Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations." Oncogene **25**(43): 5837-45.
- Hutterer, M., E. Gunsilius, et al. (2006). "Molecular therapies for malignant glioma." Wien Med Wochenschr **156**(11-12): 351-63.

-
- Izzard, R. A., S. P. Jackson, et al. (1999). "Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase." *Cancer Res* **59**(11): 2581-6.
- Jacinto, F. V. and M. Esteller (2007). "Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer." *Mutagenesis*.
- Jensen, S., D. C. Paderanga, et al. (1995). "Molecular analysis at the NF1 locus in astrocytic brain tumors." *Cancer* **76**(4): 674-7.
- Jiricny, J. and M. Nystrom-Lahti (2000). "Mismatch repair defects in cancer." *Curr Opin Genet Dev* **10**(2): 157-61.
- Joubert, A. and N. Foray (2006). Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies (Chapter 10). In: Landseer, BR., editor. *New Research on DNA Repair*. Hauppauge NY, Nova Science Publishers, Inc.
- Joubert, A. and N. Foray (2007). "[Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells.]." *Cancer Radiother*.
- Joubert, A., K. Gamo, et al. (2007). DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? **Publication submitted**.
- Kawada, M., J. Tawara, et al. (1993). "Inhibition of Abelson oncogene function by erbstatin analogues." *Drugs Exp Clin Res* **19**(6): 235-41.
- Kemp, L. M., S. G. Sedgwick, et al. (1984). "X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining." *Mutat Res* **132**(5-6): 189-96.
- Kernohan, J., R. Mabon, et al. (1949). "A simplified classification of gliomas." *Proc Staff Meet Mayo Clin* **24**: 71-5.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* **27**(3): 247-54.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature* **386**(6627): 761, 763.
- Kleihues, P., D. N. Louis, et al. (2002). "The WHO classification of tumors of the nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(3): 215-25; discussion 226-9.
- Ko, L., A. Koestner, et al. (1980). "Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones." *Acta Neuropathol (Berl)* **51**(1): 23-31.
- Koishi, M., N. Hosokawa, et al. (1992). "Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line." *Jpn J Cancer Res* **83**(11): 1216-22.
- Laissue, J. A., G. Geiser, et al. (1998). "Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays." *Int J Cancer* **78**(5): 654-60.
- Larson, D. A., P. H. Gutin, et al. (1996). "Gamma knife for glioma: selection factors and survival." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**(5): 1045-53.
- Lazaro, C., A. Ravella, et al. (1994). "Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father." *N Engl J Med* **331**(21): 1403-7.
- Lees-Miller, S. P., R. Godbout, et al. (1995). "Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line." *Science* **267**(5201): 1183-5.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." *Nature* **362**(6422): 709-15.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." *Science* **286**(5446): 1897-905.
- Littler, M. and N. E. Morton (1990). "Segregation analysis of peripheral neurofibromatosis (NF1)." *J Med Genet* **27**(5): 307-10.

-
- Loiseau, H. (1996). "[Prognosis of gliomas]." Rev Neurol (Paris) **152**(2): 84-102.
- Loiseau, H. (2004). Glioblastomes et astrocytomes anaplastiques. Tumeurs cérébrales. Masson. Paris: 155-67.
- Lowe, S. W., H. E. Ruley, et al. (1993). "p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." Cell **74**(6): 957-67.
- Mahajan, S., S. Ghosh, et al. (1999). "Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]." J Biol Chem **274**(14): 9587-99.
- Mao, R., W. Krone, et al. (1985). "Cell-culture studies on neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease). III. Experiments on X-ray sensitivity." Arch Dermatol Res **277**(6): 439-43.
- Marot, D., P. Opolon, et al. (2006). "The tumor suppressor activity induced by adenovirus-mediated BRCA1 overexpression is not restricted to breast cancers." Gene Ther **13**(3): 235-44.
- McCabe, N., N. C. Turner, et al. (2006). "Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition." Cancer Res **66**(16): 8109-15.
- McKenna, W. G. and R. J. Muschel (2003). "Targeting tumor cells by enhancing radiation sensitivity." Genes Chromosomes Cancer **38**(4): 330-8.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
- Mitchell, P., D. W. Ellison, et al. (2005). "Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics." Lancet Neurol **4**(7): 413-22.
- Moreau, K., E. Dizin, et al. (2006). "BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase." J Biol Chem **281**(6): 3172-81.
- Morrison, C., G. C. Smith, et al. (1997). "Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis." Nat Genet **17**(4): 479-82.
- Moustacchi, E. (2000). "DNA damage and repair: consequences on dose-responses." Mutat Res **464**(1): 35-40.
- Nelms, B. E., R. S. Maser, et al. (1998). "In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts." Science **280**(5363): 590-2.
- O'Farrell, A. M., T. J. Abrams, et al. (2003). "SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo." Blood **101**(9): 3597-605.
- Ochs, H. D. and C. I. Smith (1996). "X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis." Medicine (Baltimore) **75**(6): 287-99.
- Paull, T. T. and M. Gellert (2000). "A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6409-14.
- Peltomaki, P. (2001). "DNA mismatch repair and cancer." Mutat Res **488**(1): 77-85.
- Perez-Losada, J. and A. Balmain (2003). "Stem-cell hierarchy in skin cancer." Nat Rev Cancer **3**(6): 434-43.
- Peterson, G. (1995). "Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells." J Nutr **125**(3 Suppl): 784S-789S.
- Piantelli, M., N. Maggiano, et al. (1995). "Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells." J Invest Dermatol **105**(2): 248-53.
- Ponten, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." Acta Pathol Microbiol Scand **74**(4): 465-86.
- Puck, T. T. and P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." J Exp Med **103**(5): 653-66.

-
- Puvion-Dutilleul, F. and A. Sarasin (1989). "Chromatin and nucleolar changes in Xeroderma pigmentosum cells resemble aging-related nuclear events." *Mutat Res* **219**(1): 57-70.
- Reilly, K. M., D. A. Loisel, et al. (2000). "Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects." *Nat Genet* **26**(1): 109-13.
- Riccardi, V. M. and R. A. Lewis (1988). "Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants." *Am J Hum Genet* **42**(2): 284-9.
- Rixe, O. (2000). "[Platinum salts: cytotoxic mechanisms of action, mechanisms of resistance of cancer cells, interactions with ionizing radiation, specificity of carboplatin]." *Bull Cancer* **87 Spec No**: 7-15.
- Rogakou, E. P., C. Boon, et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* **146**(5): 905-16.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-68.
- Rothkamm, K. and M. Lobrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5057-62.
- Rubin, B. P., S. Singer, et al. (2001). "KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors." *Cancer Res* **61**(22): 8118-21.
- Ruffner, H., W. Jiang, et al. (1999). "BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4843-54.
- Ruffner, H., C. A. Joazeiro, et al. (2001). "Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5134-9.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3): 183-232.
- Scardocci, A., F. Guidi, et al. (2006). "Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia." *Br J Cancer* **95**(8): 1108-13.
- Schiffer, D. (2005). "Radiotherapy by particle beams (hadrontherapy) of intracranial tumours: a survey on pathology." *Neurol Sci* **26**(1): 5-12.
- Schlegel, J., G. Piontek, et al. (1999). "The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors." *Pathobiology* **67**(4): 202-6.
- Scully, R., J. Chen, et al. (1997). "Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells." *Cell* **88**(2): 265-75.
- Scully, R., A. Xie, et al. (2004). "Molecular functions of BRCA1 in the DNA damage response." *Cancer Biol Ther* **3**(6): 521-7.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, et al. (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." *Radiat Res* **158**(4): 486-92.
- Senatus, P. B., Y. Li, et al. (2006). "Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide." *Mol Cancer Ther* **5**(1): 20-8.
- Sheleg, S. V., E. A. Korotkevich, et al. (2002). "Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme." *J Neurooncol* **60**(1): 53-9.
- Sheridan, M. T., T. O'Dwyer, et al. (1997). "Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Radiat Oncol Investig* **5**(4): 180-6.
- Shinoda, J., N. Sakai, et al. (2001). "Selection of eligible patients with supratentorial glioblastoma multiforme for gross total resection." *J Neurooncol* **52**(2): 161-71.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
-

-
- Smith, G. C. and S. P. Jackson (1999). "The DNA-dependent protein kinase." Genes Dev **13**(8): 916-34.
- Sonoda, Y., T. Ozawa, et al. (2001). "Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma." Cancer Res **61**(18): 6674-8.
- Steeghs, N., J. W. Nortier, et al. (2007). "Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments." Ann Surg Oncol **14**(2): 942-53.
- Stewart, L. A. (2002). "Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials." Lancet **359**(9311): 1011-8.
- Stewart, P. K. a. B. W., Ed. (2003). World Cancer Report. Lyon, IARC Press.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-96.
- Taghian, A., J. Ramsay, et al. (1993). "Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme." Int J Radiat Oncol Biol Phys **25**(2): 243-9.
- Taghian, A., H. Suit, et al. (1992). "In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme." Int J Radiat Oncol Biol Phys **23**(1): 55-62.
- Tenan, M., B. M. Colombo, et al. (1993). "Low frequency of NF1 gene mutations in malignant gliomas." Eur J Cancer **29A**(8): 1217-8.
- Thiel, G., K. Marczynek, et al. (1995). "Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in gliomas and primitive neuroectodermal tumours." Anticancer Res **15**(6B): 2495-9.
- Thyagarajan, B., M. McCormick-Graham, et al. (1996). "Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells." Nucleic Acids Res **24**(20): 4084-91.
- Tominaga, Y., A. Wang, et al. (2007). "Genistein inhibits Brca1 mutant tumor growth through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest, and mitotic catastrophe." Cell Death Differ **14**(3): 472-9.
- Tsuchida, R., T. Yamada, et al. (2002). "Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast." Radiat Res **158**(2): 195-201.
- Tubiana, M., J. Dutreix, et al. (1986). Radiobiologie. Paris, Hermann.
- Turchi, J. J. and K. Henkels (1996). "Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(23): 13861-7.
- Turchi, J. J., K. M. Henkels, et al. (2000). "Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK." Nucleic Acids Res **28**(23): 4634-41.
- Turner, N., A. Tutt, et al. (2004). "Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers." Nat Rev Cancer **4**(10): 814-9.
- Uckun, F. M., I. Dibirdik, et al. (2007). "Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK)." Bioorg Med Chem **15**(2): 800-14.
- Ueki, K., R. Nishikawa, et al. (2002). "Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors." Clin Cancer Res **8**(1): 196-201.
- Vallat, A., J. Poirier, et al. (1997). Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. Encykl Méd Chir. Paris, Elsevier. Neurologie: 9.
- Vescovi, A. L., R. Galli, et al. (2006). "Brain tumour stem cells." Nat Rev Cancer **6**(6): 425-36.
-

-
- Vogel, T. W., Z. Zhuang, et al. (2005). "Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme." *Clin Cancer Res* **11**(10): 3624-32.
- Wager, M., L. Karayan-Tapon, et al. (2005). Tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. *Cancérologie fondamentale*. J. L. Eurotext: 256-266.
- Wagner, M., L. Karayan-Tapon, et al. (2005). Tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. *Cancérologie fondamentale*. J. L. Eurotext: 256-266.
- Walker, J. R., R. A. Corpina, et al. (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." *Nature* **412**(6847): 607-14.
- Walker, M. D., E. Alexander, Jr., et al. (1978). "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial." *J Neurosurg* **49**(3): 333-43.
- Walker, P. R., L. Kokileva, et al. (1993). "Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis." *Biotechniques* **15**(6): 1032-40.
- Wallace, M. R., D. A. Marchuk, et al. (1990). "Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients." *Science* **249**(4965): 181-6.
- Wang, A., R. Schneider-Broussard, et al. (2000). "Regulation of BRCA1 expression by the Rb-E2F pathway." *J Biol Chem* **275**(6): 4532-6.
- Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **35**: 95-125.
- Weissenberger, J., S. Loeffler, et al. (2004). "IL-6 is required for glioma development in a mouse model." *Oncogene* **23**(19): 3308-16.
- Weissenberger, J., J. P. Steinbach, et al. (1997). "Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice." *Oncogene* **14**(17): 2005-13.
- Westphal, M., D. C. Hilt, et al. (2003). "A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma." *Neuro-oncol* **5**(2): 79-88.
- Wilhelm, S. M., C. Carter, et al. (2004). "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis." *Cancer Res* **64**(19): 7099-109.
- Wu, L., S. L. Davies, et al. (2001). "Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51." *J Biol Chem* **276**(22): 19375-81.
- Xu, B., S. Kim, et al. (2001). "Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation." *Mol Cell Biol* **21**(10): 3445-50.
- Ye, R., A. A. Goodarzi, et al. (2004). "The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX." *DNA Repair (Amst)* **3**(3): 235-44.
- Yoshida, K. and Y. Miki (2005). "Enabling death by the Abl tyrosine kinase: mechanisms for nuclear shuttling of c-Abl in response to DNA damage." *Cell Cycle* **4**(6): 777-9.
- Yung, W. K., R. E. Albright, et al. (2000). "A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse." *Br J Cancer* **83**(5): 588-93.
- Zan, Y., J. D. Haag, et al. (2003). "Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay." *Nat Biotechnol* **21**(6): 645-51.
- Zhang, H. T., X. Zhang, et al. (1997). "Relationship of p215BRCA1 to tyrosine kinase signaling pathways and the cell cycle in normal and transformed cells." *Oncogene* **14**(24): 2863-9.

-
- Zhou, Z. H., E. Akgun, et al. (2001). "Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8326-33.
- Zhu, Y. and L. F. Parada (2002). "The molecular and genetic basis of neurological tumours." Nat Rev Cancer **2**(8): 616-26.
- Zulch, K. (1979). Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organisation. Geneva.

RESUME

Signalisation et réparation des cassures double-brin de l'ADN dans les gliomes : Modulation de la réponse aux traitements chimio-radiothérapeutiques.

On compte environ 6000 nouveaux cas de tumeurs du système nerveux chaque année en France. Toutefois, les approches radio-chimiothérapeutiques actuelles contre les tumeurs cérébrales restent encore insuffisantes pour produire un index thérapeutique satisfaisant. En parallèle, la connaissance des événements radiobiologiques précoces a considérablement évolué ces dernières années. Nos travaux visent donc à donner un nouvel éclairage à la réponse moléculaire et cellulaire des tumeurs du système nerveux aux traitements radio-chimiothérapeutiques. Pour ce faire, cette thèse a été divisée en quatre étapes. Etape 1: une voie nouvelle de réparation des cassures double-brin de l'ADN dépendant de la protéine MRE11 mais indépendante de la phosphorylation de H2AX a été mise en évidence suite à une étude des artefacts de la technique d'immunofluorescence et à une analyse systématique de la radiosensibilité des cellules humaines. Etape 2: les caractéristiques radiobiologiques des 3 modèles de gliomes de rongeurs les plus utilisés en tests précliniques et de 7 lignées gliomales humaines ont été systématiquement analysées. Des dysfonctionnements de la protéine BRCA1 en réponse aux radiations ou au cisplatine ont été observés dans la majorité des modèles testés, soulevant la question du rôle de cette protéine dans les traitements anti-gliomes ainsi que dans la gliomagenèse. Etape 3: afin d'étendre notre démarche à des syndromes génétiques associés à de fortes prédispositions aux tumeurs cérébrales, les caractéristiques radiobiologiques des fibroblastes issus de patients souffrant de neurofibromatose de type 1 (NF1), pathologie associée à une forte incidence de tumeurs du système nerveux périphérique, ont été analysées. La NF1 est apparue comme un syndrome de radiosensibilité modérée, associée à une faible déficience de réparation de l'ADN par suture mais une forte activité de MRE11. Ces résultats nous ont également permis de proposer un modèle préliminaire mettant en œuvre les protéines BRCA1 et NF1. Etape 4: vu le rôle de BRCA1 dans l'inhibition de certaines tyrosine kinases et dans la réponse au cisplatine, nous avons testé l'effet radiobiologique des traitements combinant radiation, cisplatine et drogues inhibitrices de tyrosine kinases sur des modèles de gliomes humains et de rongeurs. Nos résultats encouragent fortement la personnalisation des traitements contre les tumeurs cérébrales en tenant compte de la fonctionnalité de protéines comme BRCA1, situées en amont des voies de signalisation actuellement étudiées.

MOTS CLE : Tumeurs cérébrales, rayons X, cassures double-brin, suture, recombinaison, BRCA1, inhibiteurs de protéine kinases.

ABSTRACT

Signalization and repair of the DNA double-strand breaks of in the cerebral tumors: Modulation of the radiation response with the chemotherapy treatments.

There are about 6000 new cases of nervous system tumours each year in France. However, the current radio-chemotherapeutic approaches against brain tumours remain still insufficient to produce a satisfactory therapeutic index. In parallel, the knowledge of the early radiobiological events has considerably progressed in the last few years. This thesis aims to provide new insights in the molecular and cellular response of brain tumours to radio-chemotherapy. This thesis was divided into four stages. Stage 1: a novel DNA double-strand breaks repair pathway depending on the MRE11 protein but independent of the phosphorylation of H2AX emerged from the study of artefacts of the immunofluorescence technique and a systematic analysis of the radiosensitivity of human cells. Stage 2: the radiobiological features of 3 rodent models of glioma among the most used in preclinical trials and of 7 human glioma cell lines were investigated. Functional impairments of the BRCA1 protein in response to radiation and/or cisplatin were observed in the majority of the models tested, raising the question of the role of this protein in the anti-glioma treatments and in gliomagenesis. Stage 3: in order to extend our approach to genetic syndromes associated with cerebral tumours predisposition, the radiobiological characteristics of the fibroblasts resulting from patients suffering from neurofibromatosis type 1 (NF1), a pathology associated with a strong incidence of peripheral nervous system tumours, were investigated. NF1 appeared to be a syndrome with moderated radiosensitivity, associated with a weak deficiency of DNA end-joining repair but with a strong activity of MRE11. These results enabled us to propose a preliminary model involving both proteins BRCA1 and NF1. Stage 4: considering the role of BRCA1 in the inhibition of some tyrosine kinase activity and in the response to cisplatin, we tested the radiobiological effects of treatments combining radiation, cisplatin and tyrosine kinase inhibitors to human and rodent gliomas. Our results encourage the personalization of the treatments against brain tumours by taking into account the functionality of some proteins, like BRCA1, that act upstream of the currently studied stress signalling pathways.

KEY WORDS: Cerebral tumours, X-rays, double-strand breaks, NHEJ, recombinaison, BRCA1, protéine kinase inhibitors.

Article I

Consequences of the *bleed-through* phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci.

Wendy Rénier, Aurélie Joubert, Zuzana Bencokova, Jérôme Gastaldo, Catherine Massart and Nicolas Foray

Accepté dans International Journal of Radiation Biology le 4 avril 2007.

Consequences of the *bleed-through* phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci.

Wendy Rénier^{†,‡,*}, Aurélie Joubert^{†,§,*}, Zuzanna Bencokova[†], Jérôme Gastaldo[†], Catherine Massart[†] and Nicolas Foray^{†,#}

[†]*Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France;*

[‡]*Macrocristallography Group, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France;*

[§]*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France;*

* These two authors have contributed equally to this work.

Pages: 19 including

Table: 1

Figures : 2

Keywords : Immunofluorescence; DSB repair; H2AX; MRE11; HSP70; FITC; TRITC

Indexing phrase : Bleed-through fluorescence phenomenon and nuclear foci

Author for correspondence : Dr. Nicolas Foray

Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043, Grenoble, France;

Tel : (33) 4 76 88 25 41 Fax : (33) 4 76 88 28 85

Email : foray@esrf.fr

Abstract

Purpose: By allowing the visualization of the proteins inside cells, the immunofluorescence technique has revolutionized our view of events that follow radiation response. Particularly, the formation of nuclear foci, their kinetic of appearance and disappearance, and the association-dissociation of protein partners are useful endpoints to better understand the effects of ionizing radiation. Recently, the technique based on the phosphorylation of the histone 2A family, member X (H2AX) has generated a plethora of reports concerning the interaction between the major proteins involved in DNA repair and stress signaling pathways. However, some unavoidable overlaps of excitation and emission wavelength spectra (the so-called *bleed-through* phenomenon) of the available fluorescent markers are still generating discrepancies and misinterpretations in the choreography of DNA damage response. Biases are particularly strong with the fluorescein isothiocyanate (FITC)-rhodamine couple, tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate (TRITC), the most extensively used marker.

Results: Here, two representative examples of biased co-immunofluorescence with pH2AX proteins that form radiation-induced nuclear foci or not are presented. A brief review of literature points out differences in kinetic of appearance and association-dissociation of radiation-induced pH2AX and MRE11 foci.

Conclusion: Through this report, we would like authors to consider more carefully protein co-localizations by performing systematically, before any co-immunofluorescence, immunofluorescence of each protein separately to avoid bleed-through artifacts.

1. Introduction

How radiation-induced DNA damage are repaired is one of the major questions asked by radiobiologists to better understand and predict cellular responses to radiation. Particularly, the immunofluorescence technique is becoming a valuable tool to analyze relocalization and association-dissociation of the numerous proteins involved in the cascade of the molecular events (often phosphorylations) occurring after irradiation (*e.g.* Foray, N. *et al.*, 2003; D'Amours, D. & Jackson, S.P., 2002; Nelms, B.E. *et al.*, 1998). The immunofluorescence technique is based on the hybridization of protein-antibody complexes conjugated with fluorescent markers. Fluorescent markers are excited by specific wavelengths (often in ultraviolet spectrum) and emit specific wavelengths of visible light. However, despite the efforts of manufacturers, overlaps of excitation and/or emission spectra wavelengths are generally unavoidable (Figure 1). The practical consequences of this so-called fluorescence *bleed-through* phenomenon are frequent false double-positive signals encountered in co-immunofluorescence. *Bleed-through* artifacts are notably amplified when one marker is more efficient than the other and/or in the case of autofluorescence (*e.g.* in lymphocytes). It is noteworthy that the great majority of co-immunofluorescence experiments performed to date with red and green markers (notably with fluorescein isothiocyanate (FITC) and tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) markers) favors the fluorescence *bleed-through* phenomenon since their emission spectra do overlap by a significant proportion (Figure 1). Unfortunately, description of such artifacts remains restricted to a number of technical notes provided by manufacturers while it is infrequently considered in the scientific literature.

It has been demonstrated recently that radiation-induced DNA double-strand breaks (DSB) can be detected from nuclear foci formed by phosphorylation of the histone 2A family, member X (H2AX) designated (γ H2AX) (Rothkamm, K. & Löbrich, M., 2003). While the great majority of

antibodies against proteins are generally used at 1:100 dilution, histone proteins are so abundant and available commercial antibodies against phosphorylated forms of γ H2AX are so powerful that antibody dilution generally used for anti- γ H2AX immunofluorescence is 1:800. In such conditions, radiation-induced nuclear γ H2AX foci are generally clear and distinct with a powerful signal intensity (Rothkamm, K. & Löbrich, M., 2003). To date, anti- γ H2AX immunofluorescence is becoming a very interesting tool for radiobiologists and has permitted a considerable number of co-localizations of repair proteins to be reported. Unfortunately, the success of such approaches has not stimulated studies of potential biases due to the fluorescence *bleed-through* phenomenon, particularly a problem for intense γ H2AX signals, nor procedures designed to avoid them. Consequently, a number of discrepancies observed in co-localization of DNA repair proteins forming radiation-induced nuclear foci with γ H2AX signals have appeared in the literature (*e.g.* Table 1).

During preliminary co-immunofluorescence experiments dealing with γ H2AX and a cytoplasmic protein, we observed artefactual nuclear foci likely due to the fluorescence *bleed-through* phenomenon. Even by changing a number of conditions, the phenomenon was still visible. Here are presented two representative examples of biased co-immunofluorescence: 1°) a co-immunofluorescence with γ H2AX and a cytoplasmic protein heat shock protein 70 (HSP70) that does not form radiation-induced nuclear foci; 2°) a co-immunofluorescence with γ H2AX and meiotic recombination protein 11 (MRE11) that forms radiation-induced nuclear foci but with a different rate of appearance. Consequent misinterpretations are discussed. With this report, we would like authors to consider more carefully the co-localization of proteins involved in the stress response *by performing systematically, before any co-immunofluorescence, immunofluorescence of each protein separately.*

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

The untransformed fibroblast 1BR3 cell line was described elsewhere (Foray, N. *et al.*, 1997). This cell line was chosen for its genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (97 - 99 % of cells in G0/G1) to overcome any bias generated by cell cycle effects.

2.2. X-rays irradiations

An clinical X-ray radiation source devoted to research was used to perform all irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 KV, an current of 20 mA and a 0.1 mm copper filter. The dose-rate was $1.234 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ and a dose of 2 Gy was applied in all the experiments.

2.3. Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol was described elsewhere (Foray, N. *et al.*, 2003). Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Polyclonal and monoclonal anti- γ H2AX antibodies were purchased from Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) and used at 1:800 dilution. Anti-MRE11 (Abcys, Paris, France) and anti-HSP70 (Euromedex, Mundolsheim, France) antibodies, were used at 1:100 dilution. FITC (green, mouse) and TRITC

(red, rabbit) secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and used at 1:100 dilution. Coverslips were mounted in Vectashield (Abcys) mounting solution containing 4',6-d-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Abcys).

3. Results and Discussion

3.1. Co-immunofluorescence with γ H2AX and a protein that does not form nuclear foci

Heat shock proteins (HSP) form a group containing numerous proteins whose expression increases after exposure to high temperatures and that are involved in the response to stress. Among the HSP proteins, the HSP70 protein is involved in several cellular signal transduction pathways and acts as efficient anti-inflammatory and anti-apoptotic agent (Tavaria, M. *et al.*, 1996). The HSP70 protein constitutively localizes in the cytoplasm and undergoes shuttling from the cytoplasm to the nucleus after hyperthermia and genotoxic stress (Tavaria, M. *et al.*, 1996). To our knowledge, no nuclear foci formed by HSP70 have been observed after exposure to ionizing radiation (Figure 2). By contrast, and in agreement with numerous reports (*e.g.* Rothkamm, K. & Löbrich, M., 2003), phosphorylated forms of H2AX protein relocalized as discrete and intense nuclear foci after irradiation (Figure 2). Curiously, when co-immunofluorescence is performed with both γ H2AX and HSP70 together (with FITC- and TRITC-coupled secondary antibodies, respectively), some HSP70 foci clearly appeared which overlapped γ H2AX foci (Figure 2). Since it is noteworthy that such HSP70 foci are not distinguishable in blue DAPI counterstaining, such findings are consistent with a fluorescence *bleed-through* phenomenon specific to the FITC-TRITC double staining (Figure 2). Consequently, in complete discrepancy with immunofluorescence performed separately, merged pictures from co-immunofluorescence would suggest that γ H2AX and HSP70-1 colocalize after irradiation during the repair time period (Figure 2). Similar results and conclusions were obtained by using different dilutions of antibodies and protocols or by inverting the color of FITC and TRITC secondary antibodies, suggesting that such biased co-localization does not depend upon fixation nor antibodies. Furthermore, it is noteworthy that such artifacts cannot be alleviated by confocal microscopy (data not shown).

3.2. Co-immunofluorescence with γ H2AX and a protein (*MRE11*) that form nuclear foci

MRE11, the DNA repair protein RAD50 and Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1) protein form the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex that has been shown to function as a DNA damage sensor in response to ionizing radiation (Mirzoeva, O.K. & Petrini, J.H., 2001). Three different patterns of nuclear foci formed by the MRE11 protein after irradiation have been described. Pattern I foci were described as clearly distinct foci, about 10 to 20 fold smaller than cell nuclei. Pattern II foci were more numerous (hundreds) and about 100 to 200 fold smaller than cell nuclei. Pattern III foci were described as aggregates with irregular shapes, larger than pattern I ones (Mirzoeva, O.K. & Petrini, J.H., 2001). In our experimental conditions, only pattern I MRE11 foci were observed. By subjecting irradiated 1BR3 primary fibroblasts to anti-*MRE11* immunofluorescence, nuclear foci appeared starting 2 h post-irradiation. Consequently, kinetics of appearance-disappearance of MRE11 did not overlap those of γ H2AX foci by 4 h post-irradiation (Figure 3). Conversely, a co-immunofluorescence with γ H2AX and MRE11 showed co-localization of both proteins all along the post-irradiation period tested, in complete discrepancy with immunofluorescence performed separately (Figure 3). This example is representative in that MRE11 was believed to participate in the non-homologous end joining (NHEJ) process notably on the basis of its early co-localization with γ H2AX (*e.g.* Di Virgilio, M. & Gautier, J., 2005 and references herein). Here, the association MRE11- γ H2AX can be simply explained by the fluorescence *bleed-through* phenomenon. Throughout table 1, we wanted to present representative examples of different protocols in which co-localizations of MRE11 and γ H2AX have been observed. Obviously, the studies presented in table 1 include variable experimental conditions, radiation doses, time points and different cell lines. Discrepancies between studies, notably in terms of kinetics of foci appearance and/or occurrence of co-localizations may be explained by such different endpoints. However in all the examples, similar immunofluorescence protocols

were applied. Notably, the use of the FITC-TRITC couple and the absence of any immunofluorescence performed separately were common to all the cited studies. The authors concluded that co-localization of MRE11 and γ H2AX existed for a given period whereas their conclusions may have been biased by the bleed-through phenomenon.

3.3 How to avoid the fluorescence bleed-through phenomenon?

We have stressed the fact that occurrence of *bleed-through* phenomenon is mainly dependent upon the choice of fluorescence markers whose excitation/emission spectra overlap. Hence, it is noteworthy that absence of co-localization cannot be considered as a sufficient indicator of the absence of *bleed-through*. Another important potential control would be to use cell lines lacking proteins involved with *bleed through* although certain gene mutations do not necessarily suppress all the foci. On another hand, it can be argued that the *bleed-through* fluorescence phenomenon depends upon the size of foci and/or can be readily detectable. However, the apparent size of γ H2AX foci seems to be inversely proportional to their number and artifacts described in sections 3.1 and 3.2 are independent of foci size. This is the case of co-immunofluorescence with MRE11 and RAD51 foci that are generally small (Figures 2 and 3 and data not shown). Consequently, any co-localization of foci due to *bleed-through* cannot be recognized simply by eye. It can also be argued that FITC-TRITC is the only couple of fluorescent markers that favors *bleed-through* artifacts. The emission spectra of both FITC and TRITC unavoidably overlap with 1-10% of each other (Figure 1). Furthermore, RAD51, required for the homologous recombination pathway was shown to form nuclear foci after irradiation but by co-localizing rarely with MRE11 (Mirzoeva O.K., & Petrini J.H., 2001). Such conclusions were reached with FITC-TRITC immunofluorescence, suggesting that FITC-TRITC couple is insufficient by itself *for generation of bleed-through* artifacts. Hence, a high intensity of fluorescence, due to powerful antibodies

against abundant protein, *together with* certain coupled of markers like FITC-TRITC may be responsible for such artifactual phenomenon.

How can one avoid the fluorescence *bleed-through* phenomenon? One obvious solution would be to use a lower avidity antibody but it would decrease the detectability of some events that are not concerned with the *bleed-through* phenomenon. Another solution would be to avoid the couple FITC-TRITC systematically. Despite the increasing number of new fluorescent markers, the number of primary antibodies already coupled to FITC and/or TRITC made such radical change difficult. However, the Alexa Fluor® and Cy® dyes that require maximal excitation at more than 620 nm and provide maximal emission at more than 650 nm may represent a less artifactual situation when used with fluorescein (495 and 519 nm, respectively). Another solution would be to adjust settings to achieve a good bright of color, notably by reducing noise, using band-pass filters or even by using monochromatic lamps. In their technical notes, manufacturers suggest such procedures. However, although routine procedures verifying relevance of settings should be systematically applied to fluorescence microscopes, in practice, such procedures remain insufficient to compensate for the unavoidable overlap of FITC-TRITC couple with γ H2AX signals (Figure 1). Our findings suggest, therefore, that co-immunofluorescence *together with* the use of powerful antibodies against abundant proteins generating intense fluorescent signals (like γ H2AX) may unavoidably result in fluorescence *bleed-through*. Consequently, the simplest and the most practical solution to avoid such artifacts is to perform, as a first step, immunofluorescence with each antibody *separately*. Such an approach, although involving additional work, may have the considerable advantage of revealing clearly numerous cellular events like cytoplasmic nucleo-shuttling and movements within the nucleus. However, in the particular situation where two proteins form radiation-induced nuclear foci with similar kinetics, it is possible that they do not truly colocalize while they appear clearly identifiable in independent

separate immunofluorescence. In such a case, to perform separate independent immunofluorescence will not be enough to distinguish between true and false co-localizations. Additional techniques should therefore be employed to prove the suggested interaction. Hence, further investigations are required to better understand the origins and the consequences of the *bleed-through* phenomenon.

Acknowledgements

We would like to thank Drs E.P. Malaise and V. Favaudon for fruitful discussions. W.R. is European Synchrotron Radiation Facility fellowship. A.J., Z.B. and J. G. were supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, France), Roche-Pharmaceutics-France and Région Rhône-Alpes, respectively. This work was also supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the ETOILE Project (Région Rhône-Alpes and Lyon University).

References

- D'Amours, D., Jackson, S.P., 2002, The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nature Review Molecular Cellular Biology*, **3**, 317-327.
- Bhoumik, A. Takahashi, S., Breitweiser, W., Shiloh, Y., Jones, N., and Ronai, Z., 2005, ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Molecular Cell*, **18**, 577-587.
- Foray, N., Badie, C., Arlett, C.F., Malaise, E.P., 1997, Hypersensitivity of Ataxia-telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *International Journal of Radiation Biology*, **71**, 449-450.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., *et al.*, 2003, A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. 2003. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, **22**, 2860-2871.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J. and Jackson, S.P., 2003, MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature*, **42**, 952-956.
- Joubert A., Biston, M.C., Boudou, C., Ravanat, J.L., Brochard, T., Charvet, A.M., *et al.* , 2005, Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy. *International Journal of Radiation Biology, Oncology Physics*, **62**, 1486-1496.
- Limoli, C.L., Giedzinski, E., Bonner, W.M. and Cleaver, J.E.. 2002, UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, g-H2AX formation and MRE11 relocalization. *Proceeding of National Academy of Science U S A*, **99**,233-238.
- Mirzoeva, O.K., & Petrini, J.H., 2001. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Molecular Cellular Biology*, **21**, 281-288.
- Mirzoeva, O.K., & Petrini, J.H., 2003, DNA replication-dependent nuclear dynamics of the MRE11 complex. *Molecular Cancer Research*, **1**, 207-218.
- Nelms, B.E., Maser, R.S., MacKay, J.F., Lagally, M.G., and Petrini, J.H., 1998, In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*, **280**, 590-592.
- Rothkamm, K. & Lobrich, M., 2003, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceeding of National Academy of Science U S A*, **100**, 5057-5062.

- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C., 2004, Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature*, **6**, 168-170.
- Sokolov, M.V., Smilenov, L.B., Hall, E.J., Panyutin, I.G., Bonner, W.M., and Sedelnikova, O.A., 2005, Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene*, **24**, 7257-7265.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, R.L., 1996, A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*, **1**, 23-28.

Legend to figures

Figure 1: Theoretical illustration of the *bleed-through* (BT) fluorescence overlap of both excitation (upper panel) and emission (lower panel) spectra with FITC (green) and TRITC (red) markers.

Figure 2: *Upper panel.* Representative examples of anti-*HSP70*-immunofluorescence (red TRITC staining) performed with or without anti- γ H2AX (green FITC staining) after an X-rays exposure of 2 Gy. In the case of separate immunofluorescence (x200 magnification), *HSP70* shows a radiation-induced nucleo-shuttling but no nuclear foci. In the case of co-immunofluorescence (x100 magnification), artifactual *HSP70* foci appear and disappear at the same rate as γ H2AX ones. It is noteworthy that the photo representing the 24 h post-irradiation time showed nuclear foci and was deliberately chosen to better illustrate the bleed-through phenomenon (the great majority of cells did not show a significant number of foci after this post-irradiation time). *Lower panel.* Resulting kinetics of artifactual *HSP70* foci disappearance are presented as a function of repair time. Each data plot is represented by its mean \pm standard error of at least three replicates.

Figure 3: *Upper panel.* Representative examples (x200 magnification) of anti-*MRE11*-immunofluorescence (green FITC staining) performed with or without anti- γ H2AX (red TRITC staining) after an X-rays exposure of 2 Gy. In the case of separate immunofluorescence, *MRE11* does not show any radiation-induced nuclear foci before 2 h post-irradiation. In the case of co-immunofluorescence, *MRE11* foci appear and disappear at the same rate as γ H2AX foci, notably at early times post-irradiation. *Lower panel.* Resulting kinetics of *MRE11* foci disappearance observed after separate or co-immunofluorescence

with γ H2AX are presented as a function of repair time. Each data plot is represented by its mean \pm standard error of at least three replicates

Table 1 : Representative examples of conclusions about the early radiation-induced MRE11- γ H2AX co-localization after using FITC-TRITC immunofluorescence whether performed with separate or combined staining.

References	Protocol	Maximal formation of γ H2AX foci	Maximal formation of MRE11 foci	Early MRE11- γ H2AX co-localization
Limoli, C.L. <i>et al.</i> , 2002	separate and co-immunofluorescence	30 min after 6 Gy	6-8 h after 6 Gy	no
This study	separate and co-immunofluorescence	10 min after 2 Gy	2 h after 2 Gy	no before 4 h
Mirzoeva, O.K., & Petrini, J.H.J., 2003	separate and co-immunofluorescence	-	1-2 h after 12 Gy	no before 8 h
Goldberg, M. <i>et al.</i> , 2003	co-immunofluorescence	15 min after 10 Gy	15 min after 10 Gy	yes
Sedelnikova, O.A. <i>et al.</i> , 2004	co-immunofluorescence	-	-	yes at 16 h after 1 Gy more variable at 30 min
Bhoulmik, A. <i>et al.</i> , 2005	co-immunofluorescence	3 min after 2 Gy	10 min after 2 Gy	yes
Sokolov, M. <i>et al.</i> , 2005	co-immunofluorescence	30 min after 2 Gy	30 min after 2 Gy	yes

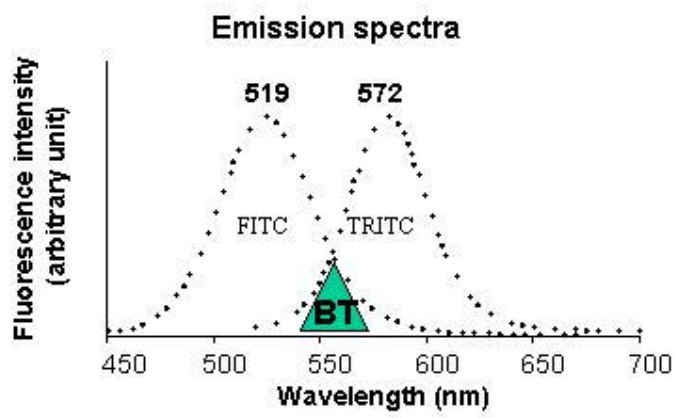
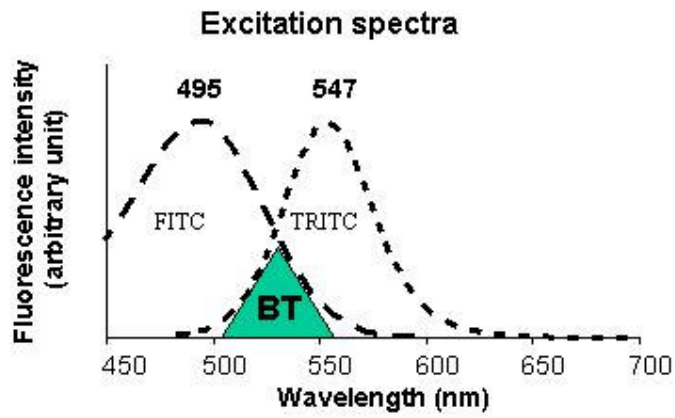


Figure 1

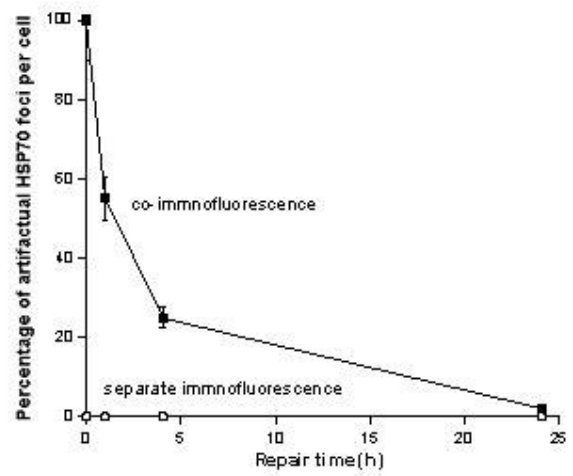
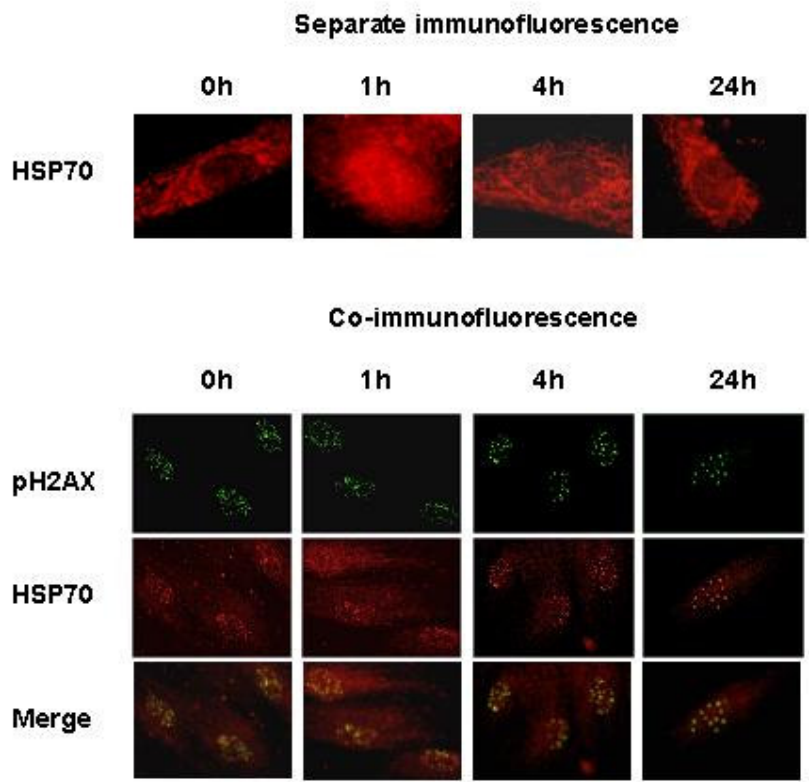


Figure 2

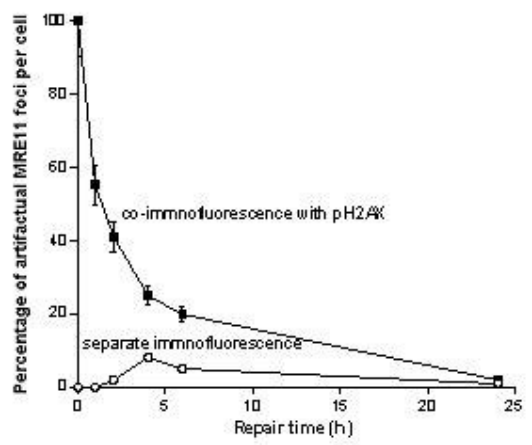
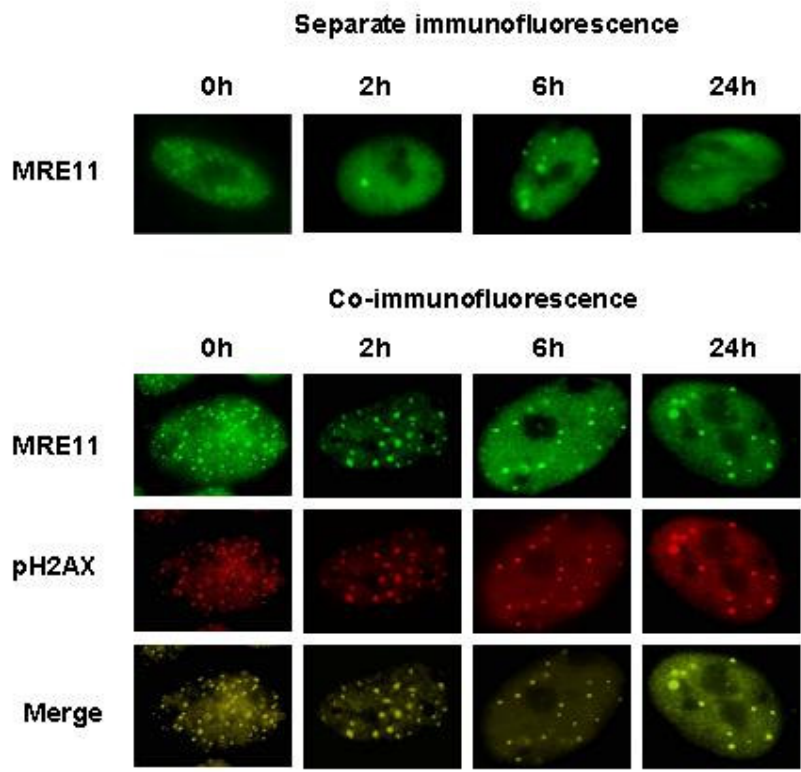


Figure 3

Article II

DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?

Aurélie Joubert, Kristin M. Zimmerman, Zuzana Bencokova, Jérôme Gastaldo, Nicole Chavaudra, Vincent Favaudon, Colin F. Arlett, and Nicolas Foray

En cours de révision depuis mars 2007.

**DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation
response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?**

Aurélie Joubert^{1,2}, Kristin M. Zimmerman¹, Zuzana Bencokova¹, Jérôme Gastaldo¹, Nicole Chavaudra³, Vincent Favaudon⁴, Colin F. Arlett⁵, and Nicolas Foray^{1*}

¹*Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France;*

²*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France;*

³*UPRES EA-2710, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif, France;*

⁴*Inserm, U612, Institut Curie, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France;*

⁵*Department of Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UP83PH, United Kingdom.*

Keywords : DSB repair ; DNA-PK; MRE11; pH2AX; radiosensitivity

Indexing phrase : Cellular radiosensitivity and DSB repair defect

Pages including Figures and Tables: 44

Figures: 5

Table: 2

*Author for correspondence: Nicolas Foray

¹*Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France;*

Tel: (33) 4 76 88 25 41 Fax : (33) 4 76 88 28 85

Email: foray@esrf.fr

Abstract

Human diseases associated with acute radiation responses are rare genetic disorders with common clinical and biological features including radiosensitivity, genomic instability, chromosomal aberrations, and frequently immunodeficiency. To determine what molecular assays are predictive of cellular radiosensitivity *whatever the gene mutation*, the existence of a *quantitative* correlation between cellular radiosensitivity and DNA double-strand breaks (DSBs) repair defects was examined in a collection of 40 human fibroblasts representing 8 different syndromes, by applying systematically a number of assays such as anti-*pH2AX*, *-pDNA-PK*, *-MRE11* immunofluorescence, plasmid transfection and pulsed-field gel electrophoresis. Survival fraction at 2 Gy was found to be inversely proportional to the amount of unrepaired DSBs, *whatever the gene mutation and the assay tested*. However, no single assay discriminates the full range of human radiosensitivity. Particularly, anti-*pH2AX* immunofluorescence does not predict well moderate radiosensitivities. At least two endpoints, namely the numbers of *pH2AX* and *MRE11* foci post-irradiation, appeared necessary to predict any human radiosensitivity. Our findings suggest the existence of an ATM-dependent interplay between DNA-PK and MRE11-dependent pathways. A classification of diseases according their cellular radiosensitivity, their molecular response to radiation and the functional assays permitting their evaluation is proposed.

1. Introduction

Occasionally, radiation therapy must be modified or abandoned if a patient exhibits acute responses to radiation. In 1981, a correlation between clinical responsiveness (quantified *in vivo* by tumour local control) and intrinsic radiosensitivity (assessed *in vitro* by clonogenic assays) has been established (1). In order to make faster the prediction of the clinical response to radiation, considerable efforts were thereafter provided to develop molecular assays (2-5). However, to collect cells from patients exhibiting various reactions to their anti-cancer treatment raises a number of practical issues. As a first step, radiobiologists have naturally focused on human genetic diseases associated with severe and acute radiation responses that share an array of common clinical and biological features like genomic instability, abnormal yields of chromosomal aberrations and immunodeficiency. This is notably the case of ataxia-telangiectasia (*ATM* mutations) (6), Nijmegen Breakage syndrome (*NBS1* mutations) (7), ataxia telangiectasia like-disorder (ATLD) (*MRE11* mutations) (8), Fanconi anemia (*FANC* genes mutations) (9), Bloom's syndrome (*BLM* mutations) (10), Xeroderma Pigmentosum (*XP* genes mutations) (11), Cockayne syndrome (*CS* genes mutations) (12), and mutations of ligase I (*LIG1*) (13) and ligase IV (*LIG4*) (14). Generally, these syndromes do not show the same radiosensitivity range. However, radiosensitivity may differ *inside a given isogenic group* (e.g. classical vs. variant *ATM* mutations) (15), and, conversely, cells with mutations of *different genes* may display similar cellular radiosensitivity (e.g. *XP* and *CS* mutations; *BLM* and *FANC* mutations) (16; 17). The development of relevant molecular assays predictive of the clinical radio-responsiveness requires a *quantified* relationship between cellular radiosensitivity and molecular endpoints. If such a relationship exists, the above remarks suggest that it is likely to be *independent of mutated genes*.

DNA double-strand breaks (DSB) and chromosome breaks (CB) are currently considered to be the key-lesions responsible for radiation-induced cell death. Hence, cells from syndromes described above have been logically presumed to be defective in DSB and CB repair and were

therefore used extensively to investigate the relationship between cellular radiosensitivity and DSB and CB repair (18). However, four major problems have limited the impact of such approach:

- the difficulty in collecting a large number of cell lines in order to thoroughly investigate the widest spectrum of cellular radiosensitivity. Furthermore, newly discovered syndromes are unavoidably represented by a less numerous cell lines (*e.g.*(14)).
- our incomplete knowledge of DSB repair pathways. Particularly, mammalian cells are believed to possess two major mechanisms for repairing DSBs, namely, homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) (19). However, since HR is only active in S-G2/M phase, this *NHEJ or else HR* paradigm cannot explain the radiosensitivity of cells in G1 that would be NHEJ-proficient.
- the plethora of techniques available to study DSB or CB repair defects which limits intercomparisons. For example, pulsed field gel electrophoresis, based on the discrimination of radiation-induced DNA fragments by their size cannot account for mis-repaired lesions. Conversely, the impact of immunofluorescence data is naturally limited to the choice of the protein investigated and the efficiency of antibodies (5).
- the real nature of a correlation between cellular radiosensitivity and DSB repair. For example, despite similar cellular radiosensitivity, the amount of unrepaired DSB appears 2-4 times higher in NHEJ-deficient than in *ATM*-mutated cells (14; 18).

Recently, it has been demonstrated that radiation-induced DSBs can be determined from the number of nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant histone H2AX (pH2AX) and easily quantifiable using immunofluorescence (20). Although successfully tested in hyper-radiosensitive cells and presented as powerful predictive assay, some preliminary data showed us that *anti-pH2AX* immunofluorescence does not necessarily predict the whole range of human radiosensitivity. Hence, again, this new tool raised the question of the impact of the choice of

molecular assays (and their specific artefacts) upon the relationship between cellular radiosensitivity and DSB repair.

Here, unlike the majority of studies focusing on mutations of one *single* gene, we have deliberately chosen to extend our investigations to the largest spectrum of radiosensitivity possible with human cells, *independently of gene mutations*. The relationship between cellular radiosensitivity, DSB and CB repair data was examined in a collection of 40 non-transformed human fibroblasts representing at least 8 different genetic syndromes. The systematic application of the most extensively used molecular assays, namely anti-*pH2AX* immunofluorescence, pulsed-field gel electrophoresis and plasmid assays allowed us to propose a *quantitative* correlation between molecular and cellular radiosensitivity that is relevant for all mammalian cells. Our findings support the point that the choice of a specific molecular assay conditions the nature of this correlation.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Forty untransformed human fibroblasts from different origins have been used. As specified in Table 1 (in supplementary data), cell lines were provided either by C.F.A, N.F. or Dr. E.P. Malaise (Institut Gustave Roussy, France). Untransformed cell lines were used for their genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (95 - 99 % of cells in G0/G1) to overcome any bias generated by cell cycle effects. Furthermore, it is noteworthy that our conditions of high-density cell culture permit us to maintain cells in plateau phase of growth even 24 h after 2 Gy. Lastly, we recall that : 1) it has been already shown that more than 20% of cells in synthesis are required to impact upon PFGE data (21); 2) by scoring nuclear foci, cells in S and G2/M phase are easily distinguishable by their abnormal high number of foci and a typical heterogeneously condensed chromatin in DAPI-staining. Hence, in our conditions, if proliferating cells exist, their impact upon final results are negligible. In agreement with previous data, the yields of spontaneous and radiation-induced apoptotic bodies were found to be negligible in all cell lines (22) (data not shown).

2.2. Irradiations

An X-rays clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 KV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 Gy.min⁻¹.

1.

2.3. Cell survival

Standard clonogenic assays were used for the assessment of intrinsic radiosensitivity. Cells in plateau phase of growth were plated either immediately (ip) or 24 h after irradiation (dp), as previously described (14). The linear-quadratic model was used to fit the survival curves. The intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2). For the correlations between molecular and cellular response to radiation, SF2dp has been deliberately chosen as an endpoint of intrinsic radiosensitivity since this parameter, that integrates the capacity of cells for repairing potentially lethal damage (PLD), was shown to better discriminates cell lines than SF2ip (23). However, since a linear link does exist between SF2dp and SF2ip of radiosensitive cells, the nature of these correlations did not change significantly by taking SF2ip as cellular endpoint (23), data not shown).

2.4. Premature chromosome condensation

The premature chromosome condensation (PCC) technique permits the measurement of CB breaks in cells in G0/G1. Briefly, cells were irradiated at 4°C and were then incubated at 37°C for repair. Chromatin condensation was generated by fusion of fibroblasts in plateau phase of growth with synchronized mitotic HeLa tumour cells by using polyethylene glycol 6000 (Sigma-France, L'Isle d'Abeau, France), as described previously (24). After hypotonic treatment, cells were fixed in methanol:acetic acid and stained with Giemsa (Sigma-France, L'Isle d'Abeau, France). At least 30 fusions were analysed by means of light microscopy. PCC data were expressed in chromosome fragments in excess (total number PCC fragments minus 46)(24).

2.5. Pulsed field gel electrophoresis

DSB induction and repair assays by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) have been fully described previously (18). Briefly, cells were labelled by tritiated thymidine as detailed elsewhere (18). Cells were irradiated at 4°C and incubated at 37°C at the indicated repair times. Agarose plugs containing 2×10^6 cells.ml⁻¹ were prepared and incubated at 50°C for 38 h in lysis solution containing L-laurylsarcosine and proteinase K (Sigma-France, L'Isle d'Abeau, France). Migration of DNA fragments was performed by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE, CHEF DRII; Bio-Rad, Hercules, CA) with a 4-day migration program discriminating the megabase-sized fragments (18). In these particular conditions, only fragments less than 15 Mb are able to migrate out of the well. DSB data were expressed as fraction of activity released (FAR) from the well.

2.6. Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere (25). Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Anti-*pH2AX* antibody was purchased from Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) and used at 1:800. Anti-*MRE11* (Abcys, Paris, France), anti-*MDC1* and-*pDNA-PK* (Abcam, Cambridge, UK) and anti-*53BP1* (Upstate-Euromedex) were used at 1:100 dilution. FITC secondary antibody was purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and used at 1:100. Coverslips were mounted in Vectashield mounting solution (Abcys) and examined with a Zeiss fluorescence microscope.

2.7. Plasmid rejoining and recombination assays

The plasmid rejoining and recombination assays were based on the transfection of linear pPHM16 and circular pTPSN vectors, respectively. The construction of the pPHM16 plasmid was detailed elsewhere (26). Briefly, the pPHM16 plasmid holds a neomycin resistance (*neo*) gene used as reporter for transfection selection and a mycophenolic acid resistance (*gpt*) gene (Figure 4D). Before transfection, the pPHM16 vector was linearized in the *gpt* gene the unique *KpnI*

restriction site. The percentage of *gpt*⁺/*neo*⁺ cells was used as an endpoint to reflect the end-joining repair capacity (26). The construction of the pTPSN plasmid was detailed elsewhere (27). Briefly, the pTPSN vector contains a *neo* gene used as reporter for transfection selection and two mutant hygromycin resistance (*hyg*) genes in which a Hind III linker was introduced either at the unique PvuI site or at a SacII site (Figure 5D). The percentage of *hyg*⁺/*neo*⁺ cells was used as an endpoint to reflect intrachromosomal hyperrecombination. Twenty µg of linear pPHM16 or circular pTPSN were transfected into five flasks containing 5x10⁶ cells each by using the calcium phosphate coprecipitation protocol followed with a glycerol shock, as previously described (27). Following transfection, cells were incubated in growth medium for 48 h. Selection of transfected cells were thereafter performed by adding 0.5 mg.ml⁻¹ G418 geneticin (Sigma-France) directly to the medium. After about 20 days, visible colonies were stained and counted. Since the transfection ratios were found to be 4.10⁻⁶ on average, experiments were repeated to reach a total of 20 *neo*-resistant colonies at least.

3. Results

3.1. *Human fibroblasts elicit a large spectrum of cellular response to ionising radiation*

The term "intrinsic radiosensitivity" describes the loss of clonogenicity after exposure to ionising radiation. The radiosensitivity of 40 quiescent human fibroblast cell lines of different origin was investigated. The survival fraction at 2 Gy (SF2) was chosen here to quantify radiosensitivity. However, correlations similar to those described below with SF2 were also obtained with the mean inactivation dose, namely \bar{D} , (data not shown) (28). Two aspects of radiosensitivity were examined: SF2 of cells seeded either immediately (immediate plating (ip)) or 24 h after irradiation (delayed plating (dp)) (23; 29). SF2ip and SF2dp values ranged from 1.3 to 53.4 % and from 3.7 to 65.6 %, respectively (Figure 1; Table1). With our collection of 40 fibroblast cell lines, three groups of radiosensitivity might be defined here (Figure 1). The radioresistant controls formed one group of SF2dp ranging from 45.2 to 65.6% (group I). The classical *ATM*-mutated and the *LIG4*-mutated cell lines formed a group of extremely radiosensitive cells with SF2dp ranging from 3.7 to 7.4% (group III). All the remaining cell lines showed intermediate radiosensitivity and formed another group (group II) significantly distinct from the two others ($p=0.03$) (Figure 1). Obviously, a larger set of data would almost certainly show a continuum (30). However, by convenience, in the frame of this study, we kept the quantified definitions of each group of radiosensitivity to determine the molecular features of each cell lines of the collection.

3.2. *Clonogenic survival is inversely proportional to unrepaired chromosome breaks*

Unrepaired chromosome breaks (CBs) are a fundamental feature of radiation-induced cell killing (18). However, all the survival data collected here were obtained from fibroblasts irradiated in plateau phase of growth while the assessment of CBs requires metaphases. To overcome cell cycle effects that occur during repair, we used the PCC technique that consists in the premature

chromosome condensation of fibroblasts irradiated in G0/G1 and fused with a mitotic donor cell (24). With the exception of the *LIG4*-mutated 180BR cell line (6.7 ± 1.5 CB scored per cell per Gy), the CB induction rate (5.4 ± 2 CB/Gy/cell) does not differ significantly from one cell line to another ($p=0.7$; data not shown). The percentage of unrepaired CBs has been measured after 6 Gy followed by 0-24 h for repair (Figure 2A). Cells from groups I, II and III defined above showed 9-11%, 12-20%, 20-42% of unrepaired CBs, respectively (Table 1). Plotting SF2dp against percentage of unrepaired CBs suggested that clonogenic survival is inversely proportional to unrepaired chromosome breaks, *regardless of the gene mutation*. The data fit indicates that the yield of unrepaired CBs leading to one lethal event is 1.2 ± 0.6 CBs per cell. Interestingly, both radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines obeyed this correlation (Figure 2B).

3.3. *Some radiosensitive cells elicit accelerated DSB repair process 2-8 h post-irradiation*

Unrepaired CBs generally reflect unrepaired DNA double-strand breaks (DSBs) that have propagated all along the cell cycle (14; 18; 24). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is one of the most extensively used techniques for assessing DSB repair (18; 22). However, since PFGE consists in discriminating radiolabelled DNA *fragments* by their size, this technique does not provide a direct measurement of the actual number of DSBs. PFGE data are conventionally expressed as fraction of activity released (FAR) (22). The FAR was assessed after 30 Gy delivered at 4°C followed by 0-24 h for repair in each cell line of the collection. It is noteworthy that the percentage of FAR remaining does not depend upon initial radiation dose and that 30 Gy are generally used to increase the number of DNA fragments to be migrated out of the well (18). FAR assessed immediately after irradiation was found similar in all cell lines and corresponds to 39 ± 3 DSBs per Gy per cell (18; 22) ($p=0.9$; data not shown), supporting that the yield of DSBs induced by radiation is not predictive of radiosensitivity. The group I cells were characterized by a nearly

complete repair after 24 h (less than 3% of FAR remaining) (Figure 2C). The group II cells exhibited DSB repair rate *faster* than radioresistant controls in the 2-8 h repair time range and *slower* after 8 h post-irradiation. By using PFGE technique, the group II cells were therefore characterized by a low but significant yield of residual DSBs, forming a group distinct from that of controls ($p < 0.05$). The group III cells elicited two different responses: the *LIG4*-mutated cells showed gross repair defect with about 40% of FAR remaining at 24 h and the *ATM*-mutated cells exhibited DSB repair rate similar to those of the group II, but with higher FAR remaining at 24 h, as reported previously (22; 24; 31) (Figure 2C; Table 1). An inverse correlation was found between SF2dp and unrepaired DSB assessed by PFGE (Figure 2D). Data fit indicated that the yield of unrepaired DSBs leading to one lethal event is 3.5 ± 1.5 DSBs per cell. Like with PCC data, the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines obeyed the same correlation. Since most of DSB repair data were confined between 0 and 10% of FAR remaining, it was therefore thought more appropriate to assess DSB repair with other techniques.

3.4. *The phosphorylation of pH2AX early after irradiation is ATM-dependent*

Recently, a one-to-one correlation was found between DSBs and nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant H2AX histone (pH2AX) (20). The anti-pH2AX immunofluorescence was applied to each cell line of the collection. In radioresistant controls, the number of pH2AX foci scored immediately after irradiation was about 40 foci per Gy per cell and the kinetics of pH2AX foci disappearance corresponded with the DSB repair rate assessed by PFGE (Figure 2C and E). Interestingly, the number of induced pH2AX foci in group II and *LIG4*-mutated cells was found to be similar to that of controls but was lower in *ATM*-mutated cells, as reported previously (31). In fact, unlike in the other cells, the pH2AX foci in *ATM*-mutated cells reached their maximum (that did not exceed 25 foci per Gy) at 4 h post-irradiation and decreased at 24 h up to an average yield of 20 (Figure 2E). Most of the group II cells showed a DSB repair

rate similar to that of radioresistant controls (Figure 3C; Table 1). Consequently, unlike with PFGE, groups I and II were not significantly distinct ($p=0.6$), suggesting that anti-*pH2AX* immunofluorescence is unable to predict the radiosensitivity of the group II cells (Figure 2F). By contrast, the kinetics of *pH2AX* foci disappearance of the *LIG4*-mutated cells overlapped the DSB repair rate assessed by PFGE, in agreement with previous study (20) (Figure 2D and F). Interestingly, the DSB repair rate in *LIG4*-mutated fibroblasts was found to be similar to that of the NHEJ-deficient human M059J glioma (*DNA-PKcs*-mutated) and the rodent *xrs6* (*Ku86*-mutated) cells, *whether assessed by anti-pH2AX immunofluorescence or PFGE* (data not shown). It is noteworthy that these three cell lines also provide identical SF2 (about 2%) (30). Altogether, these findings suggest that ATM is required for rapid phosphorylation of *pH2AX*. Furthermore, anti-*pH2AX* immunofluorescence is unable to detect the abnormally rapid DSB repair rate at early times post-irradiation with PFGE. The differences between these two techniques prompted us to investigate other markers of DSBs.

3.5. *The early autophosphorylation of DNA-PK is ATM- and LIG4-dependent*

We focused thereafter on the markers of NHEJ to confirm the NHEJ-proficiency of group II cells. After the binding of the Ku heterodimer to DNA, the recruitment of the DNA-PKcs protein leads to the activation of the DNA-PK kinase activity that contributes to phosphorylate H2AX. Thereafter, the autophosphorylation of DNA-PK, identifiable by the formation of nuclear pDNA-PK foci, triggers the release of the DNA-PK complex from DNA, facilitating subsequent steps of the NHEJ process like DNA ends ligation (32). We examined the pDNA-PK foci after 2 Gy X-rays in some representative cell lines of the collection. In 1BR3 controls, 40 pDNA-PK foci per Gy per cell were scored immediately after irradiation and their disappearance rate was found similar to that of *pH2AX* foci (Figure 3A). In radioresistant control cells, all the pDNA-PK and *pH2AX* foci colocalized throughout the time of repair (Figure 3A). The number of pDNA-PK foci

was lower in group II and *ATM*-mutated cells than in radioresistant controls and a significant delay to reach maximal occurrence was observed: 10 min in 46BR and about 4 h in AT1BR cells, respectively (Figure 3A). Interestingly, unlike with pH2AX foci, the *LIG4*-mutated 180BR cells showed also less pDNA-PK foci than controls and a delay of about 4 h to reach their maximal occurrence (Figure 3A). The pDNA-PK and pH2AX foci colocalized in a one-to-one ratio from 10 min to 24 h in 46BR and from 4 h to 24 h in AT1BR and 180BR cells (Figure 3A and C). Altogether, these findings show that the rapid (0-4 h) autophosphorylation of DNA-PK is both *ATM*- and *LIG4*-dependent whereas that of H2AX is only *ATM*-dependent. It is noteworthy that pDNA-PK foci were absent in the *DNA-PK*-mutated M059J glioma (data not shown).

As suggested by some manufacturers, antibodies against phosphorylated DNA-PK forms may recognize also the 53BP1 protein, known as an early actor of the radiation response (33). In order to overcome any potential artefact of the *anti-pDNA-PK* immunofluorescence, irradiated 1BR3 control fibroblasts were subjected to anti-53BP1 immunofluorescence. Interestingly, 10 min after 2 Gy, only 15 53BP1 foci were observed (80 was scored with pDNA-PK antibodies). The yield of 53BP1 foci reached their maximum (that did not exceed 40 foci per Gy) at 1 h post-irradiation and decreased progressively at 24 h up to an average yield of 3 foci. Conversely, the rate of disappearance of 53BP1 was found to be similar to that of pDNA-PK in the 4-24 h post-irradiation range. These findings suggest therefore that the *anti-pDNA-PK* antibodies used in this study cannot recognize phosphorylated 53BP1 forms in the 0-4 h repair range, at least (data not shown).

3.6. *The early phosphorylation of MDC1 is ATM- and LIG4-dependent*

MDC1/NFBD1 is a nuclear factor holding FHA and BRCT domains and an early participant of DNA damage signalling pathways. MDC1 was shown to colocalize with pH2AX and regulate the autophosphorylation of DNA-PK (34; 35). Hence, since MDC1 may be considered as a NHEJ actor, we examined the MDC1 foci after 2 Gy X-rays in some representative cell lines of the collection.

Surprisingly, the number of MDC1 foci assessed immediately after irradiation was found to be about two times lower than pH2AX and pDNA-PK foci in 1BR3 radioresistant controls (about 24 foci per Gy per cell). Conversely, in these cells, the *rate* of MDC1 foci disappearance was found to be similar to that of pH2AX and pDNA-PK (Figure 3B). In the other cell lines investigated, the number of MDC1 foci assessed immediately after irradiation was found two times lower than with pH2AX and a delay in MDC1 foci occurrence was observed (about 10 min in 46 BR and 1h in both *ATM*- and *LIG4*-mutated cell lines) (Figure 3B). From 4 h post-irradiation, MDC1 foci colocalized in a one-to-one ratio with pH2AX and pDNA-PK foci all along the DSB repair process (Figure 3B). Interestingly, 53BP1 and MDC1 foci do not colocalize one-to-one, suggesting that the kinetic of phosphorylation of 53BP1 does not follow that of MDC1, pH2AX and pDNA-PK early post-irradiation and supporting again the specificity of both anti-*pDNA-PK* and *53BP1* antibodies used here (data not shown). Persistent MDC1 foci (scored at 24 h) provide similar quantitative data as compared to that of pDNA-PK and pH2AX foci. It is noteworthy that the NHEJ-defective 180BR and M059J cells showed similar kinetics of MDC1 and pH2AX foci disappearance with about 30 persistent foci at 24 h post-irradiation (data not shown). Altogether, these data suggest that the persistence of pH2AX, pDNA-PK and MDC1 foci predicts preferentially the radiosensitivity of NHEJ-deficient cells but not that of the group II cells. Conversely, the accelerated DSB repair rate observed with PFGE in group II cells and in *ATM*-mutated ones, appeared to be independent of the rapid phosphorylation of H2AX, DNA-PK and MDC1.

3.7. Defects in DNA end-joining correlates with persistent pH2AX, pDNA-PK and MDC1 foci

Molecular assays consisting in incubating linearized plasmids into cell extracts or in transfecting them into proliferating cells have long been used for assessing the DNA joining capacity of potentially radiosensitive cells. Notably, such assays were successfully used with

ATM-mutated cells and were proposed to be used in routine as predictive assays (26; 36). To further investigate the assumption that the persistence of pH2AX, pDNA-PK and MDC1 foci mainly accounts for NHEJ impairments, representative cell lines of the collection were subjected to an *in vivo* DNA end-joining plasmid assay. Briefly, one DSB was introduced in the *gpt* gene of the pPHM16 plasmid while the *neo* gene was used as reporter (Figure 4D). Such linearized plasmid was transfected into cells as detailed in Materials and Methods. The percentage of *gpt*⁺/*neo*⁺ cells was used as an endpoint to reflect the end-joining repair capacity (26). The group II cells showed percentages of *gpt*⁺/*neo*⁺ cells that were not statistically different from those of radioresistant controls. By contrast, 180BR cells did not rejoin any linearized transfected plasmid, similar to M059J cells (Figure 4D and data not shown). The percentages of *gpt*⁺/*neo*⁺ *ATM*-mutated cells were found to be intermediate. The DNA end-joining repair capacity correlated with the yields of persistent pH2AX, pDNA-PK foci and MDC1 ($p < 0.01$) (Figure 4D).

3.8. *The group II cells are characterized by absent MRE11 foci*

All the above findings suggested that the group II cells appeared NHEJ-proficient whereas they showed significant radiosensitivity in G0/G1. In agreement with authors reporting that RAD51-dependent recombination pathway target only S-G2/M cells, no radiation-induced RAD51 foci was detected in fibroblasts of the collection (data not shown). Hence, in clear discrepancy with the *NHEJ or else HR* paradigm, radiosensitivity of group II cells should be explain by an alternative DBS repair pathway, different from NHEJ and HR. In 2001, Mirzoeva and Petrini pointed out the existence of different patterns of nuclear foci formed by the MRE11 protein. Pattern I foci were described as clearly distinct foci, about 10 to 20 fold smaller than cell nuclei. Pattern II foci were more numerous (hundreds) and about 100 to 200 fold smaller than cell nuclei. Pattern III foci were described as aggregates with irregular shapes, larger than pattern I ones (37; 38). Interestingly, our preliminary experiments in radioresistant group I fibroblasts revealed that the pattern I MRE11

foci appeared after 2 Gy from 2 to 8 h (Figure 5A). The striking temporal coincidence between the occurrence of MRE11 foci and the accelerated DSB repair rate observed with PFGE prompted us to examine pattern I MRE11 foci after exposure to radiation in representative cell lines of the collection (Figure 5B). The group II and *ATM*-mutated cells showed either absent or rare pattern I MRE11 foci (Figure 5C). By contrast, the *LIG4*-mutated cell lines showed significantly *more* MRE11 foci than controls. Interestingly, abnormally high number of MRE11 foci was also observed in the NHEJ-deficient M059J cells (Figure 5C). In control cells, unlike pDNA-PK and pH2AX, MRE11 foci colocalized one-to-one with pDNA-PK only from 4 h post-irradiation in control cells (Figure 5B).

3.9. Hyperrecombination correlates with absence of MRE11 foci

An accelerated DSB repair rate like that observed in group II and *ATM*-mutated cells would reflect a *deregulation* rather than an *absence* of DSB repair. Among possible DSB repair impairments, hyperrecombination is an accelerated illegitimate repair process that is linked to the generation of errors and to high cancer susceptibility (27; 39-41). Interestingly, the MRE11 protein was demonstrated to possess endo- and exo-nuclease activity, generally required for a *recombination-like* repair process (42). In order to investigate a potential correlation between impairment of MRE11 foci, accelerated DSB repair rate and spontaneous intraplasmidic hyperrecombination, an *in vivo* plasmid assay was used as indicated in Materials and Methods. Briefly, the pPTSN plasmid holds the *neo* reporter gene and two copies of the *hyg* gene but with two different mutations (Figure 5D). Circular pPTSN plasmid molecules were transfected and the percentage of *hyg*⁺/*neo*⁺ cells was used as an endpoint for hyperrecombination (27). While radioresistant control fibroblasts showed weak percentages of *hyg*⁺/*neo*⁺ cells, the group II and *ATM*-mutated cells elicited the highest values. The 180BR cells showed a recombination ratio similar to those of controls (Figure 5D). A correlation appeared between recombination ratios and

percentage of FAR remaining at 6 h: the higher the recombination ratios, the lower the FAR remaining at 6 h, the lower the number of MRE11 foci at 6 h ($p>0.01$) (Figure 5D). Altogether, these findings suggest that absent MRE11 foci may characterise syndromes associated with high cancer-proneness and hyperrecombination, as observed in group II and *ATM*-mutated cells.

4. Discussion

4.1. Purpose of this study: to predict all the range of human cellular radiosensitivity

Although numerous proteins are implicated in different DNA repair processes, some mutations of different genes may be associated with the same radiosensitivity. We examined therefore whether a *quantitative* relationship exists between DSB repair and clonogenic survival, *independently of gene mutations*, in order to determine the most relevant assays predictive of cellular radiosensitivity. To this aim, the most extensively used molecular assays were applied to a wide radiosensitivity range. Three types of DSB repair defects were observed in human *quiescent* cells, *i.e.* independently of the RAD51-dependent HR active in S-G2/M:

- a defect in DNA-PK-dependent NHEJ defect leading to severe radiosensitivity (SF2dp < 7.4% in this study). Such defect, associated with a slow DSB repair rate, is predicted by abnormally high yields of residual DSBs assessed with PFGE, anti-*pH2AX*, anti-*pDNA-PK* immunofluorescence and DNA end-joining plasmid assay. Abnormally high yields of MRE11 foci are observed in such conditions.
- a defect in an MRE11-dependent pathway leading to a moderate radiosensitivity (7.4<SF2dp<65.6% in this study). Such defect is predicted by an accelerated DSB repair rate in the first 8 h post-irradiation with PFGE, a cytoplasmic localization and/or absence of radiation-induced nuclear foci MRE11 and abnormally high spontaneous (hyper)recombination rates. Such defect is poorly detected by anti-*pH2AX* and anti-*pDNA-PK* immunofluorescence.
- the classical *ATM*-mutations combine both defects, explaining for the first time why yields of residual DSBs may have appeared intermediate in *ATM*-mutated cells despite the most severe radiosensitivity encountered in humans (5; 43) (see also below).

4.2. *Unrepaired DNA damage and cellular radiosensitivity.*

Here, 40 fibroblast cell lines have been gathered to analyse one of the largest spectrum of intrinsic radiosensitivity investigated in human fibroblasts. Cells were originated from the major syndromes associated with radiosensitivity (6; 7; 9-13) and from some radiosensitive patients suffering from still unidentified syndromes (like 84BR cells). Unfortunately, neither *WRN*, *MRE11*-, *ARTEMIS*- or *XLFI*-mutated fibroblasts were available when our study began (8; 44-46). Clonogenic survival appeared to be inversely proportional to the yield of unrepaired DSBs and CBs. These correlations remain significant, even when controls and *group III* cell lines are excluded. Our findings indicate that the yield of unrepaired DNA damage leading to one lethal event is 1.2 ± 0.6 CBs and 3.5 ± 1.5 DSBs per cell, in agreement with the concept that one chromosome fragment causing death originates from one (terminal deletion) or two intrachromosomal DSBs (interstitial deletion or ring). In 1987, Cornforth and Bedford concluded that one unrepaired CB per cell is sufficient for cell killing but their result was obtained from only one cell line (47). Our findings show that this correlation is relevant for human fibroblasts, *whatever their genotype and the technique used*. Rodent cell lines also obey this correlation, suggesting its relevance for any mammals. It is also noteworthy that human tumours obey also this correlation but with a wider radiosensitivity range than fibroblasts and with a larger tolerance for residual DSBs (5; 30).

4.3. *Specificity of techniques assessing DSBs*

Our findings suggest that the technique may highlight some *particular steps* of the process of DNA repair. Consequently, impairments in a specific molecular step of the DNA repair process may not be detected by all the techniques. For example, the DSB repair rate of radioresistant controls and *LIG4*-mutated cell lines does not change when using neutral elution, PFGE or anti-*pH2AX* immunofluorescence (18; 20). Conversely, the radiosensitive group II cells exhibit an

apparently normal DSB repair when analysed with anti-*pH2AX* immunofluorescence. When NHEJ defects and hyperrecombination are concomitant, the choice of the technique is still more crucial. Data provided by techniques based on the discrimination of DNA fragments by their size like PFGE, comet assay and neutral elution result in these two antagonistic phenomena: when NHEJ is deficient, DSB repair curves describe a plateau; when hyperrecombination occurs, DSB repair curves tend to the X-axis. Hence, NHEJ defects and hyperrecombination occurring concomitantly may hid DSBs *effectively involved* in cell death (18; 22). This is notably the case of *ATM*-mutated cells that show yields of unrepaired DSBs about 2-4 times lower than *LIG4*-mutated cells when analysed with PFGE, despite similar cellular radiosensitivity (22; 24; 31).

4.4. An *MRE11*-dependent repair pathway as an alternative to NHEJ in G0/G1?

The RAD51-dependent HR process is commonly considered to be an alternative to NHEJ. However, most of the models describe an interplay between NHEJ and RAD51-dependent HR *throughout cell cycle* and the RAD51-dependent process is active only in S-G2/M (48-51). Our experiments were performed in quiescent fibroblasts and no RAD51 foci were detected (data not shown). Consequently, radiosensitivity in G0/G1 cannot be attributed to any defect of RAD51-dependent HR process. Among the other DSB repair proteins, MRE11 appeared to be a good candidate to participate in an alternative repair pathway active in G0/G1 since: 1) MRE11 does not colocalize neither with RAD51 (38); 2) MRE11 exhibits nuclease activities required for a recombination-like process, which is independent of cell cycle (52); 3) a hyperrecombination phenotype was previously reported in yeasts mutated in MRE11 and its protein partners (53; 54); 4) there is a striking temporal coincidence between the occurrence of MRE11 foci and the accelerated repair rate observed with PFGE. Interestingly, *ATM*-mutated cells and cells from BLM, FANC, NBS1 and syndromes (that belong to group II) elicit aberrant MRE11 foci (55; 56). This observation has been also extended to some XP cells and notably some *XPD*-mutated cells

showing moderate radiosensitivity (Joubert *et al*, in preparation). Some authors have however proposed that MRE11 participates to the NHEJ pathway, notably on the base of *co-immunofluorescence* observations showing that MRE11 and pH2AX co-localize early after irradiation. Nevertheless, the involvement of MRE11 in the NHEJ process is still controversial (57). Furthermore, our findings shown here are based on *separate* immunofluorescence and we have suggested recently that co-immunofluorescence of pH2AX and MRE11 may introduce biases due to the bleed-through fluorescence phenomenon (Renier *et al*, in revision).

Interestingly, hyperrecombination, spontaneous breaks, abnormally large nuclei and *absent* or *rare* MRE11 foci are common features of group II syndromes and *ATM*-mutated cells (6; 9-11). Such common phenotype may support therefore an *uncontrolled* nuclease activity of MRE11 occurring in absence of ATM, FANC, BLM, and/or XPD proteins, leading to genomic instability, cancer proneness, spontaneous breaks and chromatin relaxation but to a moderate impact upon cellular response to radiation (*moderate* radiosensitivity). Although this hypothesis requires further investigations to be verified, our findings suggest the existence of an MRE11-dependent repair recombination-like process that acts in G0/G1 in parallel to NHEJ.

4.5 An ATM-dependent switch between NHEJ and MRE11-dependent DSB repair pathway?

The absence of pH2AX and pDNA-PK foci in *ATM*-mutated cells early after irradiation is not consistent with the hypothesis that DNA-PK and ATM participate together, all along the repair process, in a redundant manner to phosphorylate H2AX for any repair times (58). By contrast, the requirement of ATM and LIG4 for the early autophosphorylation of DNA-PK supports that ATM acts upstream the early NHEJ machinery and that LIG4 stabilizes DNA-PK before its release from DNA (59). Since ATM is required for MRE11 foci formation, ATM acts also upstream the MRE11-dependent repair pathway. Interestingly, an excess of MRE11 foci was systematically observed in NHEJ-deficient cells, in agreement with preliminary observations in *LIG4*-mutated

cells in other NHEJ-deficient cells like M059J or xrs rodent mutants and after treatments to cis-platin and iodides, that are known to be NHEJ inhibitors (37; 38; 60; 61). These findings are therefore consistent with a model in which ATM mediates a *switch* between NHEJ and the MRE11-mediated repair pathway (Figure 5). When NHEJ is impaired, this *ATM*-dependent switch permits some DSBs to be repaired by MRE11-dependent pathway, leading to an excess of MRE11 foci. Since NHEJ is the major DSB repair pathway in mammals, such impairment leads anyway to an excess of unrepaired DNA fragments and *extreme* radiosensitivity, as predicted by PFGE or anti-*pH2AX* immunofluorescence. Conversely, the impairment of the MRE11-mediated pathway (like group II cells) leads to absent MRE11 foci, causing cancer-prone hyperrecombination and *moderate* radiosensitivity. This defect is not observed by anti-*pH2AX* immunofluorescence. Lastly, in *ATM*-mutated cells, few DSBs are repaired by an impaired NHEJ and the rescue to the MRE11-dependent pathway cannot be triggered, leading to both severe radiosensitivity and cancer-prone hyperrecombination.

4.6. Three groups of radiosensitivity: a tentatively proposed model

In this study, radiobiological features of 40 human fibroblast cell lines were systematically studied, representing one of the widest investigations of human radiosensitivity. For the first time, molecular and cellular response of different syndromes as different as XP, CS, LIG1, LIG4, ATM,... could be compared. Obviously, the definition of the three groups tentatively proposed in Table 2 is provisional and conditioned to the extension of additional cell lines, notably heterozygotes. Recent data from skin biopsies providing from patients with overacute response to radiotherapy are however confirming our assumptions. Further investigations will be required to verify such a model that may provide a more coherent overview of the molecular basis of cellular radiosensitivity of human cells, independently of genotype and by taking into account the specificities of techniques assessing DSBs.

Acknowledgements

We would like to thank Drs P.A Jeggo and Dr. E.P Malaise, for fruitful discussions. A.J. was supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, France). This work was also supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the ETOILE Project (Région Rhône-Alpes and Lyon University).

References

1. B. Fertil and E. P. Malaise, Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **7**, 621-629 (1981).
2. W. Budach, J. Classen, C. Belka and M. Bamberg, Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity. *Strahlenther Onkol.* **174 Suppl 3**, 20-24 (1998).
3. N. E. Crompton, M. Ozsahin, P. Schweizer, B. Larsson and U. M. Luetolf, Theory and practice of predictive assays in radiation therapy. *Strahlenther Onkol.* **173**, 58-67 (1997).
4. L. J. Peters, W. A. Brock, T. Johnson, R. E. Meyn, P. J. Tofilon and L. Milas, Potential methods for predicting tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **12**, 459-467 (1986).
5. A. Joubert and N. Foray, Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, Progress and Controversies. In *In: New Research on DNA Repair* (B. R. Landseer ed.). Nova Science Publishers, Inc, 2006.
6. K. Savitsky, A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D. A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, et al., A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* **268**, 1749-1753 (1995).
7. P. M. Girard, N. Foray, M. Stumm, A. Waugh, E. Riballo, R. S. Maser, W. P. Phillips, J. Petrini, C. F. Arlett and P. A. Jeggo, Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res.* **60**, 4881-4888 (2000).
8. G. S. Stewart, R. S. Maser, T. Stankovic, D. A. Bressan, M. I. Kaplan, N. G. Jaspers, A. Raams, P. J. Byrd, J. H. Petrini and A. M. Taylor, The DNA double-strand break

- repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*. **99**, 577-587 (1999).
9. M. Grompe and A. D'Andrea, Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet*. **10**, 2253-2259 (2001).
 10. J. German, Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)*. **72**, 393-406 (1993).
 11. J. E. Cleaver, Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer*. **5**, 564-573 (2005).
 12. G. Spivak, The many faces of Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 15273-15274 (2004).
 13. D. E. Barnes, A. E. Tomkinson, A. R. Lehmann, A. D. Webster and T. Lindahl, Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cell*. **69**, 495-503 (1992).
 14. C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, G. E. Pantellias, R. Okayasu, N. Cheong, N. S. Russell, A. C. Begg, C. F. Arlett, et al., Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res*. **55**, 1232-1234 (1995).
 15. A. M. Taylor, P. J. Byrd, C. M. McConville and S. Thacker, Genetic and cellular features of ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Biol*. **65**, 65-70 (1994).
 16. P. J. Deschavanne, D. Debieu, B. Fertil and E. P. Malaise, Re-evaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. **50**, 279-293 (1986).
 17. P. J. Deschavanne and B. Fertil, A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **34**, 251-266 (1996).

18. N. Foray, C. F. Arlett and E. P. Malaise, Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look. *Biochimie*. **79**, 567-575 (1997).
19. G. C. Smith and S. P. Jackson, The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*. **13**, 916-934 (1999).
20. K. Rothkamm, and M. Lobrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 5057-5062 (2003).
21. S. Mateos, A. T. Gordon, G. G. Steel and T. J. McMillan, Cell-cycle variation in DNA migration in pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol*. **69**, 687-693 (1996).
22. N. Foray, A. Priestley, G. Alsbeih, C. Badie, E. P. Capulas, C. F. Arlett and E. P. Malaise, Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol*. **72**, 271-283 (1997).
23. P. J. Deschavanne, B. Fertil, N. Chavaudra and E. P. Malaise, The relationship between radiosensitivity and repair of potentially lethal damage in human tumor cell lines with implications for radioresponsiveness. *Radiat Res*. **122**, 29-37 (1990).
24. C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, B. Cedervall, N. Chavaudra, G. Pantelias, C. Arlett and E. P. Malaise, Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat Res*. **144**, 26-35 (1995).
25. N. Foray, D. Marot, A. Gabriel, V. Randrianarison, A. M. Carr, M. Perricaudet, A. Ashworth and P. Jeggo, A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J*. **22**, 2860-2871 (2003).

26. J. Thacker, The use of integrating DNA vectors to analyse the molecular defects in ionising radiation-sensitive mutants of mammalian cells including ataxia telangiectasia. *Mutat Res.* **220**, 187-204 (1989).
27. T. Tsujimura, V. M. Maher, A. R. Godwin, R. M. Liskay and J. J. McCormick, Frequency of intrachromosomal homologous recombination induced by UV radiation in normally repairing and excision repair-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 1566-1570 (1990).
28. B. Fertil, H. Dertinger, A. Courdi and E. P. Malaise, Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res.* **99**, 73-84 (1984).
29. B. Fertil and E. P. Malaise, Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **11**, 1699-1707 (1985).
30. N. Chavaudra, J. Bourhis and N. Foray, Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother Oncol.* **73**, 373-382 (2004).
31. M. Kuhne, E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P. A. Jeggo and M. Lobrich, A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **64**, 500-508 (2004).
32. Q. Ding, Y. V. Reddy, W. Wang, T. Woods, P. Douglas, D. A. Ramsden, S. P. Lees-Miller and K. Meek, Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* **23**, 5836-5848 (2003).

33. T. A. Mochan, M. Venere, R. A. DiTullio, Jr. and T. D. Halazonetis, 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 945-952 (2004).
34. G. S. Stewart, B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor and S. J. Elledge, MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*. **421**, 961-966 (2003).
35. Z. Lou, B. P. Chen, A. Asaithamby, K. Minter-Dykhouse, D. J. Chen and J. Chen, MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. *J Biol Chem*. **279**, 46359-46362 (2004).
36. P. Baumann and S. C. West, DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 14066-14070 (1998).
37. O. K. Mirzoeva, and J. H. Petrini, DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol*. **21**, 281-288 (2001).
38. R. S. Maser, K. J. Monsen, B. E. Nelms and J. H. Petrini, hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. **17**, 6087-6096 (1997).
39. B. Thyagarajan, M. McCormick-Graham, D. P. Romero and C. Campbell, Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. **24**, 4084-4091 (1996).
40. C. M. Luo, W. Tang, K. L. Mekeel, J. S. DeFrank, P. R. Anne and S. N. Powell, High frequency and error-prone DNA recombination in ataxia telangiectasia cell lines. *J Biol Chem*. **271**, 4497-4503 (1996).
41. M. S. Meyn, High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science*. **260**, 1327-1330 (1993).
42. D. D'Amours and S. P. Jackson, The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**, 317-327 (2002).

43. N. Foray, C. Badie, C. F. Arlett and E. P. Malaise, Comments on the paper: the ATM gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol.* **71**, 449-450 (1997).
44. P. Ahnesorg, P. Smith and S. P. Jackson, XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell.* **124**, 301-313 (2006).
45. E. Riballo, M. Kuhne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, et al., A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell.* **16**, 715-724 (2004).
46. A. Ozgenc and L. A. Loeb, Current advances in unraveling the function of the Werner syndrome protein. *Mutat Res.* **577**, 237-251 (2005).
47. M. N. Cornforth, and J. S. Bedford, A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res.* **111**, 385-405 (1987).
48. C. Allen, A. Kurimasa, M. A. Brenneman, D. J. Chen and J. A. Nickoloff, DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 3758-3763 (2002).
49. K. Rothkamm, I. Kruger, L. H. Thompson and M. Lobrich, Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* **23**, 5706-5715 (2003).
50. D. Udayakumar, C. L. Bladen, F. Z. Hudson and W. S. Dynan, Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* **278**, 41631-41635 (2003).

51. C. Allen, J. Halbrook and J. A. Nickoloff, Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res.* **1**, 913-920 (2003).
52. L. K. Lewis, F. Storici, S. Van Komen, S. Calero, P. Sung and M. A. Resnick, Role of the nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 in repair of DNA double-strand breaks in mitotic cells. *Genetics.* **166**, 1701-1713 (2004).
53. R. E. Malone, T. Ward, S. Lin and J. Waring, The RAD50 gene, a member of the double strand break repair epistasis group, is not required for spontaneous mitotic recombination in yeast. *Curr Genet.* **18**, 111-116 (1990).
54. E. L. Ivanov, V. G. Korolev and F. Fabre, XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics.* **132**, 651-664 (1992).
55. A. Franchitto and P. Pichierri, Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. *J Cell Biol.* **157**, 19-30 (2002).
56. A. Franchitto and P. Pichierri, Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex. *Hum Mol Genet.* **11**, 2447-2453 (2002).
57. M. Di Virgilio and J. Gautier, Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J Cell Biol.* **171**, 765-771 (2005).
58. T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich and P. A. Jeggo, ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* **64**, 2390-2396 (2004).

59. C. Kuhne, M. L. Tjornhammar, S. Pongor, L. Banks and A. Simoncsits, Repair of a minimal DNA double-strand break by NHEJ requires DNA-PKcs and is controlled by the ATM/ATR checkpoint. *Nucleic Acids Res.* **31**, 7227-7237 (2003).
60. A. Joubert, M. C. Biston, C. Boudou, J. L. Ravanat, T. Brochard, A. M. Charvet, F. Esteve, J. Balosso and N. Foray, Irradiation in presence of iodinated contrast agent results in radiosensitization of endothelial cells: consequences for computed tomography therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **62**, 1486-1496 (2005).
61. M. C. Biston, A. Joubert, J. F. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A. M. Charvet, F. Esteve, N. Foray and J. Balosso, Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res.* **64**, 2317-2323 (2004).

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: Surviving fractions after 2 Gy (SF2). Survival curves of each fibroblast cell line of the collection were obtained from three independent experiments at least after immediate (ip) and delayed (24h) (dp) plating (data not shown). SF2dp were plotted against the corresponding SF2ip and data were fitted to a polynomial formula ($SF2dp = 2.65 SF2ip - 0.0616 SF2ip^2$; $r = 0.95$; $p < 0.005$) (solid line). Three significantly distinct groups of cells lines were defined (dotted lines confidence zones). Open squares represent the data from the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines.

Figure 2: Cellular radiosensitivity, unrepaired chromosome breaks (CBs) and unrepaired DNA double-strand breaks (DSB). (A). Representative examples of CB repair curves. Cells were irradiated at 4°C (6 Gy) and incubated at 37°C for the indicated repair times. Percentage of excess chromosome fragments (ECF) remaining was plotted against repair time (1BR3: closed circles; 46BR: open losanges; AT1BR: open squares and 180BR: closed inversed triangles). Each data plot represents the mean of at least three independent experiments. (B). Cellular radiosensitivity (SF2dp) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of excess chromosome fragments (ECF) remaining at 24 h post-irradiation. Data were fitted to an inverse formula ($SF2dp = 100 / (\%ECF_{24h} - 5) + 1$; $r = 0.8$; $p < 0.03$) (solid line) and a smooth fit (dotted line). Open squares represent the data from the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines. (C). Representative examples of DSB repair curves obtained with PFGE. Cells were irradiated at 4°C (30 Gy) and incubated at 37°C for the indicated repair times. Percentage of FAR remaining was plotted against repair time (1BR3: closed circles; 46BR: open losanges; AT1BR: open squares and 180BR: closed inversed triangles). Each data plot represents the mean of at least three independent experiments. (D). Cellular radiosensitivity (SF2dp) was

found to be inversely proportional to the corresponding percentage of FAR remaining at 24 h post-irradiation ($SF2dp = 100 / (\%FAR_{24\text{ h}} + 0.5) - 1$; $r = 0.78$; $p < 0.03$) (solid line). Open squares represent the data from the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines. **(E)**. Representative examples of DSB repair curves obtained with anti-*pH2AX* immunofluorescence. Cells were irradiated at 4°C (2 Gy) and incubated at 37°C for the indicated repair times. Numbers of pH2AX foci remaining was plotted against repair time (1BR3: closed circles; 46BR: open losanges; AT1BR: open squares and 180BR: closed inversed triangles). Each data plot represents the mean of at least three independent experiments. **(F)**. Cellular radiosensitivity (*SF2dp*) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of pH2AX foci remaining at 24 h post-irradiation ($SF2dp = 100 / (pH2AX_{24\text{ h}} + 1) - 1$; $r = 0.76$; $p < 0.03$) (solid line). Percentages of pH2AX foci at 24 h post-irradiation were calculated by dividing repair data by 80 (number of pH2AX foci scored immediately after 2 Gy for all cell lines except *ATM*-mutated cell lines) (open circles). The percentages of pH2AX foci at 24 h post-irradiation in *ATM*-mutated cell lines were also calculated by dividing repair data by 43 (maximal number of pH2AX foci in *ATM*-mutated cell lines reached at 4 h post-irradiation) (closed circles). Cell lines concerned by this calculation are either from *classical* AT (AT1BR, AT2EM, AT4BI, AT5BI, AT2BR) or variant AT patients (AT5BR2, AT6BI, 290BR). Open squares represent the data from the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines.

Figure 3: Persistent pDNA-PK and MDC1 foci and DNA end-joining. **(A)**. Upper panel. Kinetics of pDNA-PK foci disappearance after exposure to X-rays (2 Gy). Numbers of pDNA-PK foci were plotted against repair time (1BR3: closed circles; 46BR: open losanges; AT1BR: open squares and 180BR: closed inversed triangles). Each data plot represents the mean of at least two independent experiments. Lower panel. Colocalization of pH2AX and pDNA-PK in 1BR3 cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to repair at the indicated times. **(B)**. **Upper panel.**

Kinetics of MDC1 foci disappearance after exposure to X-rays (2 Gy). Numbers of MDC1 foci were plotted against repair time (1BR3: closed circles; 46BR: open losanges; AT1BR: open squares and 180BR: closed inversed triangles). Lower panel. Colocalization of pH2AX and MDC1 in 1BR3 cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to 4 h repair. **(C)**. Colocalization of pH2AX and pDNA-PK in AT1BR and 180BR cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to 4 h repair **(D)**. Description of the pPHM16 plasmid used for *in vivo* DNA end-rejoining plasmid assay. The pPHM16 plasmid holds a neomycin resistance (*neo*) gene used as reporter for transfection selection and a mycophenolic acid resistance (*gpt*) gene. The *gpt* gene sequence holds two unique restriction enzyme KpnI and EcoRV sites (right panel). The percentage of *gpt*⁺/*neo*⁺ cells was found to be inversely proportional to the corresponding yield of pH2AX (open circles), pDNA-PK (closed losanges) and MDC1 (closed triangles) foci remaining after 24 h post-irradiation. Data were fitted to a linear formula: % *gpt*⁺/*neo*⁺ = 69.93 - 1.96 pH2AX_{24 h}; r+0.96; p<0.01 (solid line). Open squares represent the data from the rodent radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 cell lines.

Figure 4: MRE11 foci and hyperrecombination. **(A)**. Representative localization of the MRE11 protein in 1BR3 cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to the indicated repair times. **(B)**. Upper panel. Kinetics of MRE11 foci disappearance after exposure to X-rays (2 Gy). Numbers of MRE11 foci were plotted against repair time (1BR3: closed circles; 180BR: closed inversed triangles and DNA-PK-mutated MO59J glioma tumors: inversed open triangles). Each data plot represents the mean of at least two independent experiments. Lower panel. Colocalization of pDNA-PK and MRE11 in 1BR3 cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to 5 h repair **(C)**. Representative localization of the MRE11 in 180BR, AT1BR, 46BR (Group II) cells exposed to X-rays (2 Gy) and subjected to the indicated repair times. **(D)**. Left panel. Description of the pPTS_N plasmid used for *in vivo* recombination plasmid assay. The pPTS_N vector contains a *neo*

gene used as reporter for transfection selection and two mutant hygromycin resistance (*hyg*) genes in which a Hind III linker was introduced either at the unique PvuI site or at a SacII site. Right panel. The *hyg*⁺/*neo*⁺ cells was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of FAR remaining at 6 h post-irradiation : $\%hyg^+/neo^+ = 100 / (FAR_{6\ h} + 6)$; $r = 0.83$; $p < 0.01$) (solid line).

Figure 5: Model describing cellular radiosensitivity in human quiescent fibroblasts. (A). Radioresistant controls. The NHEJ pathway, activated early after irradiation by ATM repairs the great majority of radiation-induced DSBs. At 4 h post-irradiation, ATM activates the MRE11-recombination process that repairs the residual DSBs. **(B). NHEJ-deficient group III cells.** The ATM-dependent switch compensates the NHEJ defect by permitting some DSB to be repaired by the MRE11-mediated pathway. **(C). Group II cells.** The impairment of MRE11-dependent pathway leads to *moderate* radiosensitivity since NHEJ is the major DSB repair pathway. **(D). ATM-mutated group III cells.** Few DSBs are repaired by NHEJ early after irradiation but the ATM-dependent switch is unable to compensate by triggering the MRE11-dependent pathway.

Table 1: Survival, chromosome and DNA repair data of the cell lines of the collection

Cell lines	Phenotype	Group	Intrinsic radiosensitivity		CB repair			DSB repair	
			SF2ip (%)	SF2dp (%)	% ECF (24h)	% FAR (6 h)	% FAR (24 h)	pH2AX foci (24 h)	MRE11 foci (4 h)
MRC5	Healthy	I	53.3 ± 3.7	65.6 ± 4.6	9.1 ± 1.6	20 ± 4	1.1 ± 1.0	1 ± 2	
HF19	Healthy	I	42.3 ± 2.9	63.8 ± 4.5	10.5 ± 4.6	25 ± 5	1.2 ± 2.0	2 ± 1	5 ± 3
1BR3	Healthy	I	47.4 ± 3.3	57.0 ± 4.0	8.1 ± 1.0	17 ± 4	1.1 ± 1.3	0 ± 2	7 ± 5
48BR	Healthy	I	35.5 ± 2.1	50.2 ± 3.2	9.2 ± 1.6	18 ± 3	1.1 ± 1.0	2 ± 3	
70BR	Healthy	I	38.0 ± 2.6	52.1 ± 3.6	8.5 ± 2.7		2.0 ± 2.5	2 ± 3	
149BR	Healthy	I	42.3 ± 2.9	60.6 ± 4.3	11.2 ± 1.1	22 ± 3	2.1 ± 1.5	0 ± 1	6 ± 4
GP	Healthy	I	47.6 ± 2.3	56.9 ± 3.9	8.2 ± 3.6		2.2 ± 2.0	3 ± 2	
IMR90	Healthy	I	42.0 ± 2.9	53.0 ± 3.7	9.0 ± 4.4		1.0 ± 2.0	2 ± 2	
AS	Healthy	I	37.0 ± 2.6	49.2 ± 3.2	10.1 ± 1.2		2.1 ± 0.5	1 ± 2	
AT1BR	ATM-/-	IIIa	1.6 ± 1.0	3.8 ± 1.1	29.5 ± 3.3	10 ± 3	14.1 ± 3.3	12 ± 3	no
AT2BR	ATM-/-	IIIa	1.3 ± 1.0	4.2 ± 1.2	26.3 ± 3.0		10.0 ± 3.5	15 ± 3	no
AT2EM	ATM-/-	IIIa	1.7 ± 1.0	3.7 ± 2.2	29.3 ± 4.4	9 ± 2	9.3 ± 4.0	7 ± 3	no
AT4BI	ATM-/-	IIIa	1.7 ± 1.0	4.1 ± 2.0	33.3 ± 4.6	13 ± 4	11.0 ± 4.5	11 ± 3	no
AT5BI	ATM-/-	IIIa	3.6 ± 1.0	7.5 ± 2.2	24.4 ± 5.0	16 ± 2	13.6 ± 5.0	14 ± 2	no
AT5BR2	ATM-/- var	IIIa	3.7 ± 1.0	7.4 ± 2.6	19.2 ± 2.6	13 ± 5	7.0 ± 2.2	6 ± 4	no
AT6BI	ATM-/- var	II	7.6 ± 2.0	9.9 ± 1.4	18.8 ± 3.3	14 ± 5	10.9 ± 3.2	7 ± 4	no
290BR	ATM-/- var	II	4.4 ± 2.0	10.1 ± 2.3	22.6 ± 3.2		8.2 ± 5.0	5 ± 3	no
109BR	ATM+/-	I	50.1 ± 3.5	59.6 ± 4.2	10.1 ± 1.0	25 ± 4	3.0 ± 1.7	2 ± 2	
ATHM4BI	ATM+/-	II	22.7 ± 1.6	43.4 ± 3.1	11.3 ± 2.6	23 ± 2	4.8 ± 3.0	4 ± 2	
180BR	LIG4-/-	IIIb	2.0 ± 1.0	4.1 ± 2.2	42.0 ± 4.2	74 ± 4	41.4 ± 3.3	31 ± 5	25 ± 1
46BR	LIG1-/-	II	14.0 ± 3.0	24.3 ± 1.6	13.6 ± 1.6	4 ± 2	2.5 ± 2.0	3 ± 3	1 ± 2
79RD	NBS-/-	II	12.9 ± 3.1	29.2 ± 2.2	17.6 ± 4.0		6.1 ± 4.7	3 ± 2	no
87RD	NBS-/-	II	6.2 ± 2.4	13.1 ± 3.2	22.4 ± 4.4		9.7 ± 5.0	3 ± 4	no
347BR	NBS-/-	II	5.4 ± 3.0	12.9 ± 1.5	17.6 ± 1.6	8 ± 2	7.2 ± 3.8	7 ± 3	
KA	CS	II	22.9 ± 1.6	29.3 ± 2.0	15.9 ± 3.0	15 ± 6	3.0 ± 3.2	5 ± 4	no
GM739	CS	II	7.6 ± 2.0	29.2 ± 1.5	15.2 ± 1.6	15 ± 2	4.7 ± 2.7	1 ± 3	no
GMI856	CS	II	13.3 ± 2.8	28.1 ± 1.9	12.6 ± 3.3	6.5 ± 1	2.8 ± 2.1	1 ± 3	
GMI629	CS	II	11.9 ± 3.5	29.4 ± 2.1	17.0 ± 2.6	11 ± 2	2.4 ± 1.0	3 ± 3	no
XP14BR	XP	II	22.1 ± 1.5	40.4 ± 2.8	13.2 ± 2.2	12 ± 2	7.1 ± 3.7	1 ± 3	no
XP16BR	XP	II	20.0 ± 1.4	40.0 ± 3.9	12.0 ± 3.0		7.8 ± 1.8	2 ± 2	no
XP17VI	XP	II	19.1 ± 1.3	37.5 ± 2.6	11.6 ± 4.1		5.0 ± 4.0	2 ± 4	no
FAI	FANC	II	16.6 ± 1.1	26.0 ± 2.8	13.3 ± 3.2	5 ± 3	6.6 ± 2.6	2 ± 2	no
FAII	FANC	II	14.0 ± 2.8	25.5 ± 1.7	11.0 ± 1.6	4 ± 2	7.5 ± 2.9	1 ± 3	
FAIII	FANC	II	18.3 ± 1.3	30.3 ± 2.3	15.2 ± 2.3		4.4 ± 2.4	3 ± 3	no
FAV	FANC	II	15.1 ± 1.0	24.4 ± 2.4	14.2 ± 3.3		5.0 ± 1.0	3 ± 2	
B1	BLM	II	21.3 ± 2.0	35.7 ± 2.5	13.0 ± 1.1		4.8 ± 2.6	4 ± 3	no
B2	BLM	II	23.2 ± 1.0	37.5 ± 4.2	12.0 ± 2.0		2.8 ± 1.6	4 ± 2	no
B3	BLM	II	22.1 ± 2.0	30.0 ± 3.2	15.2 ± 2.1		4.7 ± 2.9	3 ± 2	
B4	BLM	II	19.4 ± 1.2	36.0 ± 4.2	14.0 ± 2.0		4.8 ± 2.0	4 ± 2	
84BR	?	II	25.5 ± 1.8	35.5 ± 3.5	14.4 ± 3.0	9 ± 2	3.3 ± 2.6	5 ± 3	no

Table 2: A classification of human radiosensitivity phenotypes tentatively proposed from different DSB assays

	SF2	PFGE	pH2AX	MRE11	Rejoining	Recombination	Representative syndrome
I Group I (average radioresistance)	SF2dp > 45%	10 < %FAR(6 h) < 4 %FAR(24 h) < 4	foci(24 h) < 4	4 < foci(24 h) < 10	normal	normal	
Group II (moderate radiosensitivity)	45% < SF2dp < 7%	%FAR(6 h) < 6 %FAR(24 h) < 10	foci(24 h) < 4	No foci	normal	+++	BLM FANC
Group IIIa (extreme radiosensitivity)	SF2dp < 7%	6 < %FAR(6 h) < 20 %FAR(24 h) < 20	6 < foci(24 h) < 20	No foci	--	+++	ATM
Group IIIa (extreme radiosensitivity)	SF2dp < 7%	%FAR(6 h) > 60 %FAR(24 h) > 30	foci(24 h) > 30	foci(24 h) > 20	---	normal	LIG4

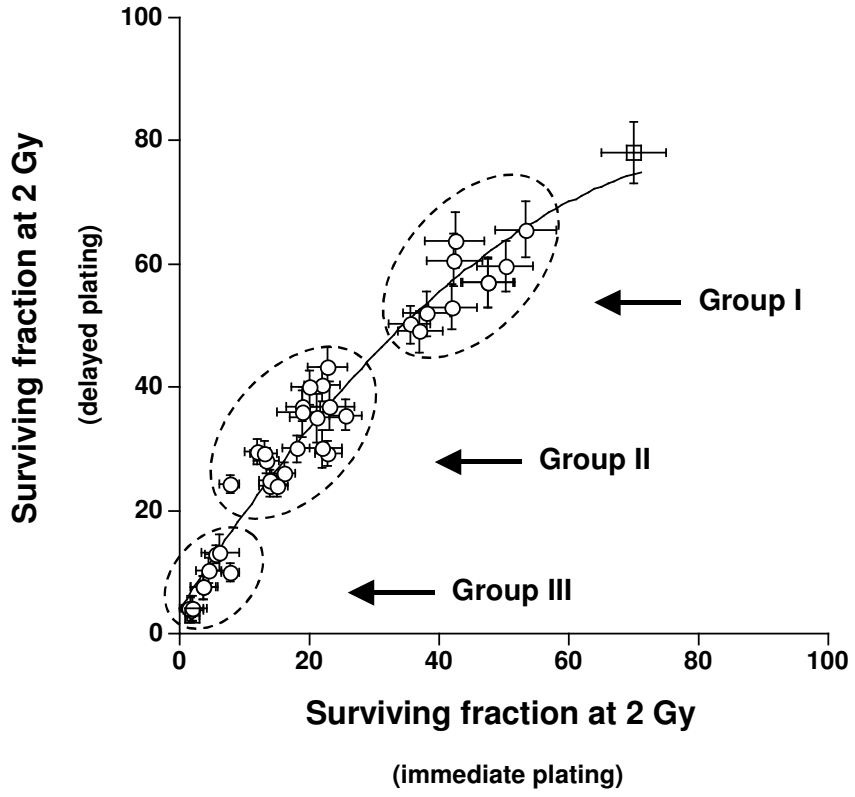


Figure 1

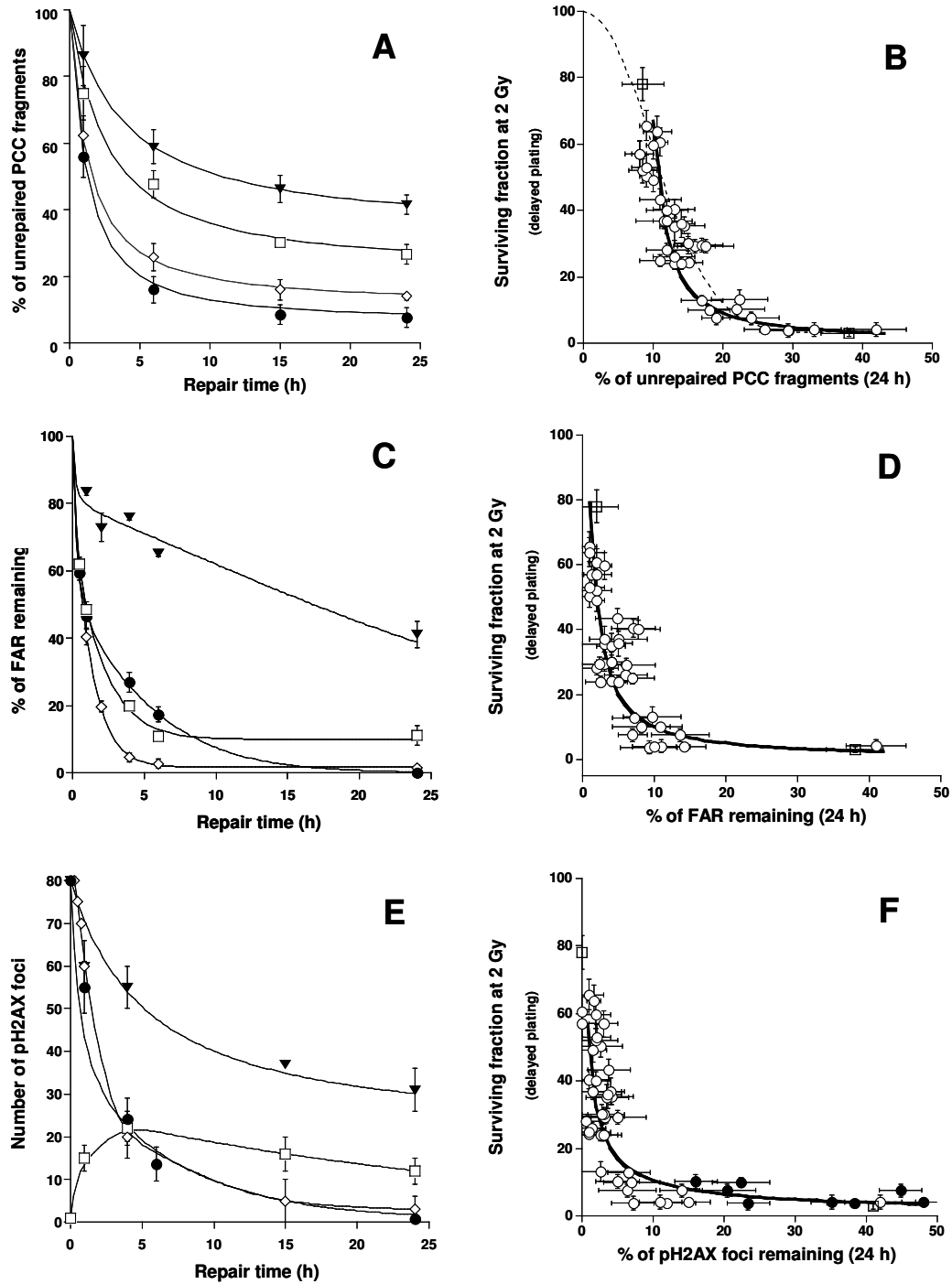


Figure 2

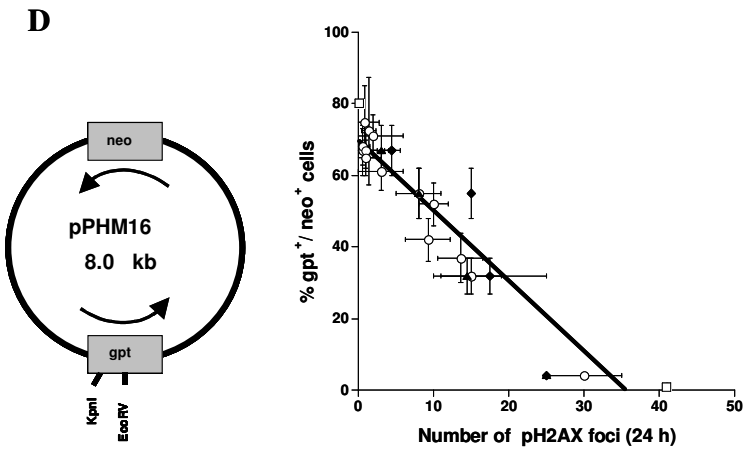
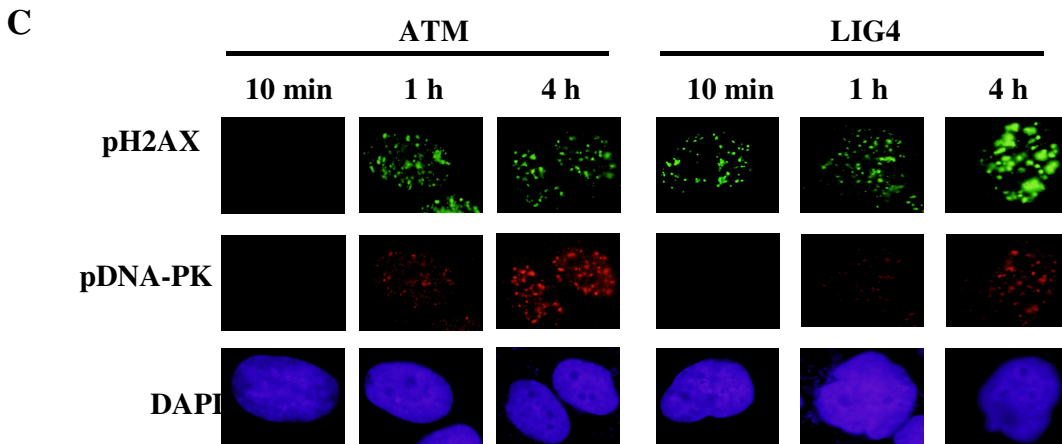
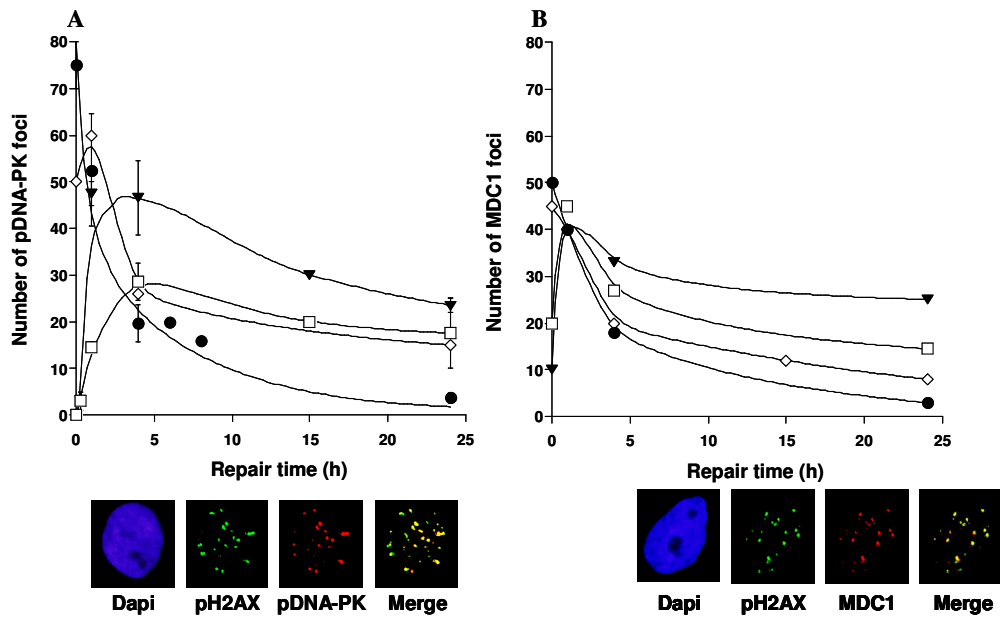
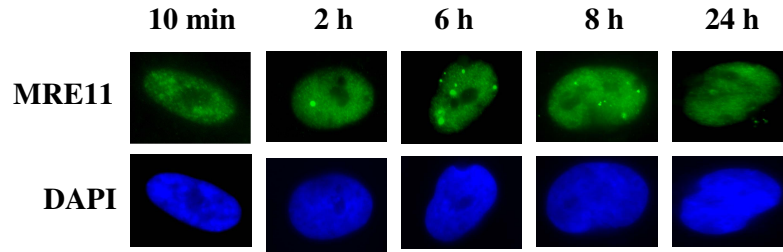
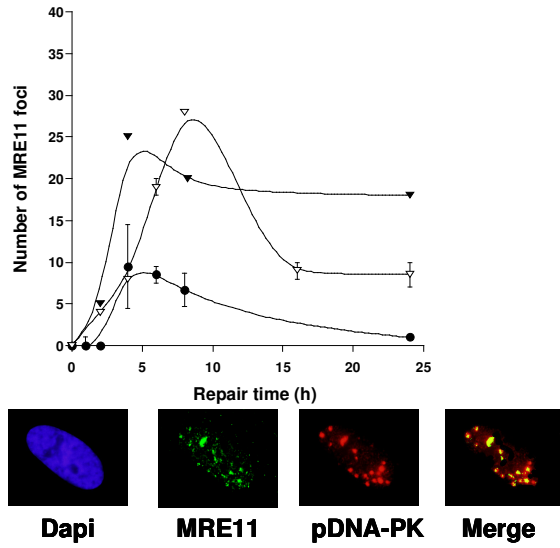


Figure 3

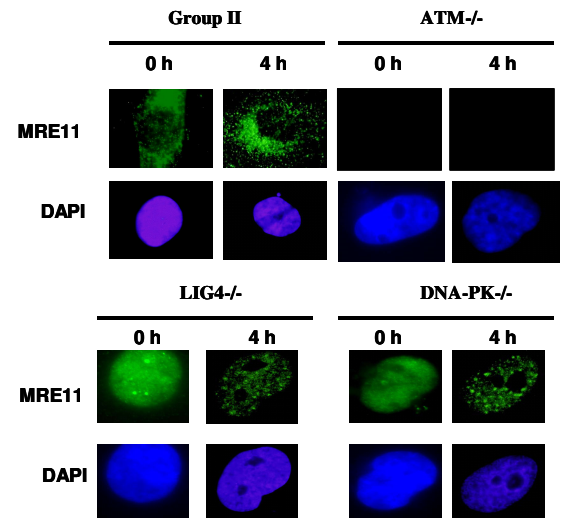
A



B



C



D

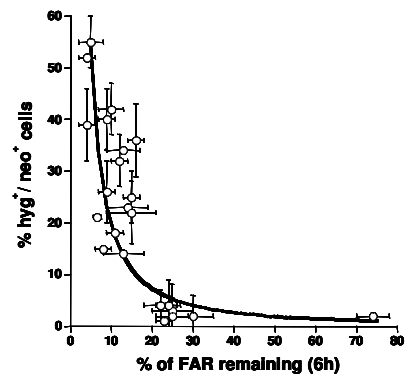
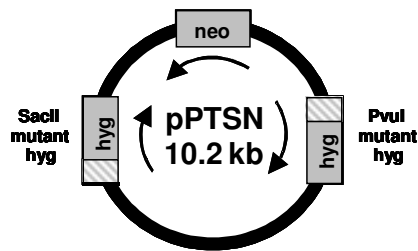


Figure 4

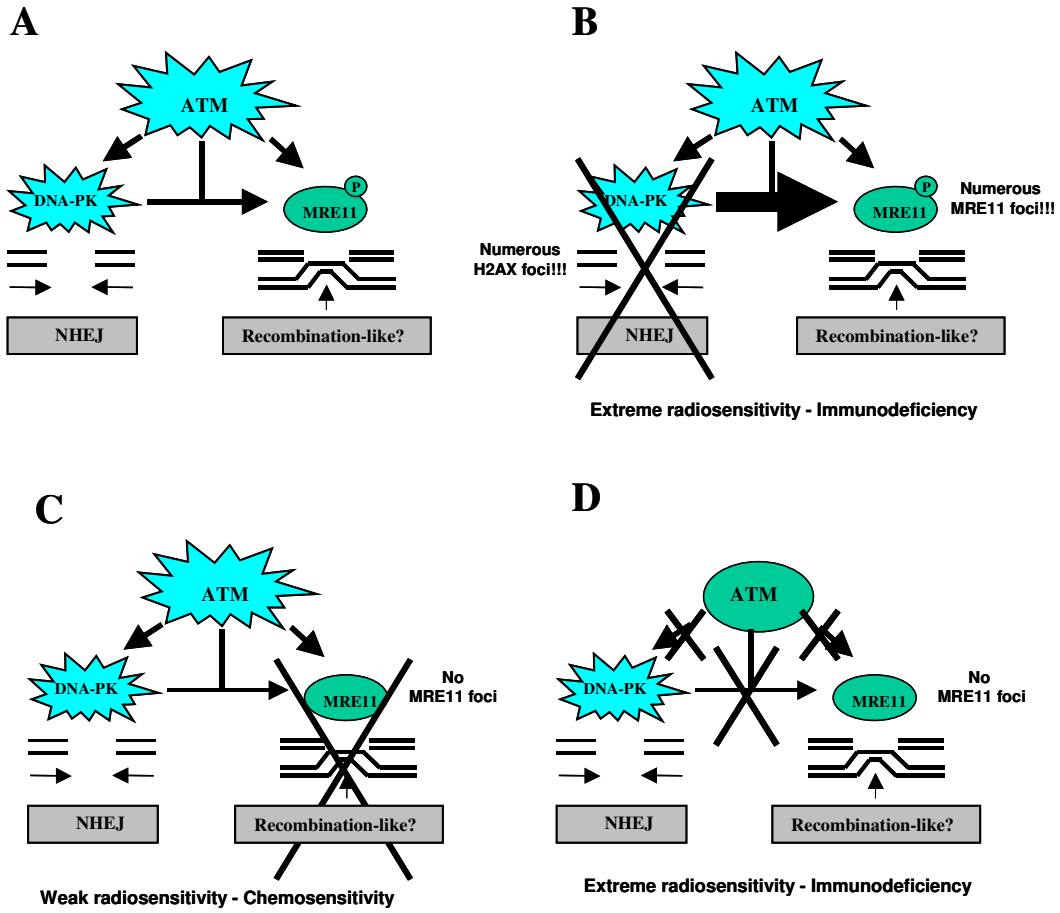


Figure 5

Article III

**Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models
to radiation and/or cisplatin**

Zuzana Bencokova, Laurianne Pauron, Clément Devic, Aurélie Joubert, Jérôme Gastaldo,
Catherine Massart, Jacques Balosso and Nicolas Foray

Accepté en mars 2007 dans Journal of Neuro-Oncology.

Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin

Zuzana Bencokova¹, Laurianne Pauron¹, Clément Devic¹, Aurélie Joubert^{1,2}, Jérôme Gastaldo¹, Catherine Massart¹, Jacques Balosso^{1,3} and Nicolas Foray^{1*}

¹Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble; ²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses; ³Département de Cancérologie et d'Hématologie, CHU Michallon, Grenoble - France.

Running title: Brain tumours and BRCA1-dependent signaling pathway

Keywords: Glioma/ BRCA1/ DSB repair/cisplatin

Pages :19 excluding

Figures : 4

Tables : 1

¹*Correspondence to:* N.Foray, INSERM U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France ;

tel : (+33) 4 76 88 25 41 ; fax : (+33) 4 76 88 28 85 ; email : foray@esrf.fr

Summary

Purpose: Anti-glioma strategies are generally based on trials involving rodent models whose choice remains based on proliferative capacity and availability. Recently, our group obtained the most protracted survival of rats bearing F98 gliomas by combining synchrotron X-rays and *intracerebral* cisplatin injection (Biston et al., Cancer. Res. 2004, 64, 2317-2323). The response to such treatment was suggested to be dependent on BRCA1, a tumour suppressor known to be involved in the response to radiation and cisplatin. In order to verify the impact of BRCA1 functionality upon success of anti-glioma trials, radiobiological features and BRCA1-dependent stress signaling were investigated in the most extensively used rodent glioma models.

Methods: Cell death pathways, cell cycle arrests, DNA repair and stress signaling were evaluated in response to radiation and cisplatin in C6, 9L and F98 models.

Results: Rodent glioma models showed a large spectrum of cellular radiation response. Surprisingly, BRCA1 was found to be functionally impaired in C6 and F98 favouring genomic instability, tumour heterogeneity and tolerance of unrepaired DNA damage.

Significance: Our findings strengthened the importance of the choice of the glioma model on genetic and radiobiological bases, inasmuch as all these rat glioma models are induced by nitrosourea-mediated mutagenesis that may favour specific gene mutations. Particularly, BRCA1 status may condition the response to anti-glioma treatments. Furthermore, since BRCA1 acts as a tumour suppressor in a number of malignancies, our findings raise also the question of the implication of BRCA1 in brain tumours formation.

Introduction

To date, most of gliomas are refractory to standard treatments. The median survival for patients bearing grade IV gliomas (glioblastomas) treated to surgery and radiotherapy does not exceed one year and chemotherapy alone or applied concomitantly with radiation also leads to discouraging results [1-5]. Despite considerable efforts provided to develop innovating strategies, how to understand the relative failures of treatments against gliomas?

By reviewing literature, it appears that animal models do not necessarily reflect specificities of human gliomas. Furthermore, preclinical data may not be ideal predictors of patient outcome [6]. Rodent tumour cells or tissue grafts are commonly used to study both glioma genesis and response to anti-glioma treatments. Conventional models generally consist in implantation of tumour cells or tissues either subcutaneously (*ectopic* injection), or intracranially (*orthotopic* injection). Human cells or tissues can be also injected in nude mice (*allogenic* grafts), while cellular models like C6, 9L, F98 derived from rats are generally injected in *syngenic* animals. Lastly, the abundance of these preclinical protocols has added extra-complexity in data interpretation and made difficult intercomparisons. In the particular case of preclinical anti-glioma radio-chemotherapy trials, the most extensively used modalities are based on syngenic rat models subjected to intracranial inoculation of weakly or non-immunogenic cell lines. It is noteworthy that, to date, all cellular models used in anti-glioma radio-chemotherapy trials are induced by nitrosourea-mediated mutagenesis (Table 1). While anti-glioma strategies involve a number of stress inducers, whether physical (like X-rays) or chemical (like chemotherapeutic drugs), DNA repair capacity and stress signaling pathway of gliomas are poorly documented and most of the investigations about glioma-specific molecular signature concern rather actors of proliferation and differentiation than DNA damage management [7]. Hence, the choice of rodent glioma models is mainly motivated by the existence of previous raw data in the lab, their proliferation capacity in

culture and/or in animals and their non-immunogenic properties, rather than specific molecular features or genetic status.

Recently, our group obtained the most protracted survival of rats bearing F98 rodent gliomas by using synchrotron X-rays combined with *intracerebral* cisplatin injection. Such so-called PAT-plat treatment triggers photoactivation of platinum atoms and produces additional DNA double-strand breaks (DSBs) at the vicinity of cisplatin-induced DNA adducts. Severity of PAT-Plat-induced DSBs was shown to be due to inhibited non-homologous end-joining (NHEJ) process [8, 9]. Hence, in the frame of our developments of anti-glioma strategies involving synchrotron X-rays, we investigated here the radiobiological features of the most extensively used rat glioma models, namely F98, C6 and 9L in response to radiation and cisplatin.

Materials and methods

Cell lines

Glioma rodent cell lines (detailed in Table 1) were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium, supplemented with 10 % fetal calf serum and antibiotics 100 units penicillin mL⁻¹ and 100 µg streptomycin mL⁻¹ (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France). Cisplatin (Cis-diamminedichloroplatinum, Cysplatyl®) was purchased from Rhône-Poulenc (Montrouge, France). Cells were treated with cisplatin added directly in culture medium for 24 h.

Irradiations

An orthovoltage standard X-ray clinical irradiator was used to perform all the irradiations. The dose-rate was approximately 1.234 Gy.min⁻¹.

Cell survival

Standard clonogenic assays were used to evaluate intrinsic radiosensitivity or sensitivity to cisplatin. Protocol was described elsewhere [10].

Flux cytometry

About 5 x 10⁵ cells were seeded onto 100 mm dish, exposed to cisplatin for 24 h and/or X-rays irradiated. Cells were trypsinized and fixed with ice-cold 70% ethanol at a density of 5 x 10⁵ cells per ml and stored at -20°C. Before analysis, cells were resuspended in 0.1 ml PBS and stained with 5 µg.ml⁻¹ propidium iodide in the presence of 50 µg.ml⁻¹ RNase. At least 10⁴ cells were analysed using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson- France, Le Pont de Claix, France) and WinMDI 2.8 free software (Scripps Research Instituteville, La Jolla, CA, USA).

Immunoblottings

Preparation of nuclear extracts, immunoblotting were performed using protocols published elsewhere [11]. Anti-*BRCA1* and -*XPD* antibodies (Santa Cruz, CA, USA were used at 1:1000 dilution. *XPD* proteins served as loading controls.

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere [11]. Cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and permeabilized in Triton-X100 solution for 3 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Anti-*pH2AX*^{ser139} antibody was purchased from Upstate Biotechnology (Euromedex, Mundolsheim, France) and used at 1:800. Anti-*pDNA-PK*^{thr2609} (Abcam, Cambridge, UK) and anti-*BRCA1* antibodies (Santa Cruz, Tebu-Bio, Le Perray, France) were used at 1:100 dilution. Incubations with anti-mouse TRITC or with anti-rabbit FITC secondary antibodies (Sigma-Aldrich) (dilution at 1:100) were performed at 37°C in 2% BSA for 20 min. Coverslips were mounted in Vectashield® Hardset with DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) purchased from Abcys (Paris, France). Slides were examined with an Olympus fluorescence microscope. Micronuclei were scored in about 100 cells by using DAPI-counterstaining. The *pH2AX* nuclear foci were scored in about 50 cells per slide.

Results

Rat glioma models show different cell death pathways in response to X-rays and cisplatin

The 9L, C6 and F98 rodent glioma models already show obvious differences in their cellular appearance. C6 cells (*p53* wild-type) are round, smaller and proliferate faster than F98 (*p53* wild-type according to [12] and mutated according [13]) and 9L (*p53*-mutated). 9L cells show a fibroblast-like appearance. F98 cells elicit astrocyte-like multipolar shape [14, 15] (Table 1).

Since our previous studies dealt with treatments involving concomitantly synchrotron X-rays and cisplatin, we asked whether molecular and cellular endpoint predict the response to X-rays and cisplatin. 9L appeared to be the most radioresistant with a surviving fraction at 2 Gy (SF2) of 71.9 ± 2.0 %. By contrast, C6 (53.0 ± 2.0 %) and F98 (41.4 ± 2.5 %) may be classified as rodent cell lines with moderate radiosensitivity (Fig. 1A). After cisplatin treatment, C6 appeared to be the most resistant cell line (Fig. 1B).

Mitotic death is the major radiation-induced death pathway, characterized by micronuclei formation. Micronuclei are daughter-like cells that carry irreversibly damaged chromosomal fragments. Their yield was early correlated to the radiation-induced clonogenic death [16]. Percentage of cells with micronuclei after 15 Gy in 9L, C6 and F98 were found very similar. However, it is noteworthy that F98 elicited 3.8 times more radiation-induced micronuclei per cell than 9L, consistent with a relative higher radiosensitivity (data not shown). After cisplatin treatment, F98 showed the highest micronuclei percentage (Fig. 1C). The same conclusion was reached after combined treatment but with higher micronuclei percentage, suggesting supra-additivity (Fig. 1C).

Since apoptosis was shown to be an important cell death pathway in gliomas, we evaluated the yield of apoptotic bodies by both DAPI-counterstaining and c-jun phosphorylation (p-c-jun) [17]. Together with positive p-c-jun signals, apoptotic bodies were found in 9L only, whatever the modality (Fig. 1D). Consequently, neither *p53* status nor

apoptosis predict cellular response to radiation and cisplatin in the rat glioma models tested (Table 1).

Rat glioma models provide different cell cycle arrests in response to X-rays and cisplatin

Loss of clonogenic response is also influenced by cell cycle arrests. Cell cycle arrests were therefore examined by flux cytometry. After 15 Gy, C6 and 9L exhibited marked G2 arrests (about 50 % of relative accumulation) but no arrest in G1. Conversely, F98 are characterised by gross decrease of G1 population and a very marked G2 arrest (about 110 % of relative accumulation). If an error-prone G2 blockage would reflect the accumulation of numerous unreparable DNA damage propagating throughout cell cycle, these findings may be predictive of the relative radiosensitivity elicited by F98 (Fig. 2). After treatment to cisplatin, all the cell lines showed about 50% relative decrease in G1 population, suggesting again an absence of stress-induced G1 arrest. Conversely, an impressive S arrest occurred in 9L (the great majority of 9L cells were synchronized in S phase after 30 μ M cisplatin (data not shown)), while S arrest was absent after 3 μ M cisplatin in C6 and F98 (Fig. 2). Lastly, after irradiation and cisplatin treatments, F98 showed the highest sub-G1 populations, supporting again micronuclei formation favoured in this cell line. All these results reflect the diversity of the cell cycle response after radiation or cisplatin treatment.

Rat glioma models possess different DSB repair capacity

Radiation-induced DSBs can be determined from nuclear foci formed by phosphorylation of the variant histone H2AX (pH2AX), an early NHEJ-dependent event that is easily quantifiable by immunofluorescence [18]. DSB repair rate of 9L was fast and complete (all the DSBs were repaired in 15 h after 2 Gy) (Fig. 3A). By contrast, F98 showed higher fraction of unrepaired DSBs at 24 h ($4 \pm 1\%$) than the two other cell lines ($0 \pm 1\%$). C6 elicited an

intermediate response with a complete repair reached at 24 h post-irradiation (Fig. 3A). The NHEJ capacity of 9L was therefore found higher than that of the two other cell lines, consistent with the larger radioresistance observed above (Fig. 3A).

The autophosphorylation of DNA-PK (pDNA-PK) is also an early NHEJ event [19]. Yields of pDNA-PK foci observed 24 h after 2 Gy corroborated pH2AX data (Fig. 3A). Their response is in agreement with a more general correlation between unrepaired DSBs and SF2, relevant for *any* mammalian cells [20] (Fig. 3B).

Rat glioma models show different BRCA1 status

Homologous recombination is active in S-G2/M and requires BRCA1. BRCA1 was shown to form nuclear foci after both X-rays and cisplatin treatment [21]. Immunofluorescence showed that BRCA1 appeared poorly expressed in F98, localized in cytoplasm in C6. Radiation- and cisplatin-induced BRCA1 foci were observed in 9L only (Fig. 4A). Anti-*BRCA1* immunoblots also elicited stronger expression of BRCA1 in 9L. Interestingly, a truncated form of BRCA1 appeared in F98 (Fig. 4B). These findings suggest that BRCA1 is functionally impaired in C6 and F98. Again, 9L appears to be the only rodent glioma model tested here with a normal response to both X-rays and cisplatin.

Discussion

The radiobiological features of 3 rodent glioma models were examined: while significant differences in cell death, cell cycle and DSB repair capacity was observed, the BRCA1 protein, was found functionally impaired in two among three models tested. Since BRCA1 is involved in the response to X-rays and to a number of alkylating agents like cisplatin, our results suggest that BRCA1 status should be more carefully considered in the planning of anti-glioma treatment. What are the implications of such findings on anti-glioma strategies?

Is to find impaired BRCA1 in glioma models consistent with recent genetic screening? Most of anti-glioma strategies are built from data obtained with rodent models. However, animal models do not fully recapitulate all the biological features of human brain tumours: extrapolation from *in vitro* data is therefore questionable and our findings strengthen the risk of biases [6]. Rodent gliomas are generally chemo-induced, notably by nitrosoureas. The genotoxic action of such agents would favour mutations of genes like BRCA1 [22]. Hence, BRCA1 impairments in rodent glioma models may not have the same origin than those observed in human gliomas and consequently, raise the question of the relevance of the use of chemo-induced and not *spontaneous* tumours in preclinical trials.

Investigations on gliomas-specific molecular markers generally focus on actors of proliferation. A number of loss of heterozygosity have been reported in gliomas but there is still no consensus any specific molecular signature [7, 23, 24]. Very few concerned p53 and BRCA1. Loss of p53 and activation of growth factor receptor tyrosine kinase signalling pathway initiates tumour formation whereas disruption of RB pathway contributes to the progression of tumour development [7]. All these targeted proteins act in the proliferation process, are partners of BRCA1 but are mainly as *gatekeepers* than *caretakers* like BRCA1. This is notably the case of the p16/Cdkn2a/Ink4a whose homozygous deletions have been

observed in C6 and F98 but not in 9L [12]. The p16/Cdkn2a/Ink4a protein belongs to the BRCA1-dependent cascade of stress-induced events, was shown to co-precipitate with BRCA1, and phosphorylate it at serine 1497 in response to cell cycle progression and DNA damage [25]. Recently, it appears that BRCA1-negative cells show high p16/Cdkn2a/Ink4a cyclin-dependent kinase activity and that are 2- to 4-fold more sensitive to CDK inhibitors [26]. Hence, the p16/Cdkn2a/Ink4a deletions found in C6 and F98 but not in 9L, together with our findings that BRCA1 is functionally impaired in C6 and F98 but not in 9L, suggest a model in which ATM- and p16/Cdkn2a/Ink4a-dependent BRCA1 phosphorylations act in response to radiation. Since similar genetic alterations are also observed in a number of human gliomas, this report gives consistency to high frequency of impaired BRCA1 in gliomas in general. Further investigations are therefore needed to document possible BRCA1 impairments in such tissues.

What are the practical consequences of BRCA1 impairments for anti-gliomas treatments?

The choice of chemotherapeutic drugs is mainly influenced by their liposolubility that enhances their capacity to cross blood brain barrier [27-29]. Unfortunately, liposoluble agents, that generally possess DNA-alkylating capacity, did not improve clinical outcome. Here, the response of glioma to cisplatin, a common DNA alkylating agent, appears to be BRCA1-dependent, like in any other tumour tissue. In BRCA1-positive gliomas, cisplatin pre-treatment results in synchronization in the radioresistant S phase, limiting therefore the potential benefit of *cisplatin exposure that precedes radiation*. Conversely, in impaired BRCA1-gliomas, the success of cisplatin-radiation combination is more probable since radiation target a larger number of unsynchronized cells. Nevertheless, combined treatments are still to date a failure: most of cisplatin-radiation combinations were performed with *intravenous* cisplatin administration whereas cisplatin was reported to be more efficient when

injected *locally* [9, 30, 31]. Our conclusions encourage therefore the development of *intracranial* cisplatin injection to trigger BRCA1-dependent stress signalling. The relevance of such assumption is notably illustrated by the success of the PAT-Plat treatment applied to rats bearing BRCA1-impaired F98 glioma in which cisplatin is injected *intracerebrally* [9].

What are the molecular consequences of impaired BRCA1? Apoptosis was believed to be the predominant radiation-induced cell death pathway in gliomas. Apoptosis is often confounded with mitotic cell and micronuclei throughout the use of non-specific molecular assays. Furthermore, it must be reminded that enhanced apoptosis is not consistent with radioresistance observed generally in gliomas [16, 32, 33]. The previous observations that impaired BRCA1 *prevents* rather than *stimulates* apoptosis support that apoptosis is not a good predictor of the clinical radioresponsiveness of gliomas [11, 16].

BRCA1 impairments are rather consistent with a glioma generation facilitated by genomic instability. Impaired BRCA1 may notably contribute to the lack of control of tyrosine kinase pathways that exacerbate cellular proliferation [34]. Our findings raised the question of the implication of this protein in the tumorigenicity of brain tumours as well. Such assumption is supported by the fact that BRCA1 tumour suppressor activity is not necessarily restricted to inherited breast and/or ovarian cancer [35]. Notably, adenovirus experiments pointed out the potential role of BRCA1 in lung and colon malignancies [5]. Further researches are obviously required to substantiate this hypothesis.

Acknowledgements

We would like to thank Drs E.P Malaise, V. Favaudon and D. Marot for fruitful discussions. The human glioma cell lines were kindly provided by F. Berger and L. Pelletier. Z.B. is a PhD fellowship of Roche-France. A.J. was supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, France). This work was also supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the ETOILE Project (Région Rhône-Alpes and Lyon University).

References

1. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY: Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361: 323-331, 2003
2. Lesniak MS, Brem H: Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* 3: 499-508, 2004
3. Bredel M: Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 161-204, 2001
4. Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506, 2003
5. Marot D, Opolon P, Brailly-Tabard S, Elie N, Randrianarison V, Connault E, Foray N, Feunteun J, Perricaudet M: The tumor suppressor activity induced by adenovirus-mediated BRCA1 overexpression is not restricted to breast cancers. *Gene Ther* 13: 235-244, 2006
6. Holland EC: Brain tumor animal models: importance and progress. *Curr Opin Oncol* 13: 143-147, 2001
7. Zhu Y, Parada LF: The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2: 616-626, 2002
8. Corde S, Balosso J, Elleaume H, Renier M, Joubert A, Biston MC, Adam JF, Charvet AM, Brochard T, Le Bas JF, Esteve F, Foray N: Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res* 63: 3221-3227, 2003
9. Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Esteve F, Foray N, Balosso J: Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 64: 2317-2323, 2004
10. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP: Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 72: 271-283, 1997
11. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P: A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* 22: 2860-2871, 2003
12. Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G, Mennel H: The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology* 67: 202-206, 1999
13. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL: Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide. *Mol Cancer Ther* 5: 20-28, 2006
14. Barth RF: Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 36: 91-102, 1998
15. Ko L, Koestner A, Wechsler W: Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol (Berl)* 51: 23-31, 1980
16. Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J: Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* 18: 7334-7342, 1999
17. Lee SA, Dritschilo A, Jung M: Role of ATM in oxidative stress-mediated c-Jun phosphorylation in response to ionizing radiation and CdCl₂. *J Biol Chem* 276: 11783-11790, 2001
18. Rothkamm K, Lobrich M: Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5057-5062, 2003

19. Udayakumar D, Bladen CL, Hudson FZ, Dynan WS: Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 41631-41635, 2003
20. Chavaudra N, Bourhis J, Foray N: Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother Oncol* 73: 373-382, 2004
21. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM: Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88: 265-275, 1997
22. Zan Y, Haag JD, Chen KS, Shepel LA, Wigington D, Wang YR, Hu R, Lopez-Guajardo CC, Brose HL, Porter KI, Leonard RA, Hitt AA, Schommer SL, Elegbede AF, Gould MN: Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 21: 645-651, 2003
23. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T: Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 8: 196-201, 2002
24. Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD, Sikic BI: High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res* 65: 4088-4096, 2005
25. Ruffner H, Jiang W, Craig AG, Hunter T, Verma IM: BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol Cell Biol* 19: 4843-4854, 1999
26. Deans AJ, Khanna KK, McNees CJ, Mercurio C, Heierhorst J, McArthur GA: Cyclin-Dependent Kinase 2 Functions in Normal DNA Repair and Is a Therapeutic Target in BRCA1-Deficient Cancers. *Cancer Res* 66: 8219-8226, 2006
27. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y: Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* 52: 997-1007, 1983
28. Wolff JE, Trilling T, Molenkamp G, Egeler RM, Jurgens H: Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 481-486, 1999
29. Jenkin RD, Boesel C, Ertel I, Evans A, Hittle R, Ortega J, Sposto R, Wara W, Wilson C, Anderson J, et al.: Brain-stem tumors in childhood: a prospective randomized trial of irradiation with and without adjuvant CCNU, VCR, and prednisone. A report of the Childrens Cancer Study Group. *J Neurosurg* 66: 227-233, 1987
30. Sheleg SV, Korotkevich EA, Zhavrid EA, Muravskaya GV, Smeyanovich AF, Shanko YG, Yurkshtovich TL, Bychkovsky PB, Belyaev SA: Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 60: 53-59, 2002
31. Fehlaue F, Muench M, Rades D, Stalpers LJ, Leenstra S, van der Valk P, Slotman B, Smid EJ, Sminia P: Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 723-732, 2005
32. Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, Budach W, Gioioso D, Pardo F, Okunieff P, Bleehen N, Urtasun R, Suit H: Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25: 243-249, 1993
33. Taghian A, Suit H, Pardo F, Gioioso D, Tomkinson K, DuBois W, Gerweck L: In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23: 55-62, 1992

34. Foray N, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V, Jeggo P: Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol* 22: 4020-4032, 2002
35. Rosen EM, Fan S, Isaacs C: BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 12: 533-548, 2005
36. Joubert A, Foray N: Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies (Chapter 10). In: Landseer, BR., editor. *New Research on DNA Repair*. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY, 2006
37. Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K, Kuchino Y: Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy. *J Neurooncol* 19: 259-268, 1994
38. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371, 1968

Legend to figures

Fig. 1: Cellular response of rodent glioma models to X-rays and cisplatin. **A.** Clonogenic cell survival against X-rays dose (9L, open circles; C6, closed circles; F98, closed losanges). Each plot data represents the mean \pm standard error of two independent replicates. **B.** Clonogenic cell survival after 2 Gy or 10 μ M cisplatin treatment. Cell survival values of Chinese Hamster Ovary (CHO) and CHO xrs6 mutants were shown as radioresistant and radiosensitive controls, respectively [36]. Each plot data represents the mean \pm standard error of two independent replicates. **C.** Quantification of mitotic death after X-rays irradiation or cisplatin treatment. The yield of micronuclei per 100 cells was scored by immunofluorescence in DAPI-counterstained cells subjected to 15 Gy followed by 24 h for repair, to 10 μ M cisplatin for 24 h or to combined treatment. Each data represents the mean \pm standard error of two independent replicates. **D.** Quantification of apoptosis. *Upper panel.* Yield of apoptotic bodies observed in DAPI-counterstained cells in the same immunofluorescence experiments as the micronuclei assay described above. Each data represents the mean \pm standard error of two independent replicates. *Lower panel.* Representative example of anti-*p-c-jun* immunoblots applied to nuclear extracts after 15 Gy followed by 1 or 4 h for repair. Loading control XPD (80 kDa) was used to verify the protein concentration in each lane.

Fig. 2: Cell cycle arrests in rodent glioma models after exposure to X-rays and cisplatin. Representative cell cycle distributions observed in the indicated cell lines after 15 Gy followed by 24 h for repair or 24 h after 3 or 10 μ M cisplatin treatment.

Fig. 3: DSB repair capacity of rodent glioma models. **A. Left panel.** DSB repair curves obtained from anti-*pH2AX* immunofluorescence after 2 Gy followed by the indicated repair

times: 9L, open circles; C6, closed circles; F98, closed losanges. Each data plot represents the mean \pm standard error of three independent experiments. *Right panel.* Representative examples of γ H2AX and pDNA-PK foci observed 16 h after 2 Gy X-rays. **B.** Correlation between SF2 and the percentage of unrepaired DSB obtained from anti- γ H2AX immunofluorescence. Dotted line represents the correlation previously obtained from 40 human fibroblast cell lines in plateau phase of growth and relevant for rodent cells (grey areas designed the deduced confidence zones of average radioresistance and radiosensitivity) [36].

Fig. 4: Expression, localization and phosphorylation of BRCA1 protein. **A.** Anti-*BRCA1* immunofluorescence was applied to the indicated cell lines subjected to 15 Gy followed by 4 h for repair. **B.** Anti-*BRCA1* immunoblots of nuclear extracts from the untreated indicated cell lines. Amount of BRCA1 protein in each lane was quantified and arbitrary gray scale units for each cell line were plotted. Anti-*XPD* loading control of the same gel was performed.

Table 1 : Origin and biological features of the rodent and glioma cell lines used in this study.

Cell line	Tumour type	Cell line origin	Mutagen	P53 status	p16/CDKn2a/Ink4	BRCA1 localisation after X-rays	Depositor
C6	Gliosarcoma	Wistar	MNU, repetitive dose	<i>Wild type</i> [12, 37]	<i>Mutated</i> [12]	Cytoplasmic	Benda and Schmitek [38]
9L	Gliosarcoma	CD Fisher	MNU, repetitive dose	<i>Mutated</i> [12, 37]	<i>Wild type</i> [12]	Nuclear with stress induced foci	Benda and Schmitek [38]
F98	Anaplastic glioma	CD Fisher	ENU, single dose	<i>Wild type</i> [12] or <i>Mutated</i> [13]	<i>Mutated</i> [12]	Negative	Wechsler [15]

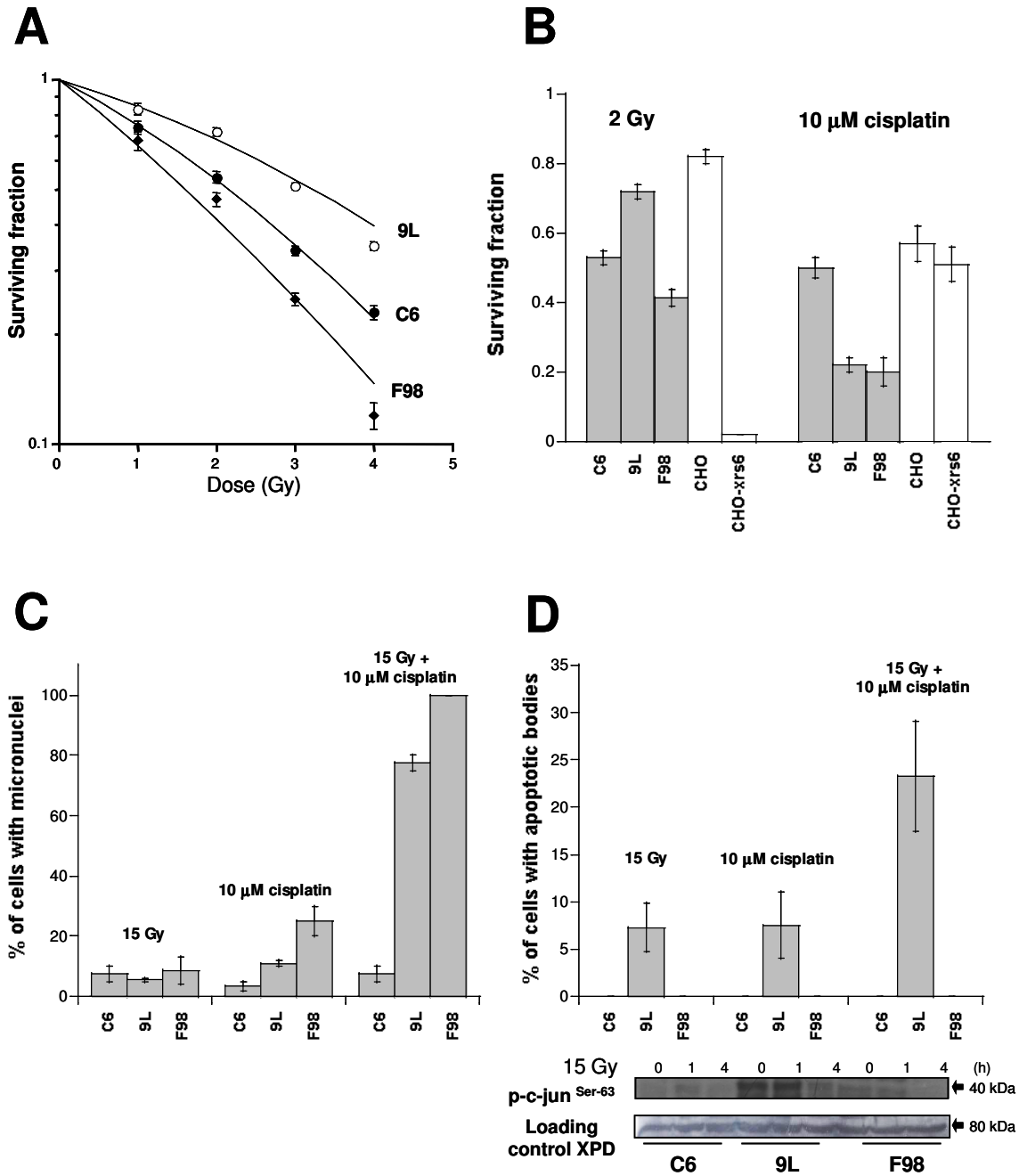


Figure 1

A

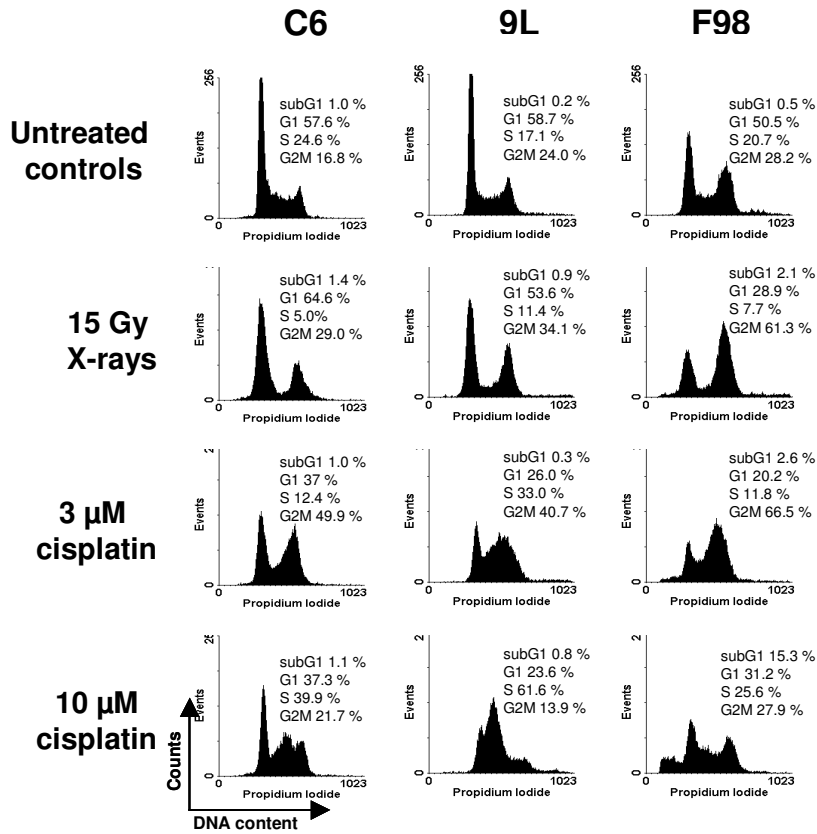


Figure 2

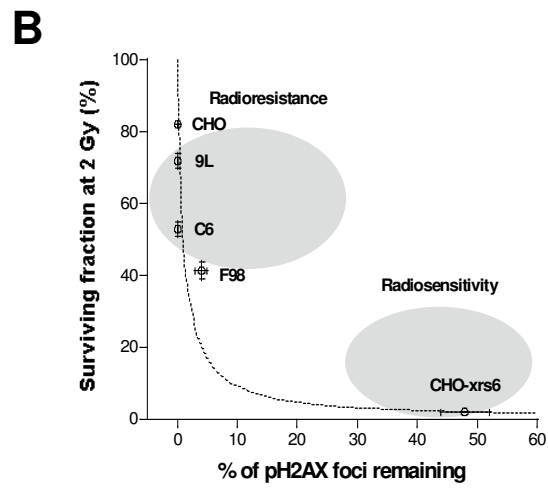
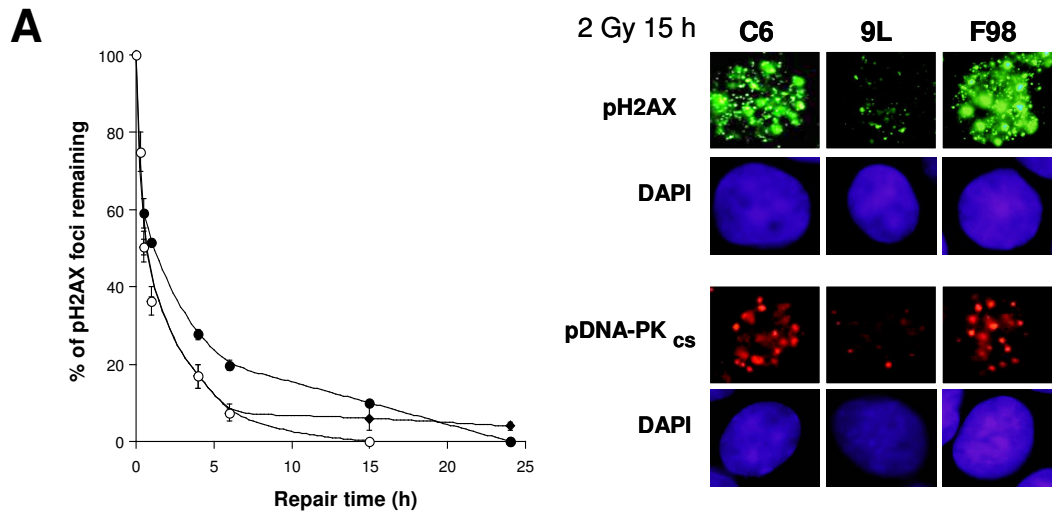


Figure 3

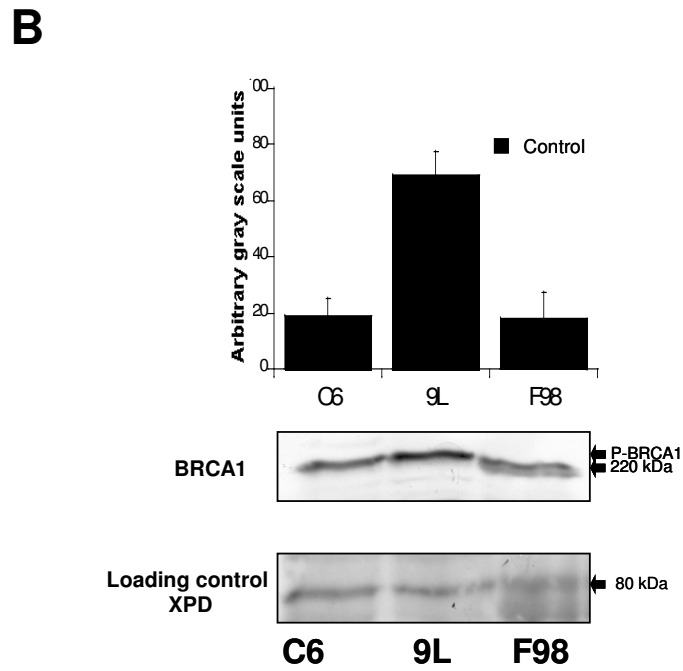
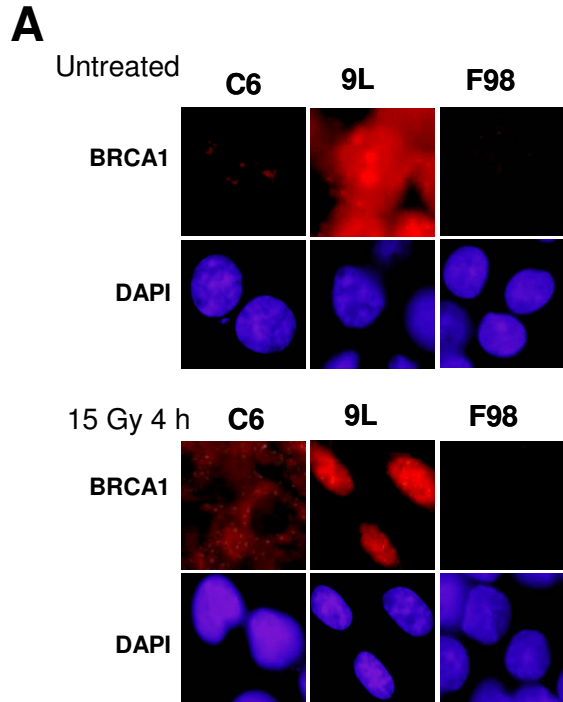


Figure 4

Article IV

**Response of human glioma models to radiation and cisplatin: impact of DNA repair
and BRCA1-dependent stress signaling pathway**

Zuzana Bencokova, Clément Devic, Aurélie Joubert, Jérôme Gastaldo, Catherine Massart, Jacques Balosso,
and Nicolas Foray

En révision depuis février 2007.

Response of human glioma models to radiation and cisplatin: impact of DNA repair and BRCA1-dependent stress signaling pathway

Zuzana Bencokova, Clément Devic, Aurélie Joubert, Jérôme Gastaldo, Catherine Massart, Jacques Balosso, and Nicolas Foray*

Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France

Running title: Gliomas and BRCA1-dependent signaling

Keywords: Glioma/ BRCA1/ DSB repair/cisplatin

Pages : 18

Figures : 4

Tables : 1

*Correspondence to: N.Foray, INSERM U647, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France

tel : (+33) 4 76 88 25 41 ; fax : (+33) 4 76 88 28 85 ; email : foray@esrf.fr

Abstract

Background and purpose: Anti-glioma strategies are generally based on data from rodent and human cellular models whose choice is often poorly motivated. Recently, our group obtained the most protracted survival of rats bearing gliomas by combining synchrotron X-rays and *intracerebral* cisplatin injection (Biston et al., Cancer. Res.2004). The response to such treatment was suggested to be dependent upon BRCA1, a tumour suppressor protein involved in the response to radiation and cisplatin. Here, the radiobiological features and the impact of BRCA1-dependent stress signaling pathways were investigated in 7 human glioma models.

Materials and Methods: DNA repair, BRCA1-dependent stress signaling and cycle arrests were investigated in response to radiation and/or cisplatin.

Results and Conclusions: BRCA1 was found to be functionally impaired in 5 among 7 glioma cell lines, favoring genomic instability, uncontrolled cell cycle and tolerance of unrepaired DNA damage. Our findings strengthened the importance of the choice of glioma model whose BRCA1 status may condition the response to radiation and/or cisplatin. Since BRCA1 acts as a tumour suppressor in a number of malignancies, our findings raise also the question of its potential implication in tumorigenicity of brain tumours.

1. Introduction

Deriving from glial, astrocyte, or dendrocyte cells, gliomas are the most frequent tumours of central nervous system. Unfortunately, most of gliomas are refractory to standard treatments. The median survival for patients bearing grade IV gliomas (glioblastomas) does not exceed one year even after both aggressive surgery and radiotherapy treatment [1]. Chemotherapy alone or associated with radiotherapy also leads to discouraging results [2]. Finally, a standard of 60 Gy delivered in 30 fractions during six weeks remains the best modality against gliomas [1]. Three specific features of gliomas should be also evoked: 1) clonogenic survival seems to be less appropriate to predict gliomas radiocurability [3]; 2) animal models may not reflect all the specificities of human gliomas [4]; 3) DNA repair capacity of gliomas is poorly documented and most of the investigations about gene mutations concerns actors of proliferation [5].

Recently, our group obtained the most protracted survival of rats bearing radioresistant rodent gliomas by using synchrotron X-rays combined with *intracerebral* cisplatin injection. Such so-called PAT-plat treatment triggers photoactivation of platinum atoms and produces additional DNA double-strand breaks (DSBs) at the vicinity of cisplatin-induced DNA adducts. Severity of PAT-Plat-induced DSBs was shown to be due to inhibited non-homologous end-joining (NHEJ) process. The BRCA1 protein, a tumour suppressor whose mutations are responsible for inherited breast cancers, was suggested to act in PAT-Plat response. BRCA1 is required in major DNA repair pathway and in the response to radiation and cisplatin [6, 7]. These results prompted us to investigate the radiobiological features of human glioma models in order to propose molecular assays to predict response of gliomas to anti-cancer treatments. Recent conceptual and technical advances in the DNA repair field has motivated such approach: 1) importance of interplay between two major DSB repair pathways, NHEJ and recombination, notably when chemotherapy is applied concomitantly with irradiation [6, 8]; 2) existence of a temporal hierarchy between ATM- and BRCA1-dependent phosphorylation events occurring after irradiation and conditioning cell cycle arrests [9]; 3) the possibility to detect DSBs inside cell nuclei by using immunofluorescence [10].

Here, we examined the molecular response of 7 human gliomas models to X-rays and cisplatin by investigating the major DSBs repair and signaling pathways.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Glioma cells (detailed in Table 1.) were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10 % fetal calf serum and antibiotics. Cells were pre-treated with 10 μ M cisplatin (Cis-diamminedichloroplatinum, Cysplatyl®, Rhône-Poulenc, Montrouge, France) for 24 h.

2.2. Irradiations

An orthovoltage X-ray clinical irradiator was used to perform all the irradiations. The dose-rate was 1.234 Gy.min⁻¹.

2.3. Flux cytometry

Cells were fixed with 70% ethanol at a density of 5 x 10⁵ cells per ml and stored at -20°C. Cells were resuspended in 0.1 ml PBS and stained with 5 μ g.ml⁻¹ propidium iodide with 50 μ g.ml⁻¹ RNase. At least 10⁴ cells were analysed using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson-France, Le-Pont-de-Claix, France).

2.4. Immunoblottings and immunofluorescence

Immunoblotting and immunofluorescence protocols were described elsewhere [9]. Cells were fixed in paraformaldehyde and permeabilized for 5 min at 4°C. Anti-*pH2AX*^{ser139} antibody (Upstate-Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) was used at 1:800. Anti-*BRCA1* antibodies (Santa Cruz, Tebu-Bio, Le Perray, France) were used at 1:1000 for immunoblotting and 1:100 for immunofluorescence. Anti-*MRE11* (Abcys, Paris, France), -*pATM*^{ser1981} (Abcam, Cambridge, UK), -*pP53*^{ser15}, -*pBRCA1*^{ser1423} (Upstate) were used at 1:100. Incubations with 1:100 anti-mouse TRITC

or anti-rabbit FITC secondary antibodies (Sigma-Aldrich) were performed at 37°C for 20 min. Coverslips were mounted in Vectashield with 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Abcys, Paris, France) and examined with an Olympus fluorescence microscope.

3. Results

3.1. Human glioma cell lines describe a wide range of radiation-induced DSB repair capacity

DSBs can be determined from nuclear foci formed by phosphorylation of the variant histone H2AX (pH2AX), an early NHEJ-dependent event, easily quantifiable by immunofluorescence [10]. We focused therefore on DSB repair capacity of human gliomas by using *anti-pH2AX* immunofluorescence. Glioma models described a continuous range of responses between 8 to 58 persistent pH2AX foci. In agreement with previous reports, MO59J cells exhibited one of the most severe human DSB repair deficiency [11, 12] (Fig. 1A). By excluding MO59J, two groups of molecular responses were defined: U87, U373 and LN229 showed the most efficient DSB repair (8 – 12 persistent pH2AX foci); U118, U138 and CCF showed the less efficient DSB repair (23 - 36 persistent pH2AX foci). By taking into account survival fraction at 2 Gy (SF2) available in literature [13], our findings are in agreement with a more general correlation established between SF2 and unrepaired DSBs [11] (Fig. 1B).

To pre-treat gliomas with cisplatin resulted in increasing the percentage of pH2AX foci. A linear correlation was obtained between pH2AX data post-irradiation and those obtained after combined treatment (Fig. 1C). In agreement with cisplatin-induced NHEJ inhibition [14], our data support that combined treatment provides additive effect. The number of pH2AX foci remaining appeared predictive of the molecular response to combined treatment, as well (Fig 1C).

The participation of MRE11-RAD50-NBS1 complex whether in NHEJ or homologous recombination remains controversial [15]. Our previous data support that MRE11 is involved in a recombination-like pathway acting independently of NHEJ and RAD51-dependent recombination. NHEJ inhibition would consist in increasing the number of MRE11 foci [8]. MRE11 foci were observed in all the glioma cell lines tested. After 2 Gy, the number of MRE11 foci was found proportional to those of the pH2AX foci remaining, supporting that pH2AX and MRE11 foci are equally predictive of DSB repair capacity (Fig. 2A and B).

Since phosphorylations of pH2AX and MRE11 require ATM kinase activity, glioma cell lines were also subjected to immunofluorescence with antibodies against the autophosphorylation of ATM (pATM) [16]. Very few pATM foci were observed constitutively, suggesting a moderate ATM kinase activity in the glioma models tested. MO59J elicited a marked delay in the radiation-induced ATM activation, likely due to its *ATM* mutations [17]. To the notable exception of MO59J, the glioma cell lines exhibited a maximal number of pATM foci at 10 min after 2 Gy (Fig. 2C). The number of pATM foci was found correlated with those of MRE11 foci but not with those of pH2AX, maybe because ATM and DNA-PK compete together to phosphorylate H2AX [8] (Fig. 2D).

3.2. Five among seven human glioma models exhibit impaired *BRCA1* protein

RAD51 is required by homologous recombination, a DSB repair pathway alternative to NHEJ but active in S-G2/M cells. All the glioma cell lines exhibited RAD51 foci whether spontaneously or after irradiation and cisplatin treatment, suggesting that anti-*RAD51* immunofluorescence cannot be used as a predictive assay. *BRCA1* is a protein partner of RAD51 required for DSB repair and cell cycle checkpoints [9, 18]. Anti-*BRCA1* immunoblots revealed that *BRCA1* migrated at the expected size for all the cell lines. However, *BRCA1* appeared differentially expressed: U138 and U373 elicited the weakest spontaneous *BRCA1* expression and U87 and MO59J the highest one (Fig. 3A). Ionizing radiation cause *BRCA1* phosphorylation, visible by a protein migration shift [19]. Only 2 (MO59J, U87) among 7 irradiated cell lines showed this typical shift. U373 and LN229 showed a second band above *BRCA1* that seemed too high to represent any *BRCA1* phosphorylation signal (Fig. 3A). In agreement with anti-*BRCA1* immunoblots, only MO59J and U87 elicited radiation-induced *BRCA1* foci. It is however noteworthy that some cell lines exhibit spontaneous *BRCA1* foci likely due to S-G2/M phase, consistent with the findings that radiation and cell cycle trigger phosphorylation of different *BRCA1* serines [20] (Fig. 3B). To consolidate our findings, immunofluorescence with antibodies against the phosphorylated *BRCA1* Ser¹⁴²³

(pBRCA1^{ser1423}), known to be both ATM and ATR-dependent, was performed. Again, only MO59J and U87 exhibited positive pBRCA1^{ser1423} signals (Fig. 3C). Altogether, these findings suggest that the radiation-induced BRCA1 response is functionally impaired in 2 among 7 human glioma models tested.

U87 and MO59J elicited BRCA1 foci after cisplatin treatment whereas U138, U118 and CCF did not. U373 and LN229 did show cisplatin-induced BRCA1 foci as well, whereas they were absent after irradiation, supporting that BRCA1 function is normal in these two cell lines in response to cisplatin only (Fig. 3B). This situation is not paradoxical since ATR and ATM were shown to phosphorylate different BRCA1 serines [20].

3.3. Consequences of BRCA1 impairments in cell cycle arrest of human glioma cell lines

The existence of a hierarchy between BRCA1 and downstream ATM substrates conditioning cell cycle arrests (notably p53) was pointed out elsewhere [9]. We investigated therefore the potential consequences of BRCA1 impairments in cell cycle arrest by examining flux cytometry patterns and p53 activation. The glioma cell lines tested showed similar spontaneous cell cycle distribution. After 15 Gy, the population of cells blocked in G1 diminished particularly in U118, U138 and CCF (more than 46% of relative decrease), suggesting an impaired G1 arrest in these cell lines. In parallel, the population of G2 cells increased in all the cell lines, supporting a functional radiation-induced G2 checkpoint. Interestingly, G2 patterns appeared particularly large in BRCA1-impaired cells, consistent with previous observations in BRCA1-mutated cells [21] (Fig. 4A). Treatment to cisplatin resulted in blocking cells in S phase only in U373 and LN229. Again, U118, U138 and CCF did not show any significant cell cycle arrest after such treatment. It is noteworthy that sub-G1 population was not found to be predictive of cellular response, whatever the treatment (Fig. 4A). Since p53^{ser15} phosphorylation (pP53^{ser15}) is required in stress-induced cell cycle arrest [9], anti-pP53^{ser15} immunofluorescence was also examined. While pP53^{ser15} signals were intense and nuclear in U87 and M059J (with BRCA1 functional), they were found either less intense,

cytoplasmic or absent in the other cell lines showing impaired BRCA1 (Fig 4B). Altogether, these findings suggest that despite a wide range of DSB repair capacity, the BRCA1 status of human glioma may influence the cellular response to radiation and cisplatin throughout its role in cell cycle checkpoints. Differences in BRCA1 function may generate negative response after irradiation and positive after cisplatin treatment, as observed in LN229 and U373.

4. Discussion

The radiobiological features of 7 human glioma cell lines were examined with the most recent assays (pH2AX, MRE11, pATM, RAD51 and BRCA immunofluorescence): a large spectrum of DSB repair capacity was observed, as expected in tumours. Surprisingly, the BRCA1 protein was found functionally impaired in 5 among 7 cell lines after X-rays exposure. What may be the consequences of BRCA1 impairment in anti-glioma strategies?

To date, investigations on glioma markers generally focus on actors of proliferation and there is still no consensus for any specific molecular signature for gliomas [5, 22]. No report deals with BRCA1 status. However, all the proteins groups examined (P53/MDM2/p14, RB1/CDK4/P16 and EGF/RAS/PTEN) act in proliferation process, are partners of BRCA1 but are mainly *gatekeepers* than *caretakers* like BRCA1 [5, 22]. Further investigations are therefore needed to document possible BRCA1 *functional impairment* in gliomas. Since mutations of other genes may perturb BRCA1-dependent stress signaling pathway, it must be stressed that we deliberately focused here on BRCA1 *functionality* rather *mutations*.

SF2 does not predict gliomas radiocurability like in other tumour types. It has been suggested that cellular heterogeneity inside glioma is so large that the predictive power of SF2 is limited [3, 23]. Furthermore, previous observations that impaired BRCA1 *prevents* rather than *stimulates* apoptosis support that apoptosis is not a good predictor of the clinical radioresponsiveness of gliomas [3, 9, 21, 23]. Since BRCA1 is not required in NHEJ, the major DSB repair pathway, BRCA1 impairments do not impact significantly upon the radiosensitivity of quiescent cells (while both BRCA1 positive, U87 is the most radioresistant, MO59J is the most radiosensitive). However, BRCA1 impairments are likely to be responsible of tumour heterogeneity, notably by enhancing genomic instability throughout uncontrolled cell cycle. Furthermore, BRCA1 impairments generally impact upon the response to treatments combined with chemotherapy, like cisplatin [18]. Cisplatin pre-treatment generates synchronization in the radioresistant S phase, limiting therefore the benefit of radiation delivered after *cisplatin*. When BRCA1 is impaired, cisplatin induced-synchronization

in S phase may be reduced and irradiation may target a larger population of cells in radiosensitive phases. Unfortunately, radiation treatments combined with cisplatin are still a failure for gliomas. In fact, most of combined treatments were performed with *intravenous* cisplatin whereas cisplatin was reported to be more efficient when injected *locally* [24, 25]. Our conclusions encourage therefore the development of *intracranial* cisplatin injection. The relevance of such assumption is notably illustrated by the success of the PAT-Plat treatment applied to rats bearing BRCA1-impaired F98 gliomas in which cisplatin was injected *intracerebrally* [7].

Is BRCA1 a tumour suppressor in gliomas? To date, two major models of glioblastomas formation are proposed: glioma generation would be mediated either by genomic instability and uncontrolled differentiation or by rapid transformation of some pre-existing neural stem cells [5]. BRCA1 impairments are consistent with the first hypothesis. Impaired BRCA1 may notably contribute to the lack of control of tyrosine kinase pathways that exacerbate proliferation [26].

Radiobiological investigations on human glioma models reveal that, despite a large spectrum of radiosensitivity and DSB repair capacity, BRCA1 may be impaired in a significant proportion of gliomas. Our findings raised the question of the potential implication of BRCA1 in the tumorigenicity of brain tumours. Such assumption is supported by the fact that BRCA1 tumor suppressor activity is not necessarily restricted to inherited breast and/or ovarian cancer [27]. Notably, adenovirus experiments pointed out the potential role of BRCA1 in lung and colon malignancies [28].

Further investigations are required to substantiate the double hypothesis that 1) to know the BRCA1 functionality is useful to predict the clinical response of treated gliomas, especially when radiation and cisplatin are used, and 2) impaired BRCA1 may be implicated in the genesis of some gliomas.

Acknowledgments

We thank Drs E.P Malaise, V. Favaudon and D. Marot for fruitful discussions. Human glioma cell lines were kindly provided by F. Berger. Z.B. is a PhD fellowship of Roche-France. A.J. was supported by Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. This work was supported by Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer, Electricité de France, the ETOILE Hadrontherapy Project.

References

- [1] Behin, A, Hoang-Xuan, K, Carpentier, AF, Delattre, JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;361:323-331.
- [2] Lesniak, MS, Brem, H. Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:499-508.
- [3] Taghian, A, Ramsay, J, Allalunis-Turner, J, et al. Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;25:243-249.
- [4] Holland, EC. Brain tumor animal models: importance and progress. *Curr Opin Oncol* 2001;13:143-147.
- [5] Zhu, Y, Parada, LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2002;2:616-626.
- [6] Corde, S, Balosso, J, Elleaume, H, et al. Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res* 2003;63:3221-3227.
- [7] Biston, MC, Joubert, A, Adam, JF, et al. Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 2004;64:2317-2323.
- [8] Joubert, A, Foray, N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies (Chapter 10). In: Landseer, BR., editor. *New Research on DNA Repair*. Hauppauge NY: Nova Science Publishers, Inc. 2006.
- [9] Foray, N, Marot, D, Gabriel, A, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* 2003;22:2860-2871.
- [10] Rothkamm, K, Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5057-5062.
- [11] Chavaudra, N, Bourhis, J, Foray, N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother Oncol* 2004;73:373-382.
- [12] Lees-Miller, SP, Godbout, R, Chan, DW, et al. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 1995;267:1183-1185.
- [13] Joiner, MC, Marples, B, Lambin, P, Short, SC, Turesson, I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:379-389.
- [14] Turchi, JJ, Henkels, KM, Zhou, Y. Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic Acids Res* 2000;28:4634-4641.
- [15] Di Virgilio, M, Gautier, J. Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J Cell Biol* 2005;171:765-771.
- [16] Bakkenist, CJ, Kastan, MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
- [17] Tsuchida, R, Yamada, T, Takagi, M, et al. Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast. *Radiat Res* 2002;158:195-201.
- [18] Scully, R, Chen, J, Plug, A, et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997;88:265-275.
- [19] Scully, R, Chen, J, Ochs, RL, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 1997;90:425-435.
- [20] Xu, B, Kim, S, Kastan, MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001;21:3445-3450.

- [21] Foray, N, Randrianarison, V, Marot, D, Perricaudet, M, Lenoir, G, Feunteun, J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* 1999;18:7334-7342.
- [22] Bredel, M, Bredel, C, Juric, D, et al. High-resolution genome-wide mapping of genetic alterations in human glial brain tumors. *Cancer Res* 2005;65:4088-4096.
- [23] Taghian, A, Suit, H, Pardo, F, et al. In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:55-62.
- [24] Sheleg, SV, Korotkevich, EA, Zhavrid, EA, et al. Local chemotherapy with cisplatin-depot for glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2002;60:53-59.
- [25] Fehlauer, F, Muench, M, Rades, D, et al. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:723-732.
- [26] Foray, N, Marot, D, Randrianarison, V, et al. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol* 2002;22:4020-4032.
- [27] Rosen, EM, Fan, S, Isaacs, C. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:533-548.
- [28] Marot, D, Opolon, P, Brailly-Tabard, S, et al. The tumor suppressor activity induced by adenovirus-mediated BRCA1 overexpression is not restricted to breast cancers. *Gene Ther* 2006;13:235-244.
- [29] Ponten, J, Macintyre, EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;74:465-486.
- [30] Diserens, AC, de Tribolet, N, Martin-Achard, A, Gaide, AC, Schnegg, JF, Carrel, S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol (Berl)* 1981;53:21-28.
- [31] Barna, BP, Chou, SM, Jacobs, B, Ransohoff, RM, Hahn, JF, Bay, JW. Enhanced DNA synthesis of human glial cells exposed to human leukocyte products. *J Neuroimmunol* 1985;10:151-158.
- [32] Allalunis-Turner, MJ, Barron, GM, Day, RS, 3rd, Dobler, KD, Mirzayans, R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiat Res* 1993;134:349-354.

LEGEND TO FIGURES

Fig. 1: DSB repair capacity by NHEJ pathway. **A.** *Upper panel.* Numbers of pH2AX foci remaining after 2 Gy followed by 24 h in cells pre-treated or not to 10 μ M cisplatin. Each data represents the mean \pm standard error of three replicates. *Lower panel.* Representative pH2AX signals. **B.** Correlation between percentages of pH2AX foci remaining after 2 Gy shown in panel A and the corresponding SF2 values available in literature [13]. Dotted line represents the correlation obtained from 20 human tumor cell lines in exponential phase of growth (DSB repair data were assessed with pulsed field gel electrophoresis (grey areas designed the deduced confidence zones of average radioresistance and radiosensitivity)). Dashed line represents the correlation previously obtained [11]. **C.** Numbers of pH2AX foci remaining after exposure to 2 Gy plotted against the corresponding pH2AX data obtained after combined treatment (see panel A). A linear correlation was obtained between the two modalities : $y = 8.88 + 1.07x$; $r = 0.91$.

Fig.2: DSB repair capacity by MRE11-and ATM-dependent pathways.

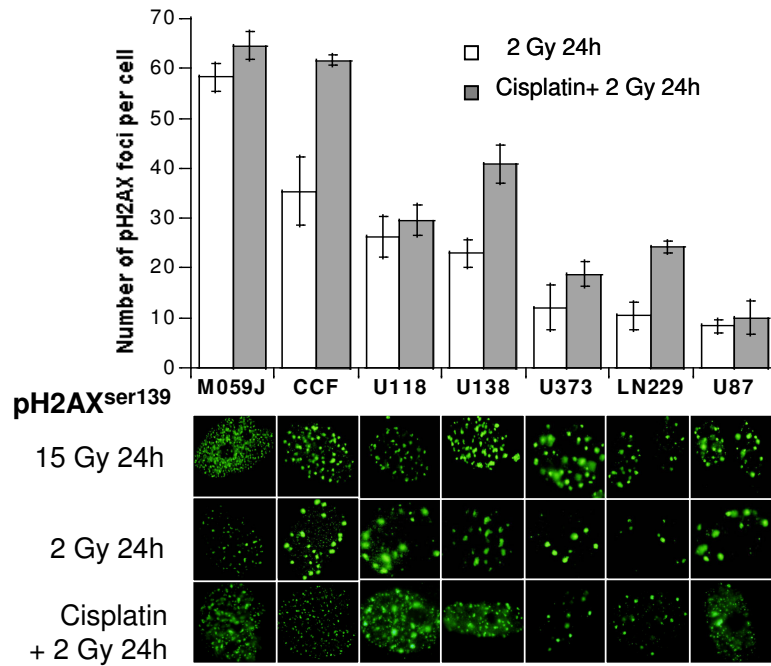
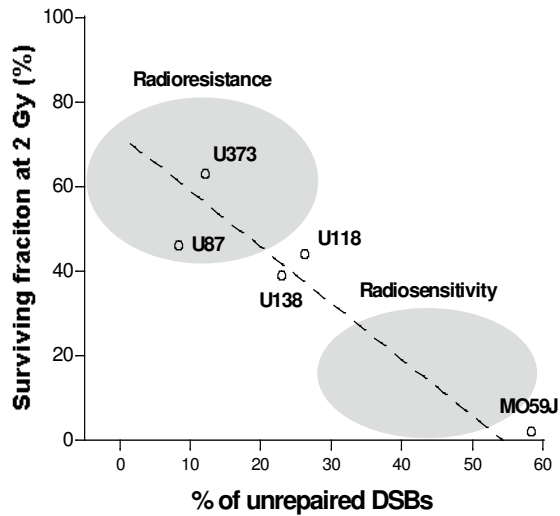
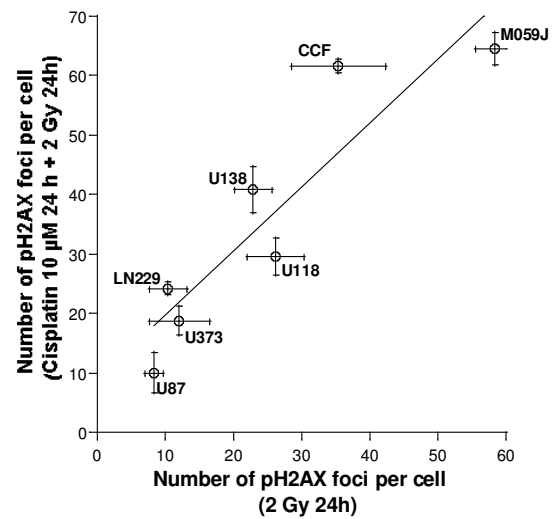
A. *Upper panel.* Anti-*MRE11* immunofluorescence was applied to the indicated cell lines subjected to 2 Gy X-rays followed by 4 h for repair. Numbers of MRE11 foci were shown. Each data represents the mean \pm standard error of three replicates. *Lower panel.* Representative MRE11 signals. **B.** Correlation between pH2AX and MRE11 foci. Numbers of pH2AX foci after exposure to 2 Gy (shown in Fig. 1A) were plotted against the corresponding MRE11 data (shown in Fig. 2A). A linear correlation was obtained between the two endpoints: $y = 9.57 + 1.21x$; $r = 0.94$. **C.** *Upper panel.* Numbers of pATM foci after 2 Gy followed by 10 min and 4 h. Each data represents the mean \pm standard error of three replicates. *Lower panel.* Representative pATM signals observed at 4 h. **D.** Numbers of pATM foci after exposure to 2 Gy followed by 4 h (shown in Fig 2C) plotted against the corresponding pH2AX datas (shown in the Fig 1A). A linear correlation was obtained between the two endpoints: $y = - 30.62 + 1.68x$.; $r = 0.98$.

Fig. 3: Expression, localization and phosphorylation of BRCA1. **A.** Representative examples of anti-*BRCA1* immunoblots of nuclear extracts from the indicated human cells exposed to 15 Gy followed by 4 h. **B.** Anti-*BRCA1* immunofluorescence was applied to the indicated cell lines after 15 Gy X-rays followed by 4 h or after 10 μ M cisplatin for 24 h. **C.** Representative examples of pBRCA1^{ser1423} signals obtained in the glioma cell lines after 15 Gy X-rays followed by 4 h.

Fig. 4: Cell cycle arrests after exposure to X-rays or cisplatin. **A.** Representative cytometry patterns of cell cycle distribution observed after exposure to 15 Gy followed by 24 h for repair or 24 h after 10 μ M cisplatin treatment. **B.** Representative examples of anti-pP53^{ser15} immunofluorescence obtained after exposure to 2 Gy followed by 24 h.

Table 1 : Origin and biological features of the rodent and human glioma models used in this study.

Cell line	Tumour type	Grade	Donor age	Tumorigenicity in nude mice	BRCA1 functional status	Depositor	Reference
U87MG (HTB 14)	Human glioblastoma astrocytoma	III	44	Yes	+	J Ponten	[29]
U118MG (HTB 15)	Human glioblastoma astrocytoma	III	50	Yes	-	J Ponten	[29]
U138MG (HTB 16)	Human glioblastoma astrocytoma	III	47	No	-	J Ponten	[29]
U373MG (HTB17)	Human glioblastoma astrocytoma	III	?	Yes	+/-	J Ponten	[29]
LN229	Human glioblastoma	III	60	Yes	+/-	N de Tribolet	[30]
CCF-STTG1	Human astrocytoma	IV	68	No	-	ATCC depository	[31]
MO59J	Human glioblastoma	III	33	No	+	J Allalunis-Turner	[32]

A**B****C****Figure 1**

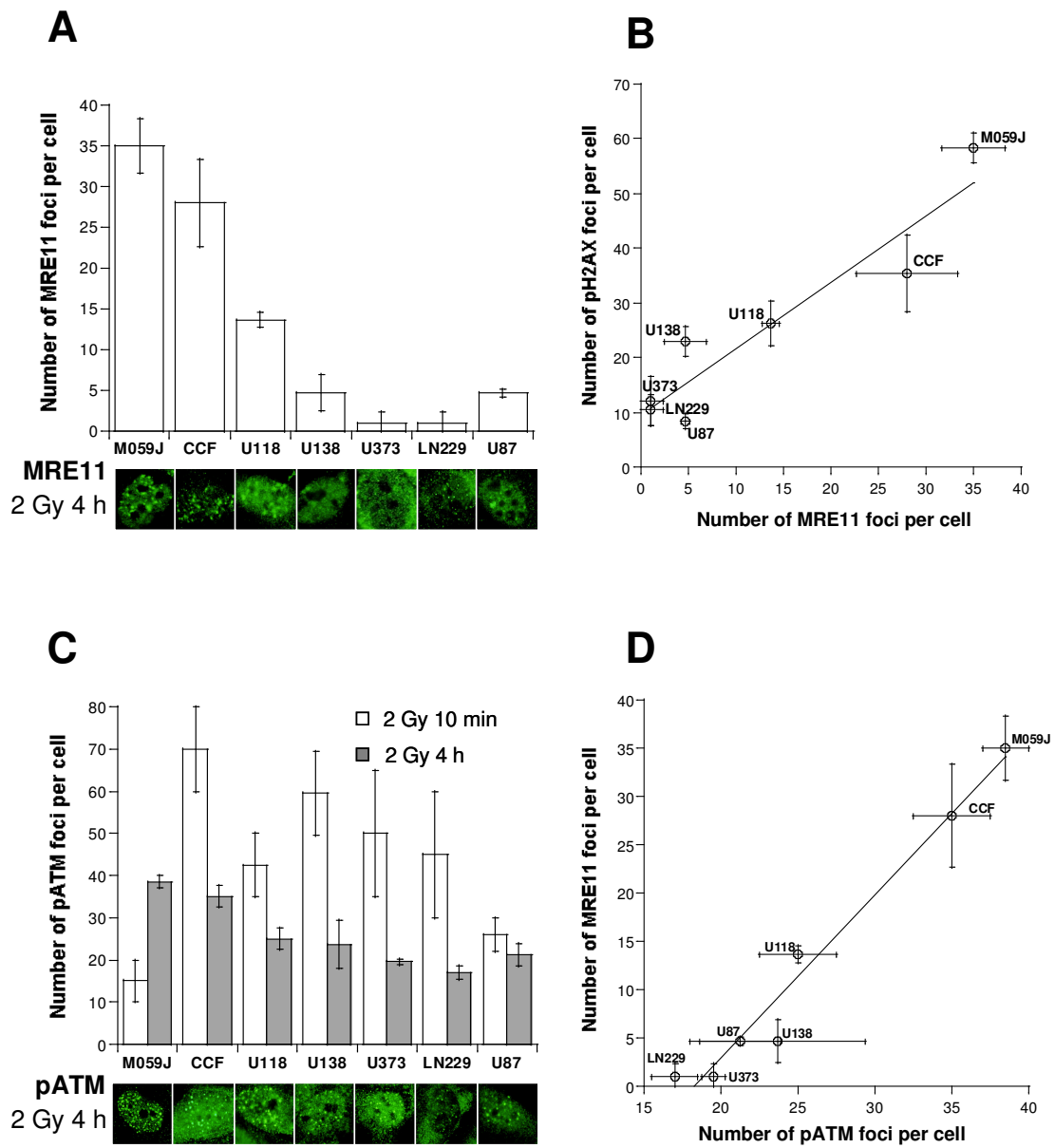
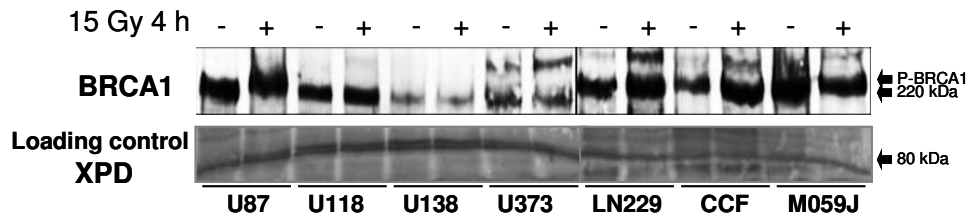
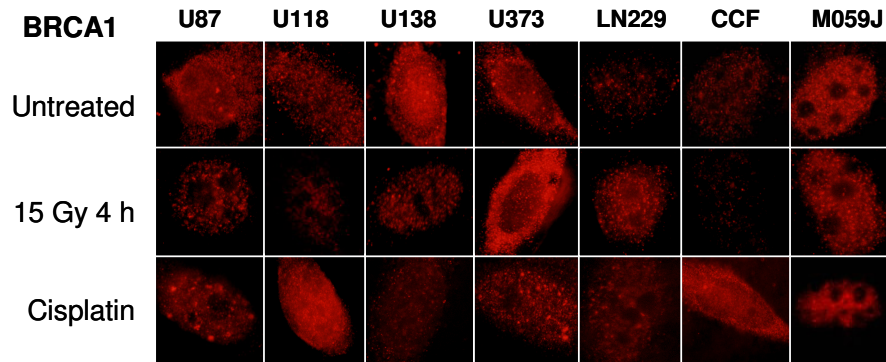
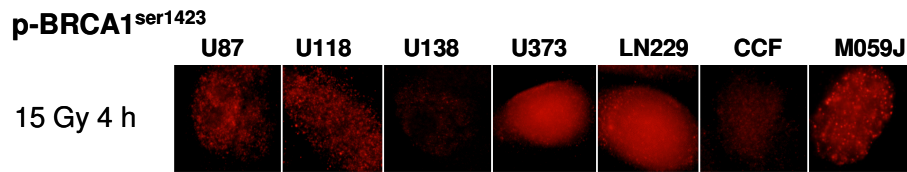


Figure 2

A**B****C****Figure 3**

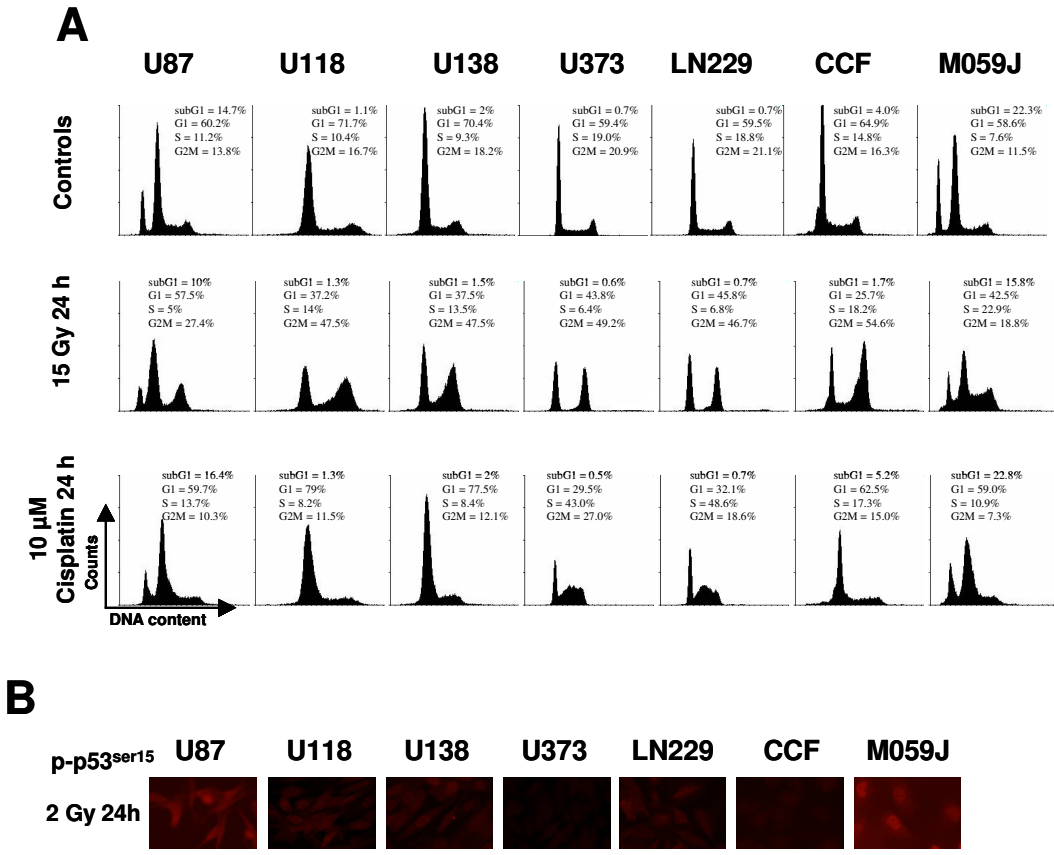


Figure 4

Article V

**The neurofibromatosis type I protein participates to the ATM-dependent signaling
and DNA repair pathways in response to ionising radiation**

Zuzana Bencokova, Clément Devic, Aurélie Joubert, Catherine Massart and Nicolas Foray

Soumis en mai 2007.

The neurofibromatosis type I protein participates to the ATM-dependent signaling and DNA repair pathways in response to ionising radiation

Zuzanna Bencokova[†], Clément Devic, Aurélie Joubert^{†,§}, Catherine Massart[†] and Nicolas Foray^{†,#}

[†]*Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043 Grenoble, France;*

[§]*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France;*

Pages: 19 including

Table: 1

Figures : 2

Keywords : neurofibromatosis; NF1; DSB repair; H2AX; MRE11

Indexing phrase : DNA damage repair and signaling in neurofibromatosis type

[#]Author for correspondence: Dr. Nicolas Foray

Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, 38043, Grenoble, France;

Tel : (33) 4 76 88 25 41 Fax : (33) 4 76 88 28 85

Email : foray@esrf.fr

Abstract

Purpose: Neurofibromatosis type 1 (NF1) is the most common cancer predisposition syndrome, whether for the occurrence of *benign* tumors or for *malignant* ones. Few studies dealt with the molecular and cellular response of NF1 cells to ionising radiation. Here, we examined the ATM-dependent signalling and DNA repair pathways in NF1 fibroblasts.

Materials and methods: Clonogenic assays and immunofluorescence with pH2AX, pDNA-PK, pATM, p53BP1 and MRE11 were applied to three untransformed NF1 fibroblasts.

Results: NF1 fibroblasts showed significantly more persistent pH2AX foci after 2 Gy than radioresistant controls, suggesting a slower repair rate of DNA double-strand breaks. Unlike DNA-PK, the ATM kinase activity appeared to be abnormally low in the first 2 h post-irradiation, suggesting a requirement of NF1 protein for the ATM-dependent post-stress signaling. Lastly, NF1 fibroblasts show abnormally high MRE11 activity favouring genomic instability.

Conclusions: It is suggested here that NF1 syndrome belongs to the group of genetic diseases associated with low but significant DNA end-joining repair defect and impaired MRE11 pathway. Although a single radiation dose does not reveal lethality, chronic or fractionated irradiation may result in the accumulation of unrepaired DSB and reach a threshold of toxicity.

1. Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder that was firstly identified by Friedrich Von Recklinghausen in 1882. NF1 is the most common cancer predisposition syndrome, with a birth incidence of 1/2500 and a minimum prevalence of 1/5000. NF1 is mainly associated with the formation of *benign* tumors along peripheral and optic nerves (neurofibromas and gliomas) and the particular occurrence of melanocytes called “café-au-lait” spots (Zhu and Parada 2002; Ferner 2007); NF1 is also classified as a *familial* cancer syndrome since NF1 patients have high incidence of *malignant* tumors such as neurofibrosarcomas, astrocytomas and rhabdomyosarcomas. Despite a penetrance of 100%, phenotype of NF1 patients and clinical manifestation may vary drastically inside a given proband. Hence, some clinical diagnostic criteria were proposed: at least two criteria among the following ones are needed for NF1 diagnosis: six or more café au lait spots, at least two neurofibromas or one plexiform neurofibroma, axillary or groin freckling, Lisch nodules, optic pathway glioma, a first degree relative with NF1 and/or a distinct osseous lesion such as sphenoid wing dysplasia (Zhu and Parada 2002; Ferner 2007).

NF1 syndrome is caused by mutations of the NF1 gene, located on chromosome 17q11 and that encodes for a 2818 amino acids protein designated *neurofibromin*. Neurofibromin is highly conserved during evolution and contains domains sharing homology with GTPase-activating (GAP) proteins. Hence, a number of reports support that NF1 protein would inhibit the proto-oncogene Ras. Impaired NF1 would therefore compromise Ras inactivation resulting in abnormal proliferation. However, although there is evidence from genetics and epidemiology data that NF1 acts as a tumor suppressor, this molecular model needs to be more documented since loss of NF1 does not necessarily result in a systematic decrease of Ras levels in all the brain tumor tissues (Zhu and Parada 2002; Dilworth, Kraniak et al. 2006).

Since NF1 syndrome is associated to high susceptibility of benign and malignant tumors, its current management has early raised the problem of potential radiosensitivity of NF1 tumors and patients. Since three decades, the great majority of authors concluded to a normal response to radiation. Notably, no difference between cells from NF1 patients and controls was observed with respect to spontaneous or X-ray-induced chromosomal aberrations and clonogenic survival (Troilo, Strong et al. 1992). However, high and intermediate radiosensitivity after chronic-gamma-rays irradiation was observed in cells of NF patients of normal appearance and café-au-lait spots, respectively (Hannan, Smith et al. 1990). Furthermore, two NF1 patients were shown to elicit compromised apoptotic T-cell response to X-rays (Crompton, Shi et al. 2001) (Table 1). Further radiobiological investigations are therefore needed to investigate a possible involvement of NF1 protein in the response to radiation.

Our understanding of DNA damage and repair has considerably progressed all along these last years. This is notably the case of DNA double-strand breaks (DSBs) that, if unrepaired, can result in cell lethality, or if misrepaired, can cause potential cancer onset. Recently, it has been demonstrated that radiation-induced DSBs can be determined from the number of nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant histone H2AX (pH2AX) and easily quantifiable using immunofluorescence (Rothkamm and Lobrich 2003). In addition to advances in DNA repair, stress signaling is more and more documented as well. Particularly, a functional and temporal hierarchy of ATM-dependent phosphorylation events occurring early after irradiation has been demonstrated. Such phosphorylations, quantifiable using immunofluorescence, condition the success of DNA repair, cell cycle arrests and death pathways (Foray, Marot et al. 2003). Here, we investigated the molecular and cellular response to radiation of three untransformed NF1 fibroblast cell lines by using a number of markers of DSB repair and signaling like pH2AX, pDNA-PK, MRE11, 53BP1.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Untransformed cell lines were used for their genomic stability and to avoid any confounding effect of immortalization. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (95 - 99 % of cells in G0/G1) to overcome any bias generated by cell cycle effects. As specified in Table 2, five untransformed human fibroblasts from different origins have been used, 1BR3 and AT1BR cells whose major radiobiological features were published elsewhere, were used as radioresistant and radiosensitive controls, respectively. All the other cell lines were purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA). NF1 cells are GM01633, GM01858 and GM01859. GM01858 and GM01859 provided from biopsy in apparently normal skin area or in cafe-au-lait spots from the same NF1 donor. GM07166 are *NBS1*-mutated fibroblasts and were used as reference for moderate radiosensitivity.

2.2. X-rays Irradiation

An X-rays clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-rays beam was produced from a tungsten anode, applying a voltage setting of 200 KV, an intensity of 20 mA and using a filtration of 0.1 mm copper filter. The dose-rate was 1.234 Gy.min⁻¹.

2.3. Cell survival

The intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2) from standard clonogenic assay by plating cells in plateau phase of growth 24 h after irradiation (delayed plating, dp), as previously described (Badie, Iliakis et al. 1995). SF2dp has been deliberately chosen as an endpoint of intrinsic radiosensitivity since this parameter, that integrates the capacity of cells for repairing potentially lethal damage (PLD), was shown to better discriminates cell lines than SF2 after immediate plating (Deschavanne, Fertil et al. 1990). Further, since a linear link does exist between SF2dp and SF2ip of radiosensitive cells, the nature of these correlations between DNA repair defects and survival did not change by using SF2ip (Deschavanne, Fertil et al. 1990).

2.4. Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere (Foray, Marot et al. 2002). Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4°C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37°C, respectively. Anti-*pH2AX* antibody was purchased from Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) and used at 1:800. Anti-*MRE11* (Abcys, Paris, France), anti-*MDC1* and-*pDNA-PK* (Abcam, Cambridge, UK) and anti-*53BP1* (Upstate-Euromedex) were used at 1:100 dilution. FITC secondary antibody was purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and used at 1:100. Coverslips were mounted in Vectashield mounting solution (Abcys) and examined with a Olympus fluorescence microscope.

2.5. Flux cytometry

About 5 x 10⁵ cells were seeded onto a 100 mm dish, exposed to X-rays at the indicated doses and repair times. Cells were trypsinized and fixed with ice-cold 70% ethanol at a density of 5 x 10⁵ cells per ml and stored at -20°C. Before analysis, cells were resuspended in 0.1 ml of PBS and stained by propidium iodide (5 µg.ml⁻¹) in the presence of 50 µg.ml⁻¹

RNAse. At least 10^4 cells were analysed using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson- France, Pont de Claix, France) and WinMDI 2.8 software (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1 Localisation and expression of NF1 protein in fibroblasts of different origin

As a first step, we investigated the spontaneous and X-rays induced localisation and the expression of the NF1 protein in untransformed skin fibroblasts of different origin by using immunofluorescence technique (Figure 1). In 1BR3 controls (Figure 1A), NF1 appeared essentially cytoplasmic, with a particularly high expression in the Golgi complex. A low but significant NF1 staining was systematically observed in nuclei, suggesting a non-negligible nuclear localisation of the protein, localisation and expression level of NF1 did not change deeply after exposing 1BR3 controls to UV and to low X-rays doses (2 Gy). However, a nucleo-shuttling of the NF1 protein was noticed only after very high X-rays doses (15 Gy). In NF1 fibroblasts, the localisation of the NF1 protein, whether spontaneous or X-rays-induced, did not change significantly. However, its level of expression appeared lower than in 1BR3 cells. Interestingly, *ATM*- and *NBS*-mutated fibroblasts (Figure 1B) elicited a cytoplasmic form of the NF1 protein with expression levels significantly lower than all the other cell lines tested here, suggesting that the localisation and the expression of the NF1 protein may be *ATM*- and *NBS1*-dependent.

3.2 NF1 fibroblasts show a low but significant radiosensitivity associated with persistent unrepaired DSBs

Recently, a one-to-one correlation was found between DSBs and nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant H2AX histone (pH2AX) (Rothkamm and Lobrich 2003). The anti-pH2AX immunofluorescence was applied to NF1 fibroblasts after 2 Gy X-rays followed by 0-24 h repair time (Figure 2A). In radioresistant 1BR3 controls, the number of pH2AX foci scored immediately after irradiation was about 40 foci per Gy per cell and the kinetics of pH2AX foci disappearance corresponded with the DSB repair rate assessed by pulsed field gel electrophoresis with no persistent pH2AX 24 h after irradiation. Interestingly, the number of induced pH2AX foci scored immediately after irradiation in NF1 fibroblasts was systematically lower than that in 1BR3. These findings will be investigated further in the next section. Furthermore, NF1 fibroblasts showed significantly ($p < 0.01$, ANOVA) higher amount of persistent pH2AX foci at 24 h (NF1a: 10.4 ± 2.1 ; NF1b: 12.4 ± 1.43 , NF1c: 8.8 ± 1.2) than radioresistant controls (1BR3: 0.8 ± 0.4), suggesting a slower DSB repair rate (Figure 2A, 2B). Unlike in the other cells, the pH2AX foci in *ATM*-mutated cells reached their maximum (that did not exceed 25 foci per Gy) at 4 h post-irradiation and decreased at 24 h up to an average yield of 20 pH2AX. These last data suggest that *ATM* kinase is required for the early phosphorylation of pH2AX foci, in agreement with previous reports.

Recently, a quantified correlation was obtained between SF2 and unrepaired DSB assessed after 2 Gy followed by 24 h repair with a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity. The surviving fraction at 2 Gy after delayed plating was assessed in the NF1 cell lines tested here: the resulting SF2 and pH2AX data obeyed this correlation, suggesting that NF1 syndrome may be associated with a low but significant radiosensitivity (Figure 2C).

Unrepaired DSBs that propagate all along the cell cycle may lead to irreversibly damaged chromosomal fragments causing mitotic death with micronuclei formation and/or apoptosis. In order to consolidate the DSB repair deficiency and the moderate radiosensitivity described above, we examined the yield of micronuclei observed in irradiated cells subjected to immunofluorescence. NF1 cells did not show any spontaneous micronuclei or apoptotic body. Conversely, the percentage of cells with micronuclei was found higher in NF1 cells than in controls (Figure 2D). No radiation-induced apoptosis body was found after 2 Gy in any cell lines tested, in agreement with the observations that apoptosis is not a major cell death pathway in untransformed fibroblasts.

3.3 NF1 fibroblasts show impaired ATM but normal DNA-PK activity in response to radiation

As described above, the number of induced pH2AX foci scored immediately after irradiation in NF1 fibroblasts was systematically lower than that in 1BR3. These findings may suggest either a lack in DSB recognition or a lesser accessibility of chromatin to radiation that would be specific to NF1 fibroblasts. With regard to this last assumption, immunofluorescence observations revealed, that nuclei of NF1 fibroblasts were significantly larger than those of controls, consistent with a decondensed chromatin. Further investigations are obviously required to consolidate this model. With regard to the assumption about DSBs recognition, we evaluated the activity of ATM and DNA-PK, the two major kinases responsible for the radiation-induced phosphorylation of H2AX histone, by using immunofluorescence with specific antibodies against the autophosphorylation of both kinases (pATM and pDNA-PK, respectively).

In 1BR3 controls, an exposure to 2 Gy resulted in an early formation of nuclear pATM foci: more than 40 pATM foci were observed at 10 minutes after irradiation. This number progressively decreased with repair time. 2.75 ± 1.4 of pATM foci were observed at 24 h post-irradiation. In NF1 fibroblasts, the number of pATM foci produced early after irradiation was found significantly lower in NF1 fibroblasts than in controls (NF1a 1.5 ± 1.5 ; NF1b 25 ± 5 ; NFc 15 ± 6.2 vs 1BR3 43.8 ± 8.1 , $p < 0.01$ ANOVA) (Figure 3). Further, kinetics of appearance and disappearance of pATM foci were also found abnormally delayed. Conversely, no significant difference was observed in residual foci at 24 h. The above pH2AX data supported the hypothesis that ATM kinase is required for the early radiation-induced phosphorylation of H2AX. Hence, the impaired kinetics of pATM foci may suggest an abnormal ATM kinase activity in NF1 fibroblasts in response to radiation.

The autophosphorylation of DNA-PK lead to a nuclear relocalisation identifiable with immunofluorescence. In 1BR3 controls, an exposure to 2 Gy resulted in the formation of nuclear pDNA-PK at a similar extent and rate than with pH2AX. This conclusion was also reached with NF1 fibroblasts: like pH2AX, the number of induced pDNA-PK foci scored immediately after irradiation in NF1 fibroblasts was systematically lower and the number of pDNA-PK remaining at 24 h was systematically higher than those of 1BR3 controls (Figure 4). Altogether, these data support an abnormal ATM kinase activity and a low defect in DNA-PK NHEJ repair pathways in NF1 fibroblasts.

As suggested by some manufacturers, antibodies against phosphorylated DNA-PK forms may recognize also the 53BP1 protein, an ATM substrate, known as an early actor of the radiation response. In order to overcome any potential artefact of the *anti-pDNA-PK* immunofluorescence, irradiated fibroblasts were subjected to *anti-53BP1* immunofluorescence (data not shown). Ten minutes after 2 Gy, only 15 53BP1 foci were observed (80 was scored with pDNA-PK antibodies) in 1BR3 controls. The yield of 53BP1 foci reached in these cells their maximum (that did not exceed 40 foci per Gy) at 1 h post-irradiation and decreased progressively at 24 h up to an average yield of 3 foci at a similar rate to that of pDNA-PK. No significant difference was observed in NF1 fibroblasts, suggesting that the NF1 protein is not required for the ATM-dependent phosphorylation of 53BP1 in response to radiation.

3.4 NF1 fibroblasts show impaired abnormally high MRE11 activity

ATM kinase was shown to phosphorylate a number of protein substrates involved in the cascade of molecular events that follows an irradiation. This is notably the case of MRE11 protein, a component of the RAD50-MRE11-NBS1 complex that forms nuclear foci after genotoxic stress. Some authors have however proposed that MRE11 participates to the NHEJ pathway, notably on

the base of *co-immunofluorescence* observations showing that MRE11 and pH2AX co-localize early after irradiation. Nevertheless, the involvement of MRE11 in the NHEJ process is still controversial. Furthermore, our recent findings supported that co-immunofluorescence of pH2AX and MRE11 may introduce biases due to the bleed-through fluorescence phenomenon and that the kinetic of MRE11 foci is clearly different from that of pH2AX histones (Rénier, Joubert et al. 2007). We investigated therefore the occurrence of MRE11 foci in the NF1 fibroblasts. MRE11 foci in 1BR3 controls appeared from 2 to 8 h after 2 Gy and reached their maximal yield at 4 h (Figure 5). Interestingly, the three NF1 cell lines showed an earlier occurrence of MRE11 foci (reached about 2 h post-irradiation) and with a larger number of foci (NF1a 20 ± 2 ; NF1b 22 ± 8 ; NFc 15.5 ± 0.5 vs 1BR3 1.3 ± 0.4 , $p < 0.01$ ANOVA). Lastly, the numbers of MRE11 foci remaining 24 h were also higher than controls. Altogether, these findings support a significantly higher stimulation of the MRE11-dependent repair pathways in NF1 fibroblasts, suggesting genomic instability and constant presence of unrepaired DSBs.

4. Discussion

Most of the studies dealing with NF1 support that this syndrome predispose to various malignancies. However, the molecular and cellular bases of the cancer-proneness associated with NF1 suggested a potential relationship between NF1 mutations and cellular sensitivity to radiations, as it is observed with other syndromes like ataxia-telangiectasia or Xeroderma Pigmentosum. Surprisingly, most of the literature data show no difference between radiosensitivity of NF1 cells and that of radioresistant controls. The radioresistance of NF1 cells appears sometimes so obvious that some authors have hypothesized that an enhanced radiotolerance is correlated with cancer proneness (Kopelovich and Rich 1986). However, even if the term cellular radiosensitivity reflects nearly systematically clonogenic survival, there are a number of different experimental protocols for evaluating survival. As an example, Mao et al. applied to ten fibroblast cell lines derived from NF1 patients a single X-rays dose immediately after seeding: they concluded that radiosensitivity of NF1 cells varied with the same range than that of radioresistant controls (Mao, Krone et al. 1985). Conversely, while they reached the same conclusion with acute gamma-irradiation Hannan et al. (Hannan, Smith et al. 1990) observed a clonogenic survival significantly lower in NF1 fibroblasts than controls when chronic gamma-irradiation was applied (7.8 cGy per min). In the present paper, it is noteworthy that we have deliberately chosen survival protocol consisting in seeding cells 24 h after irradiation to better account for potentially lethal damage as suggested by literature. Hence, while a single dose of radiation does not appear sufficient to distinguish NF1 cells from controls, survival protocols allowing repair seems to increase the differences of survival. In our conditions, such conclusions were systematically reached with cells from syndromes associated with weak radiosensitivity and moderate DNA repair deficiency, as if the accumulation of unrepaired damage was required to reveal abnormal molecular and cellular response. Interestingly, postirradiation neurofibrosarcomas emerge after long latency periods in NF patients (Ducatman and Scheithauer 1983). Further, a recent study demonstrated that NF1 patients submitted to radiotherapy for optic gliomas elicit a relative risk of second cerebral tumor after radiotherapy was 3.04 (12 cases in 308 person-years). All the radiotherapy treatments of these patients consisted in about 20 fractions of 2 Gy. Altogether, this survival data support that NF1 syndrome may be associated with low but significant radiosensitivity suggesting therefore a low but significant proportion of unrepaired DNA damage.

Early correlated with clonogenic survival, cytogenetics analysis has long been applied to NF1 cells. Yields of spontaneous and X-rays induced chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges were found to be normal in NF1 cells (Troilo, Strong et al. 1992). However, protocols applied to evaluate chromosomal aberrations require certain period of time to obtain metaphases. During this period, repair may impact upon final values. In this paper, in order to overcome technical artefacts, we proposed to apply the most recent conceptual and technical advances in radiobiology to investigate further the DNA damage repair and signalling repair in NF1 cells. Hence, it is the first time, to our knowledge, that NF1 fibroblasts were subjected to immunofluorescence with phospho-specific antibodies against pDNA-PK, pH2AX, PATM, 53BP1, RAD51 and MRE11. These series of markers has the remarkable advantage to reflect the major DSB repair pathways. The anti-pH2AX immunofluorescence has proved to be a sensitive technique. Our recent study dealing with pH2AX data from 40 human fibroblast cell lines from different origin and covering a wide range of radiosensitivity showed a significant quantitative correlation between survival fraction as 2 Gy and the number of residual pH2AX foci. Hence, cells with moderate radiosensitivity show a low but significant number of pH2AX foci (Joubert, Gamo et al. 2007). Here, the number of radiation-induced pH2AX foci scored immediately after

irradiation in NF1 fibroblasts was systematically lower than that in 1BR3 controls, suggesting that NF1 belongs to the group of low but significant radiosensitive syndromes. An abnormal ATM kinase activity and a low but significant defect in DNA-PK kinase activity support this hypothesis. Altogether, our data support that NF1 fibroblasts may show moderate defects in NHEJ, the major DSB repair pathways in mammals. The impairment of NHEJ in NF1 cells would be probably due to an insufficient ATM kinase in the first hours post-irradiation. The NF1 protein is essentially cytoplasmic. ATM kinase was reported to localize also in cytoplasm. Hence, it is possible that NF1 is required either for the stress-induced nucleo-shuttling of ATM or for ATM kinase activity in nucleus. Further investigations are obviously needed to support these hypotheses.

The above findings can explain radiosensitivity and toxic effects of radiation but does not necessarily account for heterogeneity, genomic instability and cancer proneness. Our recent findings supported that co-immunofluorescence of FITC-(green) and TRITC-(red)-stained markers may introduce biases due to the bleed-through fluorescence phenomenon. Hence, despite co-immunofluorescence of pH2AX and MRE11, the kinetic of radiation-induced MRE11 foci is clearly different from that of pH2AX ones, suggesting that MRE11 does not participate necessarily to the same pathways as pH2AX (Joubert, Gamo et al. 2007). In addition, cells from syndromes associated with cancer proneness but with low and significant radiosensitivity in G1 show negligible number of residual pH2AX foci after 2 Gy, suggesting that pH2AX marker does not account for all the radiosensitivity of human quiescent cells. Hence, we did propose a model in which abnormally high number of MRE11 foci reflects hyperrecombination, misrepair and genomic instability. Here, the number of MRE11 was particularly high and their occurrence much earlier than in radioresistant controls. In our previous study, the group of syndromes associated with moderate radiosensitivity (weak NHEJ deficiency) and with high cancer proneness, was systematically characterized by high MRE11 activity. In these syndromes, high MRE11 nuclease activity is associated with chromatin decondensation and particularly large nuclei. Interestingly, NF1 fibroblasts showed X times large nuclei than controls.

Altogether our findings strongly suggest that NF1 belongs to the presided group of syndromes which would provide insights for the response to radiation and the cancer proneness of NF1 syndrome.

Acknowledgments

We would like to thank Drs E.P Malaise, V. Favaudon and D. Marot for fruitful discussions. Z.B. is a PhD fellowship of Roche-France. A.J. was supported by the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. This work was also supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Electricité de France, the ETOILE hadrontherapy Project and the Ligue contre le Cancer (Comité de la Savoie).

- Badie, C., G. Iliakis, et al. (1995). "Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines." *Radiat Res* 144(1): 26-35.
- Crompton, N. E., Y. Q. Shi, et al. (2001). "Sources of variation in patient response to radiation treatment." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49(2): 547-54.
- Deschavanne, P. J., B. Fertil, et al. (1990). "The relationship between radiosensitivity and repair of potentially lethal damage in human tumor cell lines with implications for radioresponsiveness." *Radiat Res* 122(1): 29-37.
- Dilworth, J. T., J. M. Kraniak, et al. (2006). "Molecular targets for emerging anti-tumor therapies for neurofibromatosis type 1." *Biochem Pharmacol* 72(11): 1485-92.
- Ducatman, B. S. and B. W. Scheithauer (1983). "Postirradiation neurofibrosarcoma." *Cancer* 51(6): 1028-33.
- Ferner, R. E. (2007). "Neurofibromatosis 1." *Eur J Hum Genet* 15(2): 131-8.
- Foray, N., D. Marot, et al. (2003). "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein." *Embo J* 22(11): 2860-71.
- Foray, N., D. Marot, et al. (2002). "Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation." *Mol Cell Biol* 22(12): 4020-32.
- Hafez, M., S. M. Abd el-Nabi, et al. (1986). "Enhanced response to the induction of sister chromatid exchange by gamma radiation in neurofibromatosis." *Cancer* 57(10): 1937-40.
- Hafez, M., L. Sharaf, et al. (1985). "Evidence of chromosomal instability in neurofibromatosis." *Cancer* 55(10): 2434-6.
- Hannan, M. A., K. Sackey, et al. (1993). "Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis." *Cancer Genet Cytogenet* 66(2): 120-5.
- Hannan, M. A., B. P. Smith, et al. (1990). "Radiosensitivity of fibroblasts obtained from a cafe-au-lait spot and normal-appearing skin of a patient with neurofibromatosis (NF-6)." *Cancer Genet Cytogenet* 47(2): 191-6.
- Joubert, A., K. Gamo, et al. (2007). DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? Publication submitted.
- Kopelovich, L. and R. F. Rich (1986). "Enhanced radiotolerance to ionizing radiation is correlated with increased cancer proneness of cultured fibroblasts from precursor states in neurofibromatosis patients." *Cancer Genet Cytogenet* 22(3): 203-10.
- Mao, R., W. Krone, et al. (1985). "Cell-culture studies on neurofibromatosis (von Recklinghausen's disease). III. Experiments on X-ray sensitivity." *Arch Dermatol Res* 277(6): 439-43.
- Rénier, W., A. Joubert, et al. (2007). "Consequences of the *bleed-through* phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci." *International Journal of Radiation Biology*.
- Rothkamm, K. and M. Lobrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5057-62.
- Schwenn, M. R., R. R. Weichselbaum, et al. (1985). "Investigation of the cytotoxic effects of DNA damaging agents on neurofibromatosis cells." *Mutat Res* 142(1-2): 55-8.
- Troilo, P., L. C. Strong, et al. (1992). "Spontaneous and induced levels of chromosomal aberration and sister-chromatid exchange in neurofibromatosis: no evidence of chromosomal hypersensitivity." *Mutat Res* 283(4): 237-42.

Woods, W. G., B. McKenzie, et al. (1986). "Sensitivity of cultured skin fibroblasts from patients with neurofibromatosis to DNA-damaging agents." *Ann N Y Acad Sci* 486: 336-48.

Zhu, Y. and L. F. Parada (2002). "The molecular and genetic basis of neurological tumours." *Nat Rev Cancer* 2(8): 616-26.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: Subcellular localisation of neurofibromin. Anti-*NF1* immunofluorescence was applied to the control 1BR3 fibroblasts (A) or to the *ATM*- and *NBS1*-mutated (B) human fibroblasts at the indicated X-rays or UVC treatments.

Figure 2: DSB repair and micronuclei. A. *NF1* and 1BR3 fibroblasts were exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The number of pH2AX foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. B. Percentage of pH2AX foci remaining at 24 h. Stars indicate that *NF1* fibroblasts show significantly higher percentages of pH2AX foci remaining than 1BR3 controls. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. Lower panel shows representative pH2AX- and DAPI-stained nuclei after the same treatments. C. Correlation between the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the corresponding percentage of pH2AX foci remaining. D. Percentage of cells showing micronuclei after 2 Gy following by 24 h for repair. Each plot represents the mean \pm standard error of at least two replicates.

Figure 3: ATM activity in *NF1* fibroblasts. A Anti-pATM immunofluorescence was applied to the *NF1* fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. B. Representative examples of pATM- and DAPI-stained nuclei after the same treatment.

Figure 4: DNA-PK activity in *NF1* fibroblasts. A Anti-pDNA-PK immunofluorescence was applied to the *NF1* fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates.

Figure 5: MRE11 activity in *NF1* fibroblasts. A. Anti-MRE11 immunofluorescence was applied to the *NF1* fibroblasts after 2 Gy following by the indicated times. The number of pH2AX foci was plotted against repair times either as data plots or histogram. B. Representative examples of MRE11- and DAPI-stained nuclei after the same treatment.

Table 1: Characteristics of cell lines used in this study.

Name	Space	Morphology	Gene mutation	Tissue
1BR3	Human	Fibroblasts	Control	Skin
NF1a (GM01633)	Human	Fibroblasts	NF1 -/+, unknown position	Skin
NF1b (GM01858)	Human	Fibroblasts	NF1 -/+, unknown position	Skin glioma
NF1c (GM01859)	Human	Fibroblasts	NF1 -/+, unknown position	Skin « café-au-lait »
NBS1 (GM07166)	Human	Fibroblasts	NBS1 -/-, (657del5)	Skin
AT1BR	Human	Fibroblasts	ATM -/-(5762ins137)	Skin
CHO-K1	Hamster	Epithelium	Control	Ovary
CHO-Xrs6	Hamster	Epithelium	DNA-PK	Ovary

Table 2: Previous studies of radiation effects, chromosomal aberrations in NF1 cell lines.

NF1 cell line used (number)	Results	Genotoxic treatments	Method used	Reference
Skin fibroblasts (5)	No mutagen hypersensitivity	UV, X-rays, alkylating agents	Colony formation	(Schwenn, Weichselbaum et al. 1985)
Blood lymphocytes (6)	Significant chromosomal instability	X-rays	Cytogenetics	(Hafez, Sharaf et al. 1985)
Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas (10)	No radiosensitivity	X-rays	Colony formation	(Mao, Krone et al. 1985)
Skin fibroblasts	Enhanced radiotolerance of neurofibroma and “café-au-lait” fibroblasts Normal tolerance of skin fibroblasts	X-rays	Colony formation	(Kopelovich and Rich 1986)
Skin fibroblasts		X-rays, alkylating agents	Colony formation	(Woods, McKenzie et al. 1986)
Blood lymphocytes (8)	Significant chromosomal instability	X-rays	Cytogenetics	(Hafez, Abd el-Nabi et al. 1986)
Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas and “café-au-lait” fibroblasts	No radiosensitivity after acute irradiation but increased radiosensitivity after chronic irradiation	X-rays	Colony formation	(Hannan, Smith et al. 1990)
Skin fibroblasts Blood lymphocytes Lymphoblastoid lines Skin fibroblasts	Spontaneous and induced chromosomal instability	X-rays, alkylating agents	Cytogenetics	(Troilo, Strong et al. 1992)
Fibroblast-like cells derived from peripheral neurofibromas and “café-au-lait” (9)	Increased radiosensitivity after chronic irradiation	X-rays chronic exposure	Colony formation	(Hannan, Sackey et al. 1993)
Blood leukocytes (8)	No radiosensitivity but compromised apoptotic T-cell response to X-rays	X-rays	Leukocyte apoptosis assay	(Crompton, Shi et al. 2001)

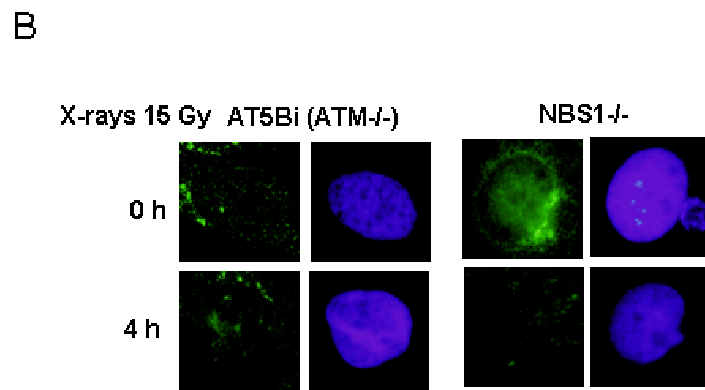
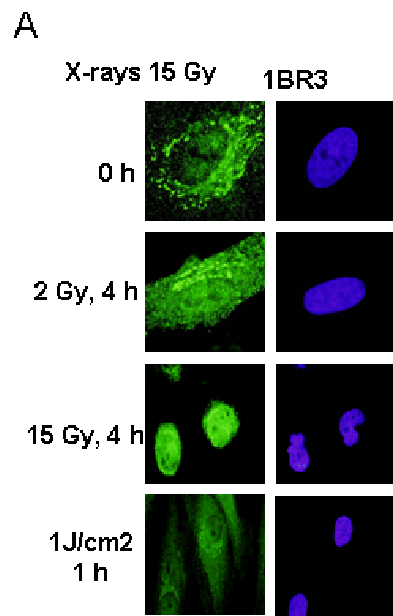


Figure 1

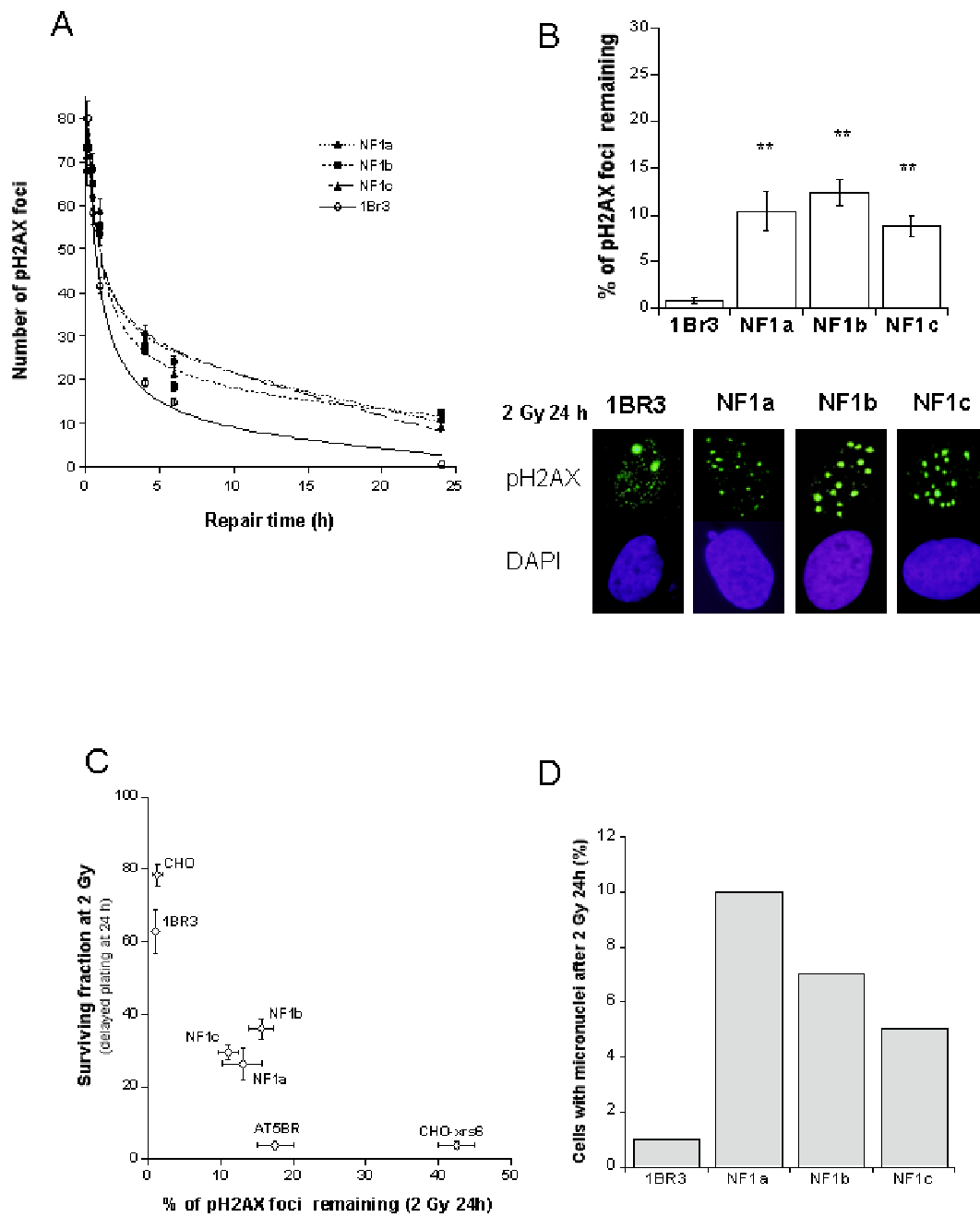


Figure 2

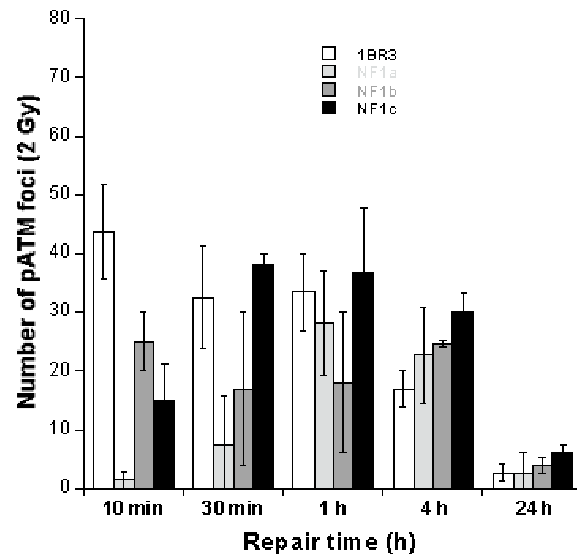
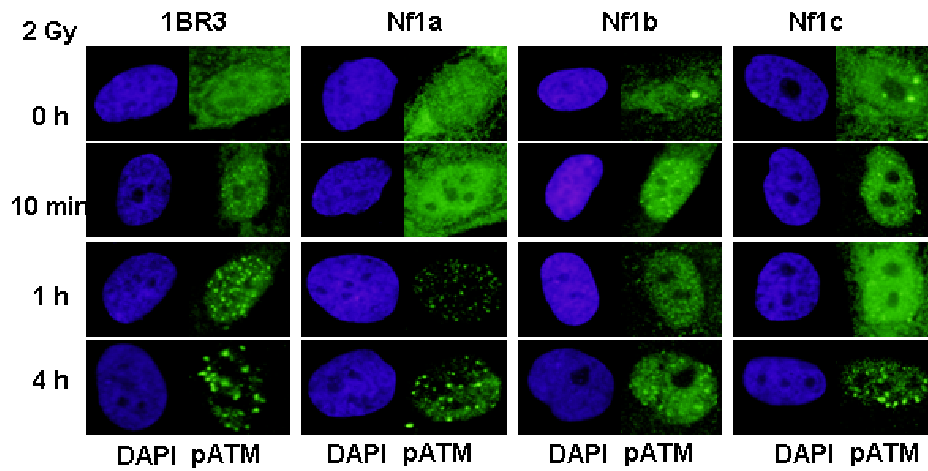
A**B**

Figure 3

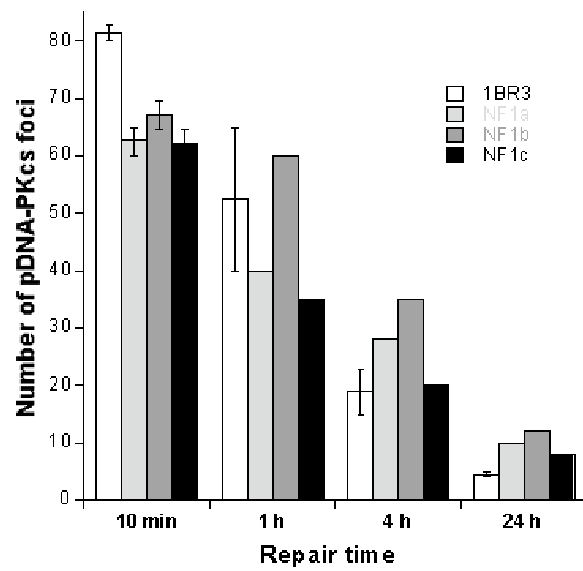


Figure 4

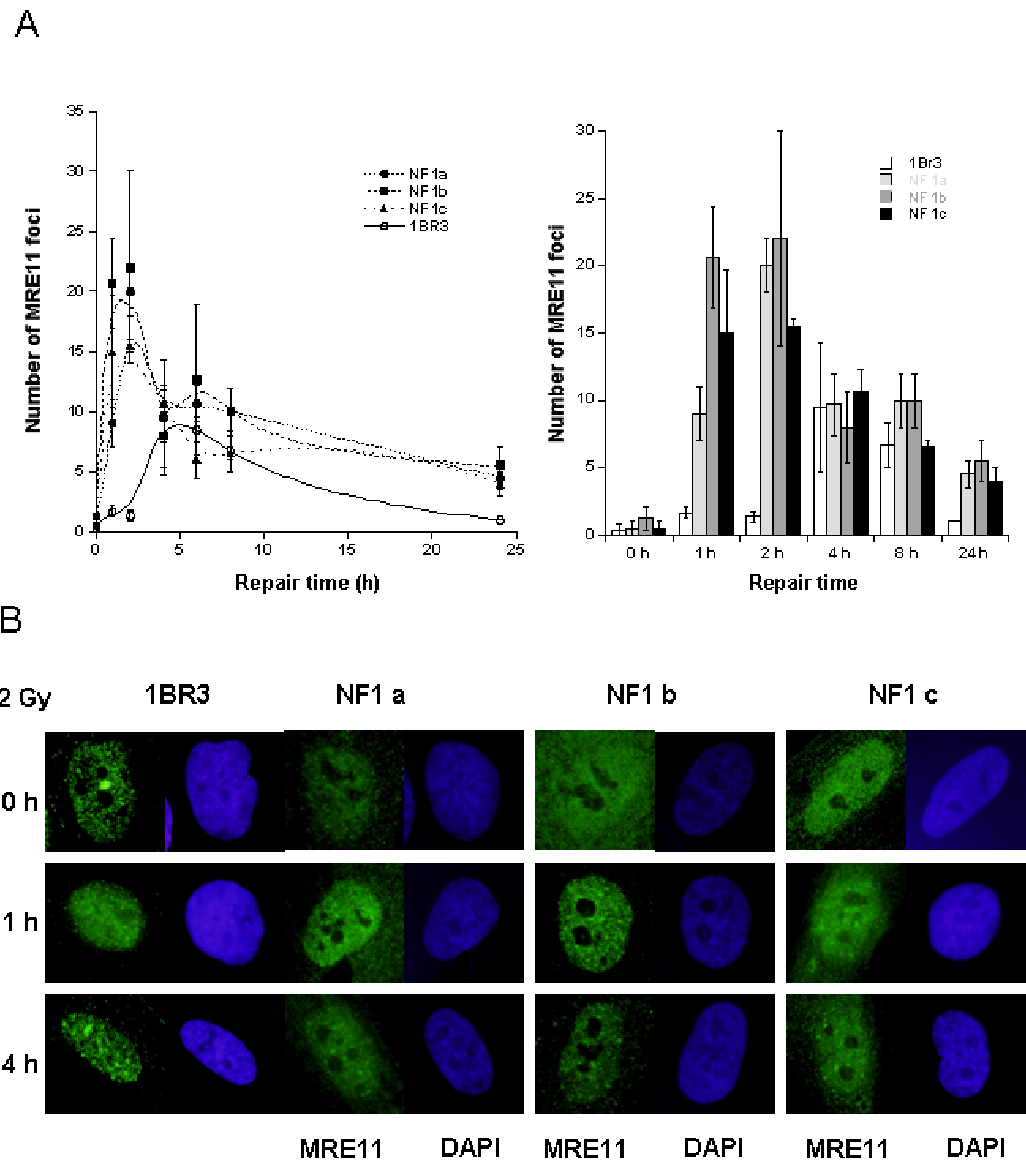


Figure 5

Review I

**Radiobiological features
of the anti-cancer strategies involving synchrotron X-rays**

Zuzana Bencokova, Jacques Balosso and Nicolas Foray

En révision depuis mai 2007

Radiobiological features of the anti-cancer strategies involving synchrotron X-rays

Zuzana Bencokova¹, Jacques Balosso^{1,2} and Nicolas Foray^{1*}

¹*INSERM, U647 – ID17 – European Synchrotron Research Facility, 38043 Grenoble, France;*

²*Département de Cancérologie et d'Hématologie, CHU Michallon, Grenoble - France.*

Keywords: synchrotron, DNA repair, CT therapy, PAT, MRT

Running phrase: anti-cancer strategies using synchrotron X-rays

Pages: 35 including

Figures: 1

Tables: 2

*Correspondence to:

Dr. N. Foray

INSERM, U647 – ID17 – European Synchrotron Research Facility – Rue Horowitz – 38043
Grenoble, France.

Tel: (33) 4 76 88 25 41; Fax: (33) 4 76 88 28 85; E-mail: foray@esrf.fr

Abstract.

Synchrotrons are opening a new path in innovative anti-cancer radiotherapy strategies. Indeed, fluence of X-rays induced by synchrotrons is so high (10^6 times higher than standard medical irradiators) that it enables the production of powerful X-ray beams tunable in energy (*monochromatic* beams) and in size (*micrometric* beams). *Monochromatic* synchrotron X-rays beams theoretically permit to *photoactivate* high-Z elements introduced in or close to tumours in order to increase the yield of damage by enhanced energy photoabsorption. This is notably the case of attempts with iodinated contrast agents used in tumour imaging (the CT therapy approach) and with platinated agents used in chemotherapy (the PAT-Plat approach). *Micrometric* synchrotron X-rays beams theoretically permit to accumulate very high radiations dose into tumours by using arrays of parallel microplanar beams that would spare surrounding tissues (the MRT approach). All these anti-cancer applications of synchrotron radiation are presently developed at the European Synchrotron Radiation Facility to be applied to glioma, one of the tumour tissues most refractory to standard treatments. In the present paper we reviewed the molecular and cellular mechanisms involved in these three approaches, in the context of recent advances in radiobiology. Furthermore, by considering the unavoidable biases, we attempt to propose a comparison of the different results obtained in preclinical trials dealing with rats bearing tumours.

1. Introduction

To date the great majority of tumours are treated by surgery and/or by treatments combining chemotherapy and radiotherapy. With regard to radiotherapy, standard medical irradiators generally provide high-energy photons that are facilitating the treatment of deep-seated tumours due to their high penetration in matter. However, high-energy photons do not necessarily produce optimal biological effects and their development has not fully eliminated the crucial problem of deleterious effects in surrounding normal tissues.

Recently, synchrotrons have opened a new path in innovative radiotherapy strategies. Indeed, the fluence of X-rays induced by synchrotrons is so high (10^6 times higher than standard medical irradiators) that it enables the production of powerful X-ray beams tunable in energy (*monochromatic* beams) and in size (*micrometric* beams). Since the 1990's, a considerable amount of data have been accumulated in the field of the medical applications of synchrotron radiation, notably to treat gliomas. In parallel, since radiation and drugs *per se* are often efficient enough to kill tumour, the general recent tendency in the development of new anti-cancer strategies is to secure their clinical transfer by a better knowledge of the molecular, cellular and tissular mechanisms that they specifically induce in normal tissues. Hence, throughout this review, we endeavoured to understand, evaluate and compare the radiobiological features of the anti-cancer treatments involving synchrotron radiation.

1.1 Interest of monochromatic and micrometric synchrotron X-rays

Monochromatic synchrotron X-rays beams theoretically permit the enhancement of photoelectric, Compton and/or Auger effects in high-Z elements that are contained in drugs injected during irradiation. This so-called *photoactivation* of high-Z elements aims therefore to increase the yield of damage by enhancing energy absorption (Corde *et al.*, 2003, Biston *et al.*, 2004, Adam *et al.*, 2003). The X-rays energies of photoactivation that have been used generally correspond to either the absorption edge (K-edge or L) or to maximizing the relative X-rays absorption of the high-Z element in water. Two variant photoactivation therapies are developed, differing by the photoactivable drugs that are used:

- most of imaging contrast agents that are employed in standard radiodiagnostic (CT imaging, urography, angiography, etc...) contain iodine atoms. By irradiating iodine-loaded tumours at the appropriate energy, an enhanced energy absorption may contribute to increase the therapeutic index. This approach was initially called CT therapy and performed with polychromatic irradiation (Norman *et al.*, 1978). It has been pursued with monochromatic synchrotron radiation (Adam *et al.*, 2003, Adam *et al.*, 2006). More recently, the possibility to photoactivate contrast agents containing gadolinium atoms used in nuclear magnetic resonance imaging has been investigated (De Stasio *et al.*, 2006);

- some chemotherapeutic drugs that are used extensively in standard cancer treatments contain high-Z elements. This is notably the case of platinated agents such as cisplatin and carboplatin (Cepeda *et al.*, 2007). By irradiating platinum-loaded tumours at the appropriate energy, an enhanced energy absorption is therefore expected to be added to the effect of the chemotherapeutic drug alone (Corde *et al.*, 2003, Biston *et al.*, 2004);

Micrometric synchrotron X-rays beams theoretically permit the accumulation of very high radiation doses into tumours in a single fraction by using arrays of microplanar beams of X-rays) (Laissue *et al.*, 1998, Dilmanian *et al.*, 2005). This technique has been called the microbeam radiation therapy (MRT). The advantages described of microbeams are their sparing effect on normal tissues and their preferential damage to tumours, even when

administrated in single direction (Dilmanian *et al.*, 2005). The MRT approach is also based on the assumption that microscopic thin planar slices of synchrotron-generated X-rays permit the rapid regeneration of normal microvessels. Conversely, the accumulation of dose due to the overlap of microbeams was hypothesized to prevent the recovery of tumour vasculature (Dilmanian *et al.*, 2006, Miura *et al.*, 2006, Smilowitz *et al.*, 2006).

1.2 Recent advances in radiobiology

In parallel to these recent developments, our understanding in biological effects of ionising radiation has considerably progressed these last years, notably in the fields of DNA damage repair and stress signalling (Khanna & Jackson, 2001, Rothkamm & Lobrich, 2003, Joubert & Foray, 2006). Particularly, four major features of radiobiology are revolutionizing the evaluation of anti-cancer approaches and must be therefore taken into account for the medical applications of synchrotron radiation:

- after an irradiation of living matter, physical, chemical, biochemical and biological events are intimately mixed in a complex cascade of events. Hence, clinical response is the integrated result of molecular, cellular and tissular events whose time scale of occurrence is clearly different. On one hand, theoretical simulations of the radiation dose distribution are useful for predicting the amount of DNA damage *induced* in the first seconds of an irradiation. Conversely, these simulations of physico-chemical events are obviously unable to predict the kinetics of DNA damage repair that occurs in the first hours of irradiation and that is correlated to survival. On another hand, preclinical trials with animal models, taken separately are also insufficient to provide mechanistic insights in early events. Hence, the evaluation of an anti-cancer approach requires not only quantitative data about its therapeutic efficacy against tumours but also a better knowledge of all the molecular, cellular and tissular events that it generates (Joubert & Foray, 2006).

- most of the anti-cancer strategies are based on the concept of depositing dose more efficiently into tumours. However, to date, there is evidence that the number of *induced* DNA damage is not predictive of the radiocurability of tumours. Conversely, the number of *unrepaired* DNA damage appears to be a more relevant parameter to predict tumour killing (Steel, 2002). Furthermore, some tumours possess impressive capacity for repairing DNA and patients may succumb to dose-dependent side-effects before tumour growing is influenced by the treatment (Chavaudra *et al.*, 2004, Joubert & Foray, 2006). Hence, to date, any anti-cancer approach should be evaluated more preferentially by the prediction of its effects on normal tissues rather than its efficacy in killing tumours.

- this last point is of importance since the absorbed radiation dose appears to date to be a notion insufficient to describe the effects of radiation at the molecular level. Indeed, it must be stressed that the absorbed radiation dose was historically defined as a macroscopic value (1 J per kg) and is not relevant for describing the distribution of energy microdepositions in cell nuclei (Goodhead *et al.*, 1981). Furthermore, new advances in bystander and delayed radiation-induced effects show that these effects contribute to the formation of DNA damage that are not considered by the radiation dose defined in Gy (Mothersill & Seymour, 2004).

- ionising radiation and chemotherapy drugs induce a large spectrum of DNA damage differing by their biochemical type, their induction rate, and the way by which they are repaired. Radiotherapy produces notably DNA double-strand breaks that are generally repaired by a so-called *non-homologous end-joining* (NHEJ) process that roughly consists in ligating broken DNA ends (Jeggo & Lobrich, 2006). Chemotherapy-induced DNA damage are not necessarily DNA breaks but more frequently DNA crosslinks that activate repair pathways consisting in excising such DNA damage and replacing the missing DNA strand

through a complex cascade of events with strand exchange and polymerisation (Dudas & Chovanec, 2004). The interplay of the different DNA repair pathways occurring when radiotherapy and chemotherapy are concomitant can generate antagonistic or synergistic effects on DNA damage induction and repair (Turchi *et al.*, 1997). Furthermore, combined treatments increase the impact of the genetic status of the patients that may influence their clinical response to radiotherapy and to chemotherapy (Joubert & Foray, 2006). Hence, genetic status of patients and that of their tumours need to be taken into account in asserting their response to radio-chemotherapy to not only enhance therapeutic effect against the tumour but also to prevent acute reactions in normal tissues.

It appears therefore crucial to consider to date the potential impact of innovative anti-cancer approaches, whether involving synchrotron X-rays or not, throughout an integrative and transversal approach of physical, biochemical and biological analysis to better take into account individual specificities. In the next chapters, we have reviewed the three major anti-cancer strategies involving synchrotron X-rays by considering their specific radiobiological features and the biological assumptions on which they are based.

2. Applications of monochromatic synchrotron X-rays

2.1. Use of contrast agents : the CT therapy

Main principles and first results

When tumour imaging is performed by using X-ray Computed Tomography (CT) scanners, iodinated contrast agents (ICAs) are injected into blood before and/or during the radiodiagnostic sessions in order to visualize the tumour through the enhanced X-rays photoabsorption of iodine. Historically, the first medical application of photoactivation can be legitimately attributed to the Norman's group. In the 1970s, Norman and colleagues observed chromosomal aberrations and micronuclei in circulating lymphocytes of 9 patients submitted to urography and cardiac angiography involving ICAs (Adams *et al.*, 1977), (Norman *et al.*, 1978). In these radiodiagnostic sessions, a dose of 2 cGy was delivered by a standard polychromatic X-rays tube (65-75 kVp, 1.3 mA). These cytogenetic findings were found similar to those assessed *in vitro* without ICAs at 20 and 30 cGy. Norman *et al.*, hypothesised therefore that such aberrations resulted from a *local excess of radiation dose*, attributed to an enhanced photoelectric effect due to the energy absorption by iodine atoms contained in ICAs. Their conclusions were confirmed with a *meta-analysis of 10 clinical* studies using ICAs during angiography or excretory urography (Norman *et al.*, 2001). Norman and colleagues proposed to « exploit » these chromosome damaging effects by applying them to brain tumours while :

- loading tumour with ICAs by intravenous injection
- imaging tumour with a modified X-rays CT system (tomographic mode; 360° with three non coplanar axes) and computing tumour position;
- treating tumour with the same irradiation set up by using the computed attenuation data obtained during imaging and by photoactivating ICAs accumulated in the tumour vasculature.

Hence, the CT therapy approach combined optimised tumour targeting (stereotaxic tomographic irradiation) and differential biological effect due to the photoactivation of ICAs present in tumour during irradiation. X-rays used in CT therapy were initially those used in radiodiagnostic (i.e. high voltage lower than 150 kV, corresponding to a mean energy of roughly 100 keV). This technique presented the considerable advantage of reducing patient displacement during treatment (Table 1). Although such strategy did not overcome the problem of chromosomal aberrations in normal tissues (observations on which this technique was based), it was applied to animals with a limited success (Iwamoto *et al.*, 1993, Santos Mello *et al.*, 1983, Iwamoto *et al.*, 1987, Norman *et al.*, 1997) and to humans in a unique clinical trial combined with standard radiotherapy sessions (Rose *et al.*, 1999). To our knowledge, since 1990, no other clinical trial has been performed with this approach.

Subsequently, new preclinical trials were performed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) by applying monochromatic X-rays to brain tumours of rats that were injected with ICAs either intravenously or via the carotid (Adam *et al.*, 2006). It is noteworthy that ICAs were injected concomitantly with an infusion of hyperosmotic blood-brain barrier opener, the mannitol, which did not make easy the evaluation of the effect of ICA alone. Three X-ray doses (5, 15, 25 Gy), and two iodine injection modalities were tested. The maximal median survival time obtained with iodine was 71 days (15 Gy; intracarotid injection) while the rats subjected to 25 Gy without iodine showed a median survival time of 145 days (Adam *et al.*, 2006).

Radiobiological analysis

In the synchrotron experiments, the X-rays energy used was 50 keV corresponding to the maximal relative X-rays absorption of an iodine solution in water whereas the K-edge of iodine is 33.17 keV, which corresponds to the local maximum photoelectric cross-section. The choice of the energy of 50 keV was justified by the authors by the evaluation of clonogenic survival after irradiating cells at different X-rays energies in presence of ICAs (Corde *et al.*, 2004) . In the context of theoretical studies of CT therapy, Monte-Carlo simulations confirmed also that an excess of dose should be actually delivered into tumour, suggesting an enhancement of the therapeutic index with CT therapy (Boudou *et al.*, 2005). Further, the use of other iodinated compounds (*e.g.* iododeoxyuridine (IudR)) may be used in the frame of CT therapy., iodides, ...) (Fairchild *et al.*, 1982). However, intrinsic biological effects of ICAs, IudR and iodides are very different and raise two questions :

- how to predict with intrinsic biological effects of photoactivable molecules that contain a given high-Z element?
- what level of description should be needed in a simulation code to predict capabilities for synergistic effects?

ICAs are complex molecules that do not enter into cells and remain bound to the external cell membrane. Conversely, IudR, a base analog molecule or iodides like NaI or KI are able to cross cell membrane and target DNA (Joubert *et al.*, 2005). Some ¹²⁵I iodide forms or IudR molecules are commonly used in targeted therapy based on internal contamination. Conversely, therapeutic use of ICAs is limited (Fairchild, 1987, Mitchell *et al.*, 1989, Laster *et al.*, 1993, Kassis & Adelstein, 1996). To investigate further the relative failure of CT therapy, investigations were performed *in vitro*, notably in the DNA damage repair field. Irradiation of cells at 50 keV in presence of ICAs do not produce any significant excess of the number of DNA damage as it would be expected if an excess of dose was delivered in the tumour (Joubert *et al.*, 2005). However, the toxicity (unrepaired breaks, micronuclei) observed into treated cells suggested an impact upon DNA repair pathways. Interestingly, irradiation of ICAs at 50 keV triggers the optimized radiolysis of ICAs molecules and results in their chemical decomposition by liberating iodide ions. Iodide ions are able to cross membranes and to bind to DNA. Once onto DNA, iodides are capable of inhibiting DNA repair processes by a steric prevention of accessibility of repair proteins (Joubert *et al.*, 2005). Hence, the irradiation of cells in the presence of ICAs may result in an inhibition of DNA repair due to the extracellular liberation of iodides ions rather than an extra-production of DNA damage. Unfortunately, photactivation-induced iodides may diffuse through vasculature into normal tissues and prevent also DNA repair of normal cells that were irradiated during treatment (Joubert *et al.*, 2005). The cellular consequences of such treatment are logically micronuclei and apoptotic bodies that contribute to increase toxicity through *the production of chromosomal aberrations in surrounding normal tissues* (Joubert *et al.*, 2005). Hence, this molecular model may provide a relevant explanation of the previous findings of Norman's group described above and the relative failure of the monochromatic CT therapy in increasing more significantly the survival of rats bearing tumours than X-rays treatment alone (Adam *et al.*, 2003, Adam *et al.*, 2006). Hence, a particular care must be taken in the application of techniques based on the presence of chromosomal aberrations *already* observed in surrounding normal tissues. A strict evaluation of the toxicity eventually induced in normal tissues is therefore required *before* considering the efficiency of the treatment to the tumour. Lastly, further investigations in the early events occurring after a photoactivation therapy is also needed to better justify the choice of the X-rays energy applied. Additional CT therapy experiments may be therefore useful to better understand the basic mechanisms of X-rays photoactivation

2.2. The photoactivation of platinated agents (PAT-Plat)

Main principles and first results

CT therapy opened the wide field of photoactivation of other pharmacological compounds containing high-Z elements. Platinum-containing drugs like cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, appeared early to be the best candidates for anti-cancer strategies involving photoactivation (PAT) since they are already extensively used in various chemotherapy and chemo-radiotherapy treatments. Such drugs bind to DNA by forming DNA adducts and target preferentially proliferating cells in S-G2/M phases, and therefore preferentially tumours (Cepeda *et al.*, 2007, Rabik & Dolan, 2007). These drugs contain platinum atoms that are theoretically photoactivable at 78.4 keV, corresponding to the K-edge of platinum. PAT of cisplatin (PAT-Plat) has been particularly developed at ESRF. Recently, PAT-Plat provided by synchrotron X-rays was applied to rats bearing radioresistant gliomas. After a cisplatin intratumoral injection, 15 Gy X-rays were delivered by synchrotron radiation into tumour just above the Pt K-Edge (78.8 keV). This treatment resulted in the cure of 33% rats and provides still to date the most protracted survival of rats bearing F98 glioma models (Biston *et al.*, 2004). More recently, the use of carboplatin, a platinated compound less neurotoxic than cisplatin permitted to increase rat survival up to 44% (Biston *et al.*, submitted).

Radiobiological analysis

Molecular and cellular mechanisms involved in PAT-Plat are now identified (Corde *et al.*, 2003, Biston *et al.*, 2004). Radio-chemotherapy with cisplatin is a representative example of the interplay between different repair pathways evoked in Introduction (Table 1). Indeed, DSBs produced by X-rays are generally repaired by NHEJ process that is initiated by the translocation of a protein called Ku up to the site of the breaks. Cisplatin molecules preferentially target DNA of proliferating cells and DNA adducts that are generally repaired by a recombination-like repair process. However, presence of cisplatin onto DNA prevents the Ku translocation and significantly inhibits NHEJ. Consequently, association between ionising radiation and cisplatin results in irreparable DSBs, as far as concentration of DNA adducts is sufficient, and as far as radiation and cisplatin are used concomitantly (Corde *et al.*, 2003). Interestingly, in the particular case of PAT-Plat, the photoactivation of platinum atoms of cisplatin molecules bound to DNA consists in the production of additional DSBs whose repair is naturally inhibited since they are produced at the close vicinity of DNA-adducts that block NHEJ. As a result, the excess of irreparable DSBs contributes to increase the therapeutic index of targeted tumours. Unlike CT therapy with ICAs, since platinated agents binds preferentially DNA of proliferating tumours, effects to surrounding tissues are expected to be limited (Corde *et al.*, 2003, Biston *et al.*, 2004).

However, extensive *in vitro* and *in vivo* experiments are still necessary to propose a molecular model of the mechanisms involved in the PAT-Plat approach in order to secure its clinical transfer. Although the PAT-Plat data are encouraging, a number of important questions has to be asked, notably the choice of the energy, the molecular specificities of the technique and the appropriateness of platinated agents in anti-glioma treatments.

- *Choice of photoactivation energy.* PAT-Plat experiments were performed at the platinum K-edge and not at the energy corresponding to the maximal relative X-rays energy absorption of platinum atoms in water (50 keV). *In vitro* experiment in PAT-Plat conditions confirmed that the maximal production of DSBs is observed at the K-edge and not at 50 keV. A possible explanation is that K-edge energy is the optimized energy of photoactivation when the photoactivable agent is localized inside cell nuclei. Conversely, the maximal relative X-

rays energy absorption of the high-Z element in water would be the optimized energy of photoactivation when the photoactivable agent is surrounding by water outside the cell. Further radiochemical investigations are obviously required to consolidate such hypothesis and would be useful for a general understanding of the biological effects of photoactivation.

- *Molecular specificities of the PAT-Plat technique.* As mentioned above, the NHEJ pathway, the major DSB repair in mammals, is sterically inhibited by the presence of cisplatin. However, recombination pathways can compensate the NHEJ impairment. Particularly, when some proteins essential for recombination, such like BRCA1 or BRCA2 are functional, tumours may be resistant to PAT-Plat (Zhang & Powell, 2005). A careful consideration of genetic status of tumour is therefore needed.

- *Appropriateness of platinated agents.* Anti-glioma treatments with adjuvant cisplatin injection are still to date a failure (Behin *et al.*, 2003). However, it must be stressed that most of cisplatin-radiation combinations were performed with *intravenous* cisplatin administration whereas cisplatin was reported to be more efficient when injected *locally* (Sheleg *et al.*, 2002, Fehlauer *et al.*, 2005, Biston *et al.*, 2004). Our conclusions encourage therefore the development of PAT-Plat with *intracranial* injection of platinated agent (Sheleg *et al.*, 2002, Fehlauer *et al.*, 2005).

3. Applications of micrometric synchrotron X-rays : the MRT approach

Main principles and first results

In the two above sections, CT therapy and PAT-Plat approaches were presented as direct applications of *monochromatic* synchrotron X-rays. As evoked in the Introduction, high fluence of synchrotron makes also possible the production of *polychromatic micrometric* beams allowing a very precise tumour targeting with an extremely high dose rate : the grid radiotherapy (Slatkin *et al.*, 1992, Laissue *et al.*, 1998). The accumulation of interlaced micrometric X-rays beams during a single session enables the deliverance of very high radiation doses up to thousands of Grays in a few milliseconds. The grid radiotherapy and its application to brain tumours are mainly based on three observations or postulates:

- threshold doses for complications of radiotherapy increase as irradiated volume of tissue are made smaller (Withers *et al.*, 1988).
- normal rat brain tissue display an unusual radioresistance and permit therefore the application of very high doses into the tumour (Dilmanian *et al.*, 2006).
- an excess of dose into the tumour should result in destroying tumour vasculature while lower doses in surrounding tissues should insure a significant repopulation of normal cells (Laissue *et al.*, 1998, Dilmanian *et al.*, 2002, Dilmanian *et al.*, 2006, Smilowitz *et al.*, 2006).

The physical properties of X-rays synchrotron permitted the feasibility of the microbeam radiation therapy (MRT) by providing arrays of parallel thin planar microslices. Furthermore, the use of soft X-rays (in the tens to hundreds of keV range) enables higher energy absorption in the tissues. Among the medical application of synchrotron radiation presented here, MRT studies represent the largest amount of data. The MRT technique was initiated at the National Synchrotron Light Source (NSLS) at the Brookhaven National Laboratory (Slatkin *et al.*, 1992, Slatkin *et al.*, 1995) and was applied essentially to rat brains (Slatkin *et al.*, 1995; Laissue *et al.*, 1998; Dilmanian *et al.*, 2002), mice (Miura *et al.*, 2006) but also of duck embryos (Dilmanian *et al.*, 2001) and piglets (Laissue *et al.*, 2001). MRT irradiation sessions are generally based on a single fraction of radiation dose delivered either unidirectionally or bidirectionally (co- or cross-planar). The total dose (120-1335 Gy) and the geometry parameters differ depending on the experiments and the research groups. The width of the beam varies between 25-90 μm and the space between each beam varies between 50-300 μm .

Two complementary approaches can be considered in the published papers about MRT : those that deal with the regeneration of microvessels after MRT sessions and those that deal with the survival of MRT-treated animals.

With regard to physiological studies of MRT, a dose of thousands Grays leads undoubtedly to the loss of neuronal and astrocytic cell nuclei inside the *peak* tracks. Physiopathology and histology observations indicate that rat skin can tolerate 23-fold higher dose delivered in MRT sessions than in broad beams (Zhong *et al.*, 2003). For duck embryos, 160 Gy MRT appeared to be equivalent to 18-Gy broad beam (Dilmanian *et al.*, 2001). These conclusions were essentially reached at the tissue scale and no molecular and stress signaling data about MRT effects are still available. However, a more recent report aimed to investigate the early effects of 312 or 1000 Gy MRT upon the integrity of the normal microvasculature in mice. Interestingly, intravital dyes remained in the vessels after irradiation from 12 h until 3 months following 1000 Gy and no extravascular diffusion was observed (Serduc *et al.*, 2006). This radioresistance phenomenon was not observed in 9L glioma microvessels, consolidating therefore the differential effect expected between normal and tumour brain tissues in rodents (Dilmanian *et al.*, 2003). A number of questions remain however unsolved, notably with regard to the death pathways that MRT would specifically induce in glial tissue and/or in vasculature. The use of innovative technologies such like two-photon microscopy will undoubtedly help in progressing (Serduc *et al.*, 2006).

With regard to survival of animals treated to MRT, the great majority of authors has used 9L glioma as a model, probably for practical reasons (high proliferation rate, availability of the cell line the lab, etc...). The highest MeST values provided to date by MRT is 171 days for rats (Smilowitz *et al.*, 2006) and about 40 days for mice (Miura *et al.*, 2006). Recently, Dilmanian *et al.* summarized the requirement of the geometry MRT parameters : 1) *for a given dose the beam thickness should not exceed a certain width*; 2) *for a given thickness the valley dose should be minimized*; 3) *the peak dose should be lower than the dose that kills neurons in the direct path of microbeam* (Dilmanian *et al.*, 2006). Survival data will be reviewed in the next chapter.

Radiobiological features.

From theoretical simulations, it appears that dose delivered in the *valleys* may represent 1-10 % of the dose (Dilmanian *et al.*, 2006, Siegbahn *et al.*, 2006). For 1000 Gy delivered into the *peak*, this data suggests that a minimum of 10 Gy may be delivered in tissues between two peaks and at the close vicinity of the tumour. MRT has been essentially applied to rat 9L glioma and modeled from rodent observations. Rodents are generally much more radioresistant than human cells (Bencokova *et al.*, 2007). The 9L model is one amongst the most radioresistant rodent cell line and its clonogenic survival following X-rays exposure is at the upper limit of radioresistance observed in human cells (Bencokova *et al.*, 2007). As an example, about 0.1-1% cell survival is expected after 10 Gy X-rays (200kV) whereas surviving population is negligible for human radioresistant cells after the same dose. Further, cellular repopulation is not observed after 6 Gy even for the most radioresistant human tumour cells whereas cell cycle is not totally arrested with 9L (Bencokova *et al.*, 2007). Hence, if the dose delivered in the *valley* may have reduced impact in rodents, its biological effects are expected to be far from negligible in humans.

Another radiobiological feature must be also considered for MRT : what may happen in surrounding normal human tissues after the deliverance of such high radiation doses? In the past 50 years, a considerable amount of data has suggested the existence of significant biological effects in cells that are not directly hit by radiation tracks. Even if these effects do not necessarily proceed from a single cause and despite the fact that their molecular bases remain to be elucidated, radiobiologists describe them under the general term of *radiation-*

induced bystander effects (RIBE) (Mothersill & Seymour, 2004, Mothersill & Seymour, 2004). The most relevant models of RIBEs mainly involve calcium ions. The cell can be considered as an electrostatic dipole. Ionising radiation lead to a depolarisation of the cell membrane and a brief release of calcium ions. Such potential oxidative stress can diffuse through liquid medium and concern cells that were not targeted initially by radiation (Ponnaiya *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2005). This phenomenon occurs also *in vivo* in tissues and is described as abscopal effects (Charles, 2001). RIBEs favour the extension of dose-effects to tissue up to tens micrometers *in vitro* and up to millimeters *in vivo* and corresponds to the equivalent of 10% of the initial dose (Mothersill & Seymour, 2004, Mothersill & Seymour, 2004). It is still too early to conclude that RIBEs may be a source of additional stress for normal tissues in MRT modality but preliminary reports indicate that significant RIBE effects (as DSB formation and micronuclei), are clearly observed in human fibroblasts after an MRT treatment (dose: 10 Gy; width 100 μm ; space between tracks : 500 μm). These findings suggest that RIBE effects after MRT may impact significantly upon human cell viability (Joubert *et al.*, submitted). Only one report dealing with MRT raises the problem of bystander effect (Dilmanian *et al.*, 2007). However, this study does not concern molecular and stress signaling analysis of RIBEs and authors interpretate the repopulation of mammalian cells surrounding those inside tracks as beneficial bystander effect throughout the effect of very low doses (Dilmanian *et al.*, 2007). No quantification of DNA damage in the bystander cells has been however performed. Further, the beneficial effect of very low doses is still a source of disagreements between authors (Krause *et al.*, 2005, Joiner *et al.*, 2001). Lastly, the impact of bystander effects is expected to diminish gradually as far as the distance from the targeted cells increases. Consequently, even if beneficial bystander effects may be observed in bystander cells far from the peak, the question of their toxicity in normal cells *at the close vicinity* of the targeted tumour tissue remains unsolved. Further biochemical investigations and data on human cells are needed to better understand the bystander effects potentially induced by microbeams.

4. How to evaluate anti-cancer strategies involving synchrotron X-rays and perform relevant comparisons?

4.1 Difficulties specific to gliomas

To date, nearly all the preclinical assays involving synchrotron X-rays have been performed on gliomas inoculated to rats. Indeed, it was natural that innovative anti-cancer strategies aims to target the most radioresistant tumour types. Deriving from glial, astrocyte, or dendrocyte cells, gliomas are the most frequent tumours of central nervous system. Unfortunately, most of gliomas are refractory to standard treatments (Behin *et al.*, 2003). The median survival for patients bearing grade IV gliomas (glioblastomas) does not exceed one year even after both aggressive surgery and radiotherapy treatment. Chemotherapy alone also leads to discouraging results. The median survival after radiotherapy associated with adjuvant chemotherapy does not exceed one year, as well. A standard of 60 Gy delivered in 30 fractions during six weeks remains the best modality against gliomas (Behin *et al.*, 2003). Finally, human glioma appear to be very heterogenous which makes very difficult the prediction of radiocurability from *in vitro* clonogenic survival data (Taghian *et al.*, 1993). Hence, care must be taken for the choice of cellular glioma models, whether from rodents or humans. A recent study showed that 9L, F98, and C6, three among the most extensively used rat glioma models elicit different molecular and cellular responses to radiation and cisplatin. Notably, some differences have been attributed to impairments of the BRCA1 protein : 9L appeared BRCA1-positive whereas F98 and C6 elicit a truncated or cytoplasmic form of BRCA1 respectively (Bencokova *et al.*, 2007). The genetic status of the p16 pathway,

downstream to BRCA1 function, has been shown to be different in these three models, as well (Schlegel *et al.*, 1999). In addition to these functional and genetic specificities, these three models elicit also different physiological characteristics such as shape, proliferation rate and immunogenic responses, raising the problem of the extrapolation of rodent models to human. Hence, like any other innovative anti-glioma approach, the molecular and cellular response to human glioma cell lines has to be documented to verify hypotheses established from rodent data.

4.2 Endpoints required for intercomparisons

In the framework of the considerable amount of data accumulated these past few years, it is therefore legitimate to ask whether the three medical applications of synchrotron X-rays described above are equally efficient against gliomas. An objective intercomparison of CT therapy, PAT-Plat and MRT requires the choice of relevant endpoints to allow *quantitative* comparisons. Among the plethora of data, the survival of rats bearing glioma appeared to be the best compromise since rats are the only animal model used in common to CT therapy PAT-Plat and MRT. Unfortunately, different cellular models of rat gliomas have been used. The choice of rodent glioma models is notably mainly motivated by the existence of previous data in the lab, their proliferation capacity in culture and/or in animals and their non-immunogenic properties, rather than specific molecular features or genetic status (Bencokova *et al.*, 2007). All the published MRT studies with rats dealt with the 9L model whereas CT therapy and PAT-Plat were applied to F98 (Table 2 and references herein).

With regard to the choice of endpoints, percentage of survival rats appears to be a natural parameter. However, the number of treated rats differs roughly from a report to another and should be also considered in intercomparisons. Further, the confidence zone of the survival time of untreated rats that may vary from an author to another should be also considered to better evaluate the excess of survival provided by the treatment. Lastly, the comparisons of the different rat survival curves of literature is made difficult by the unavoidably low number of replicates due to the availability of synchrotron beamlines. Hence, we endeavoured to use the median survival time (MeST), the number of rats, the percentage of rat surviving at 50, 100, 150 and 200 days post-treatment as endpoints to provide an objective quantification of survival data by taking into account the early and delayed effects due to each modality. As a first step, only the best quantitative results of preclinical assays with rats bearing gliomas treated to synchrotron radiation have been reviewed in CT therapy, PAT-plat and MRT (Table 2, Figure 1).

4.3 Analysis of survivals of rats treated to MRT

With regard to the MRT preclinical assays, a number of beamline parameters (dose, beam spacing, beam size, etc...) make difficult any comparisons. However, with the same 9L glioma model, it appears that it is not necessarily the highest radiation dose applied to the tumour volume that provides the most protracted rat life span (Table 2, Figure 1). In fact, the highest MeST was obtained with 250 Gy and 75 μm beam spacing whereas doses up to 625 Gy were already tested. Boron neutron capture therapy (BNCT), based on preferential energy absorption in bore by neutrons has been also applied to the 9L model. BNCT represents therefore a good reference for comparison, inasmuch as MeST value for untreated rats (22 days) obtained with this approach was found similar to those obtained with MRT. BNCT showed an impressive MeST of 250 days (the highest MeST obtained with 9L model)

whereas the highest MeST values provided to date by MRT is 171 days with 5 rats (Table 2, Figure 1).

4.4 Analysis of survivals of rats treated to CT therapy

Until recently, only two groups have developed the CT therapy with ICAs (Norman *et al.*, 1991, Adam *et al.*, 2006, Adam *et al.*, 2003). With regard to preclinical assays with rats, CT therapy was applied to F98 model only. Similarly to MRT, it is not necessarily the highest radiation dose applied to the tumour that provides the most protracted rat life span (Table 2, Figure 1). A representative example is given by Adam *et al.*, (2006) who showed that an exposure of 25 Gy alone is more efficient against tumours than when combining with ICAs. The most efficient treatment with ICAs appears to be 15 Gy with ICAs injected into carotid (Adam *et al.*, 2006). BNCT was also applied to the F98 model with a similar MeST of untreated rats (25 days). BNCT-treated rats bearing gliomas showed similar MeST than those treated to CT therapy with ICAs (71 versus 72 days) (Barth *et al.*, 2000), suggesting that either F98 is a model specifically refractory to these both modalities and/or that CT therapy with ICAs does not provide a significant improvement of rat life span (Table 2, Figure 1).

4.5 Analysis of survivals of rats treated to PAT-Plat

PAT-Plat strategy was also applied to the F98 model (Biston *et al.*, 2004, Biston *et al.*, 2007). With this model, the PAT-Plat approach provides much higher MeST values (up to 3 times higher) than CT therapy and BNCT together, with similar MeST obtained with untreated rats (Table 2, Figure 1) (Biston *et al.*, 2004). Differences in MeST may have been observed by replacing cisplatin by carboplatin (Biston *et al.*, 2007). Interestingly, unlike CT therapy with ICAs, PAT-Plat studies and MRT are the only medical applications of synchrotron X-rays that elicit non negligible percentages of rat surviving after 100 days post-treatment (Table 2, Figure 1).

5. Conclusions

Like any other innovative anti-cancer approaches, the medical applications of synchrotron reviewed here should reply to the following basic questions :

- How to evaluate, predict and prevent the side-effects specifically due to the innovating treatment?
- Can data obtained from animal models be legitimately extrapolated to human cells?
- How to provide quantificated proofs of the real benefit of a given approach compared to the existing modalities?

Furthermore, because of the physical properties specific to synchrotron X-rays, additional questions have to be asked . Notably, physical events of photoactivation are still undefined (photoelectric effect? Auger effect?, etc...) and their relative contribution to the final clinical outcome in the three medical application of synchrotron radiation remains undetermined. A better knowledge of the physical early events following an exposure to synchrotron X-rays would help in determining the optimized energy that provides maximal photoactivation and synergy. For example, such approach could be pursued by further *in vitro* investigations with iodine.

The PAT-Plat strategy is a representative example of innovating anti-cancer strategy that endeavours to associate benefit of both radiation and chemotherapy. However, such

association raises the problem of co-toxicities with concomitant induction of different DNA damage types that are repaired by different repair pathways. Hence, pharmacomodulation of DNA repair necessarily implicates a differential tumour targeting depending on genetic status. Platinated agents involved in PAT-Plat target DNA directly and inhibit DNA repair. This is not the case of ICAs that do not cross the cell membrane neither reach DNA. Considering the impact of DNA damage upon cell lethality, this would explain the relative failure of CT therapy and good results of PAT-Plat. (Joubert *et al.*, 2005). The PAT-Plat effect raises also the importance of genetic status that may condition the final clinical outcome of the patients. The use of different models, whether animals or cell lines would help in detailing the molecular specificities of each modalities.

MRT raises more likely the problem of RIBEs and response to surrounding tissues that may also condition the patient outcome. RIBEs will unavoidably represent a challenge in the future for a novel definition of the radiation dose. Radiation dose acceptable for rodents may, provide differential therapeutic benefit in humans. Furthermore, MRT, based on precise irradiation set-up (array of *micrometric* beams) must take into account the breathing movements of patients that may infer onto the target practically irradiated (Table 1). Hence, mainly based on rodent data, the MRT technique should be tested in human glioma models.

The increasing amount of data involving anti-cancer strategies using synchrotron radiation prompted us to evaluate their potential clinical transfer by considering carefully their radiobiological features. Obviously, an extreme care must be taken when considering intercomparisons of medical applications of synchrotron radiation (Table 1). In addition, the intercomparisons of rat survival data provided by the different modalities raises unavoidable questions with regard to the statistical analysis. In the 1980's, a similar problem occurred for the comparisons of *in vitro* clonogenic survival curves. The use of the only survival fraction at 2 Gy (SF2), useful for radiotherapists, to reflect all the curves was a subject of hard discussions between scientists. Fertil and Malaise proposed to consider not a survival data at a given dose but rather the surface under the curve that corresponds to the integral of the survival curve. Such a parameter was defined as the mean inactivation dose \bar{D} (dose giving 37% survival) and was shown to better reflect the survival curve than SF2 (Fertil *et al.*, 1984). Hence, we proposed therefore to compare rat survivals throughout their surface under the curve.

A number of other potentially photoactivable elements are actually at the origin of molecular and cellular *in vitro* studies. This is notably the case of gadolinium components (De Stasio *et al.*, 2006) that are extensively used in nuclear magnetic resonance imaging. Some preliminary studies are also foreseen with gold nanoparticles (Hainfeld *et al.*, 2004, Hainfeld *et al.*, 2006). Synchrotron radiation appears to be a key-tool for increasing the knowledge of radiation-induced phenomena and for developing innovative strategies against cancer. MRT and PAT-Plat approaches appear to be promising strategies against gliomas, notably because they show equivalent or better results than BNCT. However, a systematic screening of repair gene mutations of tumours and a transversal approach integrating molecular, cellular and tissular biological investigations are required to insure the most specific and appropriate anti-cancer treatment to each individual case. The use of synchrotron radiation combined with biologically personalised anti-cancer treatments will be undoubtedly one of the major challenges of the future.

Acknowledgements

We thank V. Favaudon, A.-M. Charvet for fruitful discussions. Z.B. is a PhD fellowship of Roche-France. This work was also supported by the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Ligue contre le Cancer (Comité de Savoie), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the TOXNUC and the ETOILE Project (Région Rhône-Alpes and Lyon University).

References

- Adam, J. F., Elleaume, H., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Balosso, J., Le Bas, J. F. & Esteve, F. (2003). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 1413-1426.
- Adam, J. F., Joubert, A., Biston, M. C., Charvet, A. M., Peoc'h, M., Le Bas, J. F., Balosso, J., Esteve, F. & Elleaume, H. (2006). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 603-611.
- Adams, F. H., Norman, A., Mello, R. S. & Bass, D. (1977). *Radiology* 124, 823-826.
- Barth, R. F., Yang, W., Rotaru, J. H., Moeschberger, M. L., Boesel, C. P., Soloway, A. H., Joel, D. D., Nawrocky, M. M., Ono, K. & Goodman, J. H. (2000). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47, 209-218.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F. & Delattre, J. Y. (2003). *Lancet* 361, 323-331.
- Bencokova, Z., Pauron, L., Devic, C., Joubert, A., Gastaldo, J., Massart, C., Balosso, J. & Foray, N. (2007). *Journal of Neuro-oncology* Accepted.
- Biston, M., Joubert, A., Elleaume, H., Charvet, A., Estève, F., Balosso, J. & Foray, N. (2007). Submitted.
- Biston, M. C., Joubert, A., Adam, J. F., Elleaume, H., Bohic, S., Charvet, A. M., Esteve, F., Foray, N. & Balosso, J. (2004). *Cancer Res* 64, 2317-2323.
- Boudou, C., Balosso, J., Esteve, F. & Elleaume, H. (2005). *Phys Med Biol* 50, 4841-4851.
- Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C. & Perez, J. M. (2007). *Anticancer Agents Med Chem* 7, 3-18.
- Charles, M. (2001). *J Radiol Prot* 21, 83-86.
- Chavaudra, N., Bourhis, J. & Foray, N. (2004). *Radiother Oncol* 73, 373-382.
- Coderre, J. A., Button, T. M., Micca, P. L., Fisher, C. D., Nawrocky, M. M. & Liu, H. B. (1994). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30, 643-652.
- Corde, S., Balosso, J., Elleaume, H., Renier, M., Joubert, A., Biston, M. C., Adam, J. F., Charvet, A. M., Brochard, T., Le Bas, J. F., Esteve, F. & Foray, N. (2003). *Cancer Res* 63, 3221-3227.
- Corde, S., Joubert, A., Adam, J. F., Charvet, A. M., Le Bas, J. F., Esteve, F., Elleaume, H. & Balosso, J. (2004). *Br J Cancer* 91, 544-551.
- De Stasio, G., Rajesh, D., Ford, J. M., Daniels, M. J., Erhardt, R. J., Frazer, B. H., Tyliczszak, T., Gilles, M. K., Conhaim, R. L., Howard, S. P., Fowler, J. F., Esteve, F. & Mehta, M. P. (2006). *Clin Cancer Res* 12, 206-213.
- Dilmanian, F. A., Button, T. M., Le Duc, G., Zhong, N., Pena, L. A., Smith, J. A., Martinez, S. R., Bacarian, T., Tammam, J., Ren, B., Farmer, P. M., Kalef-Ezra, J., Micca, P. L., Nawrocky, M. M., Niederer, J. A., Recksiek, F. P., Fuchs, A. & Rosen, E. M. (2002). *Neuro-oncol* 4, 26-38.
- Dilmanian, F. A., Hainfeld, J. F. & Krause, C. A. (2003). *National Synchrotron Light Source activity report 2002*.

- Dilmanian, F. A., Qu, Y., Liu, S., Cool, C. D., Gilbert, J., Hainfeld, J. F., Kruse, C. A., Lattera, J., Lenihan, D., Nawrocky, M. M., Pappas, G., Sze, C. I., Yuasa, T., Zhong, N., Zhong, Z. & McDonald, J. W. (2005). *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 548, 30-37.
- Dilmanian, F. A., Zhong, Z., Bacarian, T., Benveniste, H., Romanelli, P., Wang, R., Welwart, J., Yuasa, T., Rosen, E. M. & Anschel, D. J. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9709-9714.
- Dudas, A. & Chovanec, M. (2004). *Mutat Res* 566, 131-167.
- Fairchild, R. G. (1987). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13, 1262-1263.
- Fairchild, R. G., Brill, A. B. & Ettinger, K. V. (1982). *Invest Radiol* 17, 407-416.
- Fehlauer, F., Muench, M., Rades, D., Stalpers, L. J., Leenstra, S., van der Valk, P., Slotman, B., Smid, E. J. & Sminia, P. (2005). *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 723-732.
- Fertil, B., Dertinger, H., Courdi, A. & Malaise, E. P. (1984). *Radiat Res* 99, 73-84.
- Goodhead, D. T., Thacker, J. & Cox, R. (1981). *Phys Med Biol* 26, 1115-1127.
- Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. & Smilowitz, H. M. (2006). *Br J Radiol* 79, 248-253.
- Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. (2004). *Phys Med Biol* 49, N309-315.
- Iwamoto, K. S., Cochran, S. T., Winter, J., Holburt, E., Higashida, R. T. & Norman, A. (1987). *Radiother Oncol* 8, 161-170.
- Iwamoto, K. S., Norman, A., Freshwater, D. B., Ingram, M. & Skillen, R. G. (1993). *Radiother Oncol* 26, 76-78.
- Jeggo, P. A. & Lobrich, M. (2006). *DNA Repair (Amst)* 5, 1192-1198.
- Joiner, M. C., Marples, B., Lambin, P., Short, S. C. & Turesson, I. (2001). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 379-389.
- Joubert, A., Biston, M. C., Boudou, C., Ravanat, J. L., Brochard, T., Charvet, A. M., Esteve, F., Balosso, J. & Foray, N. (2005). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 1486-1496.
- Joubert, A. & Foray, N. (2006). Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies (Chapter 10). In: Landseer, BR., editor. *New Research on DNA Repair*. Hauppauge NY: Nova Science Publishers, Inc.
- Kassis, A. I. & Adelstein, S. J. (1996). *J Nucl Med* 37, 10S-12S.
- Khanna, K. K. & Jackson, S. P. (2001). *Nat Genet* 27, 247-254.
- Krause, M., Wohlfarth, J., Georgi, B., Pimentel, N., Dorner, D., Zips, D., Eicheler, W., Hessel, F., Short, S. C., Joiner, M. C. & Baumann, M. (2005). *Int J Radiat Biol* 81, 751-758.
- Laissue, J. A., Geiser, G., Spanne, P. O., Dilmanian, F. A., Gebbers, J. O., Geiser, M., Wu, X. Y., Makar, M. S., Micca, P. L., Nawrocky, M. M., Joel, D. D. & Slatkin, D. N. (1998). *Int J Cancer* 78, 654-660.
- Laster, B. H., Thomlinson, W. C. & Fairchild, R. G. (1993). *Radiat Res* 133, 219-224.
- Mitchell, J. B., Russo, A., Cook, J. A., Straus, K. L. & Glatstein, E. (1989). *Int J Radiat Biol* 56, 827-836.
- Miura, M., Blattmann, H., Brauer-Krisch, E., Bravin, A., Hanson, A. L., Nawrocky, M. M., Micca, P. L., Slatkin, D. N. & Laissue, J. A. (2006). *Br J Radiol* 79, 71-75.
- Mothersill, C. & Seymour, C. (2004). *Mutat Res* 568, 121-128.
- Mothersill, C. & Seymour, C. B. (2004). *Nat Rev Cancer* 4, 158-164.
- Norman, A., Adams, F. H. & Riley, R. F. (1978). *Radiology* 129, 199-203.
- Norman, A., Cochran, S. T. & Sayre, J. W. (2001). *Radiat Res* 155, 740-743.

- Norman, A., Ingram, M., Skillen, R. G., Freshwater, D. B., Iwamoto, K. S. & Solberg, T. (1997). *Radiat Oncol Investig* 5, 8-14.
- Norman, A., Iwamoto, K. S. & Cochran, S. T. (1991). *Invest Radiol* 26 Suppl 1, S120-121; discussion S125-128.
- Ponnaiya, B., Jenkins-Baker, G., Brenner, D. J., Hall, E. J., Randers-Pehrson, G. & Geard, C. R. (2004). *Radiat Res* 162, 426-432.
- Rabik, C. A. & Dolan, M. E. (2007). *Cancer Treat Rev* 33, 9-23.
- Rose, J. H., Norman, A., Ingram, M., Aoki, C., Solberg, T. & Mesa, A. (1999). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45, 1127-1132.
- Rothkamm, K. & Lobrich, M. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5057-5062.
- Santos Mello, R., Callisen, H., Winter, J., Kagan, A. R. & Norman, A. (1983). *Med Phys* 10, 75-78.
- Schlegel, J., Piontek, G., Kersting, M., Schuermann, M., Kappler, R., Scherthan, H., Weghorst, C., Buzard, G. & Mennel, H. (1999). *Pathobiology* 67, 202-206.
- Serduc, R., Verant, P., Vial, J. C., Farion, R., Rocas, L., Remy, C., Fadlallah, T., Brauer, E., Bravin, A., Laissue, J., Blattmann, H. & van der Sanden, B. (2006). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 1519-1527.
- Sheleg, S. V., Korotkevich, E. A., Zhavrid, E. A., Muravskaya, G. V., Smeyanovich, A. F., Shanko, Y. G., Yurkshtovich, T. L., Bychkovsky, P. B. & Belyaev, S. A. (2002). *J Neurooncol* 60, 53-59.
- Siegbahn, E. A., Stepanek, J., Brauer-Krisch, E. & Bravin, A. (2006). *Med Phys* 33, 3248-3259.
- Slatkin, D. N., Spanne, P., Dilmanian, F. A., Gebbers, J. O. & Laissue, J. A. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8783-8787.
- Slatkin, D. N., Spanne, P., Dilmanian, F. A. & Sandborg, M. (1992). *Med Phys* 19, 1395-1400.
- Smilowitz, H. M., Blattmann, H., Brauer-Krisch, E., Bravin, A., Di Michiel, M., Gebbers, J. O., Hanson, A. L., Lyubimova, N., Slatkin, D. N., Stepanek, J. & Laissue, J. A. (2006). *J Neurooncol* 78, 135-143.
- Steel, G. G. (2002). *Basic clinical radiobiology.*, 3rd ed. London: Arnold.
- Taghian, A., Ramsay, J., Allalunis-Turner, J., Budach, W., Gioioso, D., Pardo, F., Okunieff, P., Bleehen, N., Urtasun, R. & Suit, H. (1993). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25, 243-249.
- Turchi, J. J., Patrick, S. M. & Henkels, K. M. (1997). *Biochemistry* 36, 7586-7593.
- Withers, H. R., Taylor, J. M. & Maciejewski, B. (1988). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14, 751-759.
- Yang, H., Asaad, N. & Held, K. D. (2005). *Oncogene* 24, 2096-2103.
- Zhang, J. & Powell, S. N. (2005). *Mol Cancer Res* 3, 531-539.
- Zhong, N., Morris, G. M., Bacarian, T., Rosen, E. M. & Dilmanian, F. A. (2003). *Radiat Res* 160, 133-142.

Legend to figures :

Figure 1: The best results obtained with anti-cancer synchrotron radiation treatments. Quantitative illustration of the highest percentages of survival of rats bearing the 9L (panel A) and F98 (panel B) glioma treated to the indicated synchrotron modalities. The values shown here are those presented in bold characters in Table 2.

Table 1 : Principle, advantages and inconvenients of each anti-cancer strategy using synchrotron radiation

Method	Principle	Hypothesis	Advantages	Inconvenients
<i>Microcrobeam radiation therapy (MRT)</i>	High dose radiotherapy in one or several directions by multiple, parallel, planar microbeams	Physical dose excess will contribute to kill tumour	Tissue necrosis prevention by repopulation of normal tissues from cells in valleys	Patient displacements Residual dose in valleys Bystander effects still not known Numerous irradiation parameters (dose, beam size, valley size,...)
<i>Photoactivation of iodinated contrast agents (CT therapy)</i>	Stereotactic radiotherapy by enhancement of photoelectric effect in tumour <i>via</i> ICAs	Physical dose excess will contribute to kill tumour	Concomitant tumour imaging and radiotherapy Intravenous application	Extravascular diffusion Extranuclear photoactivation Toxicity of radiolysis products
<i>Photoactivation of platinated compounds (PAT-Plat)</i>	Stereotactic radiotherapy by enhancement of photoelectric effect in tumour <i>via</i> platinated chemotherapeutic compounds	Physical dose excess will contribute to kill tumour	Intratumoral accumulation Intranuclear photoactivation Direct DNA targeting Synergic effect of radiatio- and chemotherapy are enhanced by photoactivation	Intracranial (intratumoral) injection

Table 2 : The best results of preclinical trials using synchrotron radiation in rats bearing gliomas

Tumour model	Treatment and irradiation modality	Median survival time days (MeST) (number of rats)	% of rats surviving at 50,100,150,200 days post-treatment	% increased life span of MeST	References
<i>Microbeam radiation therapy (MRT)</i>					
9L glioma in Fisher rats	Untreated controls	25 (9)	-	-	(Laissee <i>et al.</i> , 1998)
	625 Gy unidirectionally	45 (11)	35,35,35,35	80	
	625 Gy bidirectionally	115 (14)	100,55,50,50	360	
9L glioma in Fisher rats	Untreated controls	19 (17)	-	-	(Dilmanian <i>et al.</i> , 2002)
	150 Gy 50 µm beam spacing	98 (5)	60,60,40,40	415	
	250 Gy 75 µm beam spacing	171 (5)	100,60,60,40	800	
	500 Gy 100 µm beam spacing	170 (3)	65,65,65,32	794	
9L glioma in Fisher rats	Untreated controls	9 (14)	-	-	(Smilowitz <i>et al.</i> , 2006)
	625 Gy unidirectionally	25 (25)	40,20,20,20	170	
	625 Gy unidirectionally + IMPR	25 (14)	24,20,20,20	170	
	625 Gy unidirectionally +GMIMPR	32 (23)	47,42,42,42	255	
<i>Boron neutron capture therapy (BNCT)</i>					
9L glioma in Fisher rats	Untreated controls	22 (18)	-	-	(Coderre <i>et al.</i> , 1994)
	22.5 Gy X-rays controls	35 (55)	27,20,20,20	59	
	7.5 MW-min + boronophenilalanine + mannitol i.p.	130 (12)	100,60,50,50	491	

Table 2 : to be continued

<i>Photoactivation of iodinated contrast agents (CT therapy)</i>					
F98 glioma in Fisher rats	Untreated controls	12 (6)	-	-	(Adam <i>et al.</i> , 2003)
	10 Gy (50 keV)	15 (6)	0,0,0,0	20	
	10 Gy (50 keV) + Iomeron	17 (6)	0,0,0,0	44	
F98 glioma in Fisher rats	Untreated	26 (9)	-	-	(Adam <i>et al.</i> , 2006)
	15 Gy (50 keV)	46 (15)	40,0,0,0	77	
	15 Gy (50 keV) + i.v. Iomeron + mannitol	54 (10)	60,0,0,0	108	
	15 Gy (50 keV) + i.c. Iomeron + mannitol	71 (9)	90,0,0,0	173	
	25 Gy (50 keV)	145 (9)	90,90,40,10	458	
	25 Gy (50 keV) + i.v. Iomeron + mannitol	55 (9)	60,0,0,0	113	
25 Gy (50 keV) + i.c. Iomeron + mannitol	45 (11)	35, 0,0,0	73		
<i>Photoactivation of platinated compounds (PAT-Plat)</i>					
F98 glioma in Fisher rats	Untreated	26 (12)	-	-	(Biston <i>et al.</i> , 2004)
	15 Gy (78 keV)	48 (10)	50,0,0,0	85	
	i.cr. 3 µg cisplatinum	37 (10)	10,0,0,0	42	
	15 Gy (78 keV) + i.cr. 3 µg cisplatinum exp1	206 (18)	90,67,65,65	694	
	15 Gy (78 keV) + i.cr. 3 µg cisplatinum exp2	110 (10)	65,60,40,40	323	
F98 glioma in Fisher rats	Untreated	26 (20)	-	-	(Biston <i>et al.</i> , 2007)
	15 Gy (78 keV)	34 (5)	50,0,0,0	31	
	i.cr. 3 µg cisplatinum	41 (15)	30,0,0,0	58	
	i.cr. 40 µg carboplatinum	58 (9)	50,10,10,10	123	
	15 Gy (78 keV) + i.cr. 3 µg cisplatinum	95 (25)	85,45,40,37	265	
	15 Gy (78 keV) + i.cr. 40 µg carboplatinum	111 (17)	70,50,40,20	326	
<i>Boron neutron capture therapy (BNCT)</i>					
F98 glioma in Fischer rats	Untreated controls	25 (10)	-	-	(Barth <i>et al.</i> , 2000)
	BNCT (boronophenilalanine sodium borocaptate + mannitol ic)	72 (20)	85,50,25,25	483	

* in bold-the best protracted survivals of treatment modality

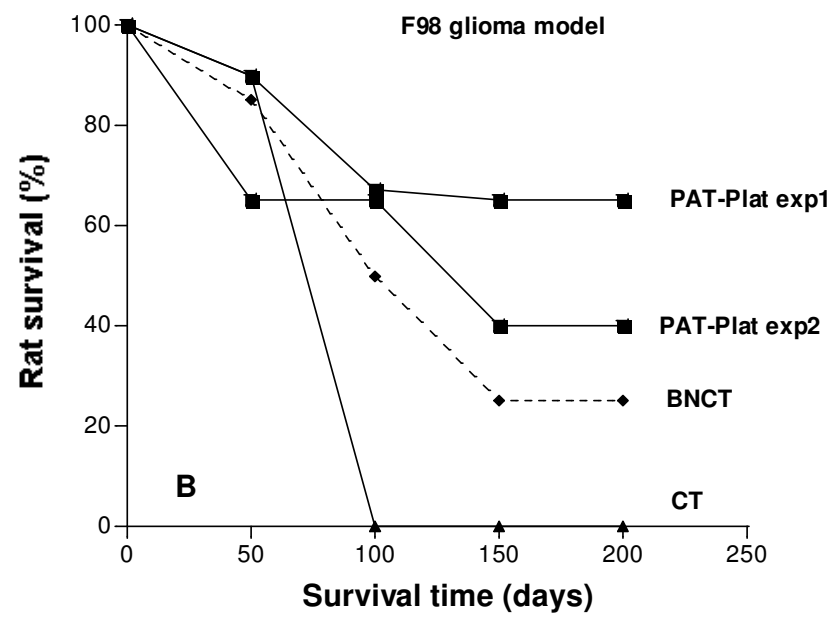
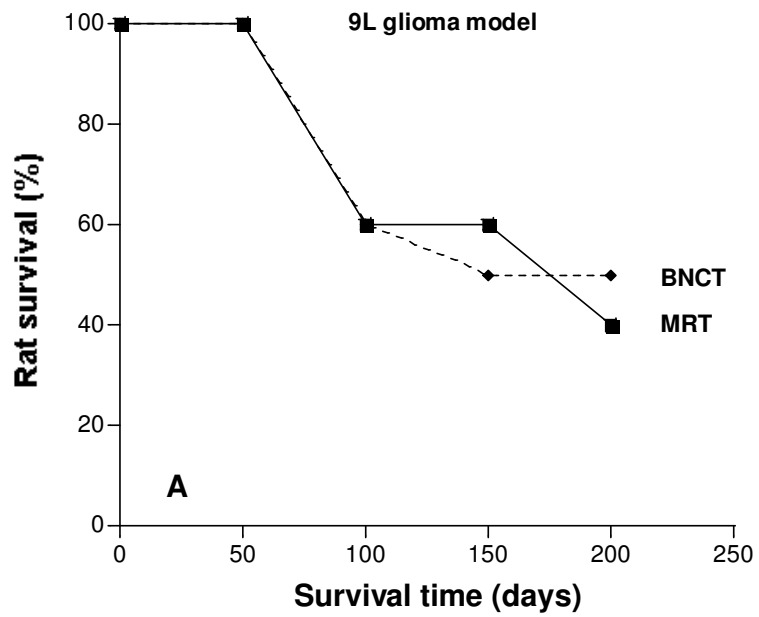


Figure 1