



Contribution à l'étude clinique et biologique des réactions tissulaires de radiosensibilité observées après radiothérapie de cancers prostatiques : effet potentiellement radioprotecteur des statines

Karim Malek

► **To cite this version:**

Karim Malek. Contribution à l'étude clinique et biologique des réactions tissulaires de radiosensibilité observées après radiothérapie de cancers prostatiques : effet potentiellement radioprotecteur des statines. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAS005>. <tel-01208244>

HAL Id: tel-01208244

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01208244>

Submitted on 2 Oct 2015

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement.**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Karim MALEK

Thèse dirigée par le **Pr. Jacques BALOSSO, UJF**

& le **Dr Nicolas FORAY, INSERM, Lyon**

EDISCE

**Contribution à l'étude clinique et biologique
des réactions tissulaires de radiosensibilité
observées après radiothérapie de cancers
prostatiques: effet potentiellement radio-
protecteur des statines**

Thèse soutenue publiquement le **06/07/2015**

Devant le jury composé de :

Pr. Michel BOLLA	Université Joseph Fourier, Grenoble	Président
Pr. Vincent VINH UNG	Université de Genève- Suisse	Rapporteur
Dr. Jean Pierre POUGET	Institut de cancer Montpellier	Rapporteur
Pr. Hervé CURE	Institut Jean Godinot, Reims	Examineur
Dr. Pascal POMMIER	Centre Léon Bérard, Lyon	Examineur
Pr. Jacques BALOSSO	Université Joseph Fourier, Grenoble	Directeur
Dr. Nicolas FORAY	INSERM CR-U1052 Groupe de radiobiologie	Codirecteur



SOMMAIRE

PREAMBULE	1
A. Introduction – Rappels bibliographiques	4
1. Constatations cliniques	4
1.1. Les différents types de réactions tissulaires	4
1.1.1. Effets aigus et précoces	5
1.1.2. Effets chroniques ou tardifs	6
1.2. Les échelles de gravité :	7
1.2.1. De la difficulté de quantifier la toxicité à la réalité clinique	7
1.2.2. Exemple d'une étude concernant le foie irradié : toxicité aiguë biologique (article 1 : Correlation of dosimetric parameters with subclinical liver function test alterations after radiotherapy for upper gastrointestinal tract tumors).....	8
1.3. Les événements en radiothérapie, de la dosimétrie à la génétique.....	11
1.4. L'accident d'Epinal	13
1.5. Exemple du cancer de la prostate	14
1.6. Médication incidentalum	18
1.6.1. Les statines.....	18
1.6.1.1. Effets sur le bilan lipidique	18
1.6.1.2. Effets indésirables.....	19
1.6.1.3. Contre-indications.....	19
1.6.1.4. Statines et réponse à l'irradiation:	20
1.6.1.5. Action anti-tumorale des Statines	22
1.6.1.6. Les statines et cancers	22
1.6.2. Exemple d'une étude de l'impact de la prise de statine sur la tolérance à l'irradiation (article 6).....	24

1.6.3. Les bisphosphonates.....	24
1.6.3.1. Aspects moléculaires et mécanismes d'action	25
1.6.3.2. Pharmacocinétique (Holmberg, Lerner et al. 2010, Hasan, Schumacher et al. 2014).....	27
1.6.4.3. Indications	28
1.6.4.4. Contre-indication	29
1.6.4.5. Effets secondaires	29
1.6.4.6. Bisphosphonates et cancer de la prostate :	29
2. Eléments de radiobiologie - Interaction des rayonnements ionisants avec la matière vivante.....	30
2.1 Rappels des bases structurales de l'ADN	30
2.2 Chronologie des événements radio induits :	34
2.2.1 La phase physique :	34
2.2.1.1 Les différentes interactions photon-matière	35
2.2.1.1.1. Effet photoélectrique	35
2.2.1.1.2. Effet Compton	36
2.2.1.1.3. Création de paires ou matérialisation	36
2.2.1.2 Importance relative des différents effets	36
2.2.1.3 Les micro-dépôts d'énergie	37
2.2.1.3.1. La phase chimique	39
2.2.1.3.1.1. La radiolyse de l'eau.....	39
2.2.1.3.1.2. La radiolyse d'une solution aqueuse	40
2.2.1.3.2. La phase biologique.....	41
2.2.1.3.2.1. Les dommages radio induits de l'ADN	41
2.4.1.1. La réparation des CDB.....	43
2.4.1.1.1. La recombinaison	43

2.4.1.1.2. La suture : <i>non-homologous end joining</i> (NHEJ)	43
2.4.1.2. Rôle de la régulation du cycle cellulaire :	44
2.4.1.2.1 Transition G0/G1 :	45
2.4.1.2.2 Transition G1/S :	46
2.4.1.2.3. La phase G2/M :	47
2.4.1.3. La mort cellulaire:	47
3. De l'inflammation radio-induite à la lésion tissulaire constituée	49
3.1. La théorie de la réponse aux radiations développée par le laboratoire d'accueil	54
3.1.1. Justification des choix techniques	54
3.1.1.1. Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB	54
3.1.1.2. Choix des modèles cellulaires	55
3.1.2. Les acquis du laboratoire d'accueil depuis 2003	57
3.1.2.1. Une première corrélation quantitative entre radiotoxicité et CDB non réparés.	57
3.1.2.2. La genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM.....	59
3.1.2.3. La genèse de l'étude des effets des statines et des bisphosphonates	61

B. Buts de la thèse et démarche scientifique63

1. Deux constats généraux	63
---------------------------------	----

C. RESULTATS65

1. Résumé des travaux antérieurs	66
2. Résultats cliniques	75
2.1. Résultats radiobiologiques, caractérisation radiobiologique du tissu rectal.....	75
2.2. Etude clinique statines et rectite radique dans la radiothérapie des cancers de prostate.....	86

D. Discussions et conclusions.....96

1. Approche Globale..... **Erreur ! Signet non défini.**
2. Cohorte..... **Erreur ! Signet non défini.**
3. Médication et radiothérapie du cancer de la prostate **Erreur ! Signet non défini.**
4 Approche radiobiologique (mini projet HERACLES) **Erreur ! Signet non défini.**
5. Perspectives d'applications futures en radiothérapie..... **Erreur ! Signet non défini.**

BIBLIOGRAPHIES 96

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIEA	Agence internationale de l'énergie atomique
ALAT	Alanine Amino transférase
ASAT	Aspartate Amino transférase
ASN	Autorité de sûreté nucléaire
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Atm-and Rad3-related
BM	Brain metastasis
CDB	Cassure double brin
CSB	Cassure simple brin
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTV	Clinical target volume
DT	Dose de tolérance
EBRT	External beam radiation therapy
ECG	Electro cardiogramme
EGF	Epidermal Growth Factor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EPID	Electronic portal imaging device
ESRF	European synchrotron radiation facility

GGT	Gamma Glutamyl transférase
GTV	Gross target volume
Gy	Gray
HDL	High density lipoprotein
HIF1-α	Human Inflammatory Factor
ICRU	International commission on radiation units and measurements
IGRT	Image-guided radiation therapy
IMRT	Intensity-modulated radiation therapy
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire
KPS	l'indice de Karnofsky
LDL	Low density lipoprotein
LQ	Llinéaire quadratique
MMSE	Mini mental state examination
MPF	mitosis promoting factor
NTCP	Normal tissue complication probability
OAR	Organes à risque
PA	Phosphatase alcaline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTV	Planning Target volume
PTV	Planning target volume
QV	Qualité de vie
RI	Rayonnement ionisant

RILD	Radiation liver induced disease
RPA	Recursive partitioning analysis
RTOG	Radiation therapy oncology group
SAR	Scaffold attachment regions
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SFRO	Société française de radiothérapie oncologique
SIB	Simultaneous integrated boost
SNP	polymorphismes nucléotidiques simples
TCP	Tumor control probability
VLDL	Very low density lipoprotein
VMAT	Irradiation avec Modulation d'intensité Volumétrique par ArcThérapie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme schématique de la fibrose induite par la radiothérapie en mettant en évidence les facteurs cellulaires, vasculaires, inflammatoires profibrosants et les perturbations de la signalisation moléculaire (Mancini and Sonis 2014).....	6
Figure 2 : le Modèle de Lymann.....	9
Figure 3 Normalisation de quasi-totalité des paramètres biologiques hépatiques 6 mois après la fin du traitement.....	9
Figure 4 : L'étude statistique par régression multiple non linéaire confirme que V40 Gy est le plus responsable des troubles hépatiques conformément au modèle de Lymann.	10
Figure 5 : Aucune altérations biologiques constatées si V40 inférieure à 10% (zone A), un tel désordre peut être attendu si V40 est supérieure à 38% (zone C). Entre ces 2 limites l'interprétation est difficile (zone B).	10
Figure 6 : Exemple d'un modèle d'inhibition du protéasome par anti-farnesylation (He, Mangala et al. 2012).....	21
Figure 7: Mécanismes d'action anti-tumoraux des statines (Gordon, Massaro et al. 2014)	22
Figure 8: Mécanisme d'action des bisphosphonates (Alizadeh, Sylvestre et al. 2012).	25
Figure 9 : A gauche : structure d'un fragment d'une chaîne d'ADN.....	30
Figure 10 : Structure de l'ADN.....	32
Figure 11: L'effet photoélectrique, le photon incident est absorbé et son énergie permet l'éjection d'un ou plusieurs électrons.....	35
Figure 12: Effet Compton.....	36
Figure 13 : Importance relative des trois modes d'interaction des photons avec la matière d'après (Evans 1985, Chetioui, Despiney et al. 1994).	37
Figure 14 : Représentation schématique de la trajectoire des rayons γ de faible TEL et des particules α de haut TEL traversant le noyau d'une cellule, d'après (Goodhead 1989).	38
Figure 0-15 : Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.....	40

Figure 0-16: Dommages de l'ADN et modes de réparation d'après (Morrison, Smith et al. 1997).....	42
Figure 17 : Schéma sommaire de la régulation des points de contrôle G1/S et G2 DNA damage.....	46
Figure 18: Aspect macroscopique d'une rectite postradique, caractérisées par une muqueuse atrophique avec accentuation des télangiectasies et dépôts lipidiques.....	50
Figure Figure 19: aspect histologique d'une rectite radique chronique montrant des cryptes distordues, une fibrose du chorion avec des capillaires dilatés.....	52
Figure 20: Classification en 3 groupes de radiosensibilité proposée par l'équipe du laboratoire d'accueil.....	59
Figure 21: Notre modèle pATM/MRE11/pH2AX dans des cellules en G0/G1	61
Figure 25 : Exemple de cellule avec un micronoyau.	79
Figure 26 : Effet du traitement ZOPRA sur le nombre des micronoyaux après irradiation (barres vides cellules HIF et barres pleines HF19).	80
Figure 27 : A. distribution des foci γ H2AX (photos); B. cinétique des foci γ H2AX.....	82
Figure 28 A. aspect en immunofluorescence pATM ; B. cinétique des foci pATM	84
Figure 22 a à d : Distribution gaussienne des valeurs de volume rectal, diamètre rectal, V50Gy et V25Gy.....	89
Figure 24 : Distribution des patients selon le grade des rectites (A) et fréquence des patients atteints de rectite selon la prise de statines.	94
Figure 29 : Effets de substances candidates pour un effet de radio protection comparés au ZOPRA après irradiation de cellules HIF.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différents grades de la mucite radique.....	5
Tableau II: Incidence et mortalité estimées des principaux cancers en France métropolitaine chez l'homme en 2012.	15
Tableau III: Les principaux bisphosphonates et leurs indications.	28
Tableau IV : Schématisation de type de lésion de l'ADN en fonction de l'énergie déposée (thèse de L.BODGI)	58
Tableau V : Caractéristiques et statistiques dose-volume de la population étudiée. La dispersion des valeurs dosimétriques concernant le rectum est faible et montre que les modalités de traitement de cette population sont très homogènes pour une pathologie pelvienne.....	88
Tableau VI: Effectifs selon les caractéristiques croisées : traitement par statine et rectite de grade variable. Dans chaque sous-groupe défini par le traitement, les taux de complications rectales sont très similaires avec une tendance globale des patients sous statine à avoir une toxicité moins fréquente et de gravité plus faible.	90
Tableau VII: Cas de rectites de grade ≥ 2 pour chaque sous-groupe de traitement avec ou sans statine. La fréquence des cas de rectite grave est un peu supérieure dans le groupe sans statine de +6%. Les intervalles de confiances montrent que cette différence n'est pas significative pour ces effectifs.	90
Tableau VIII: Le test de Pearson pour l'ensemble de la population montre que la corrélation entre le traitement par statines et la toxicité rectale est négative à la hauteur de -7,6% avec une p (ici donné par sigma) non significatif à 0.55.....	91
Tableau X : Le test de Pearson restreint à la seule population affectée par la toxicité sévère de grade 2 et 3 regroupées montre que la corrélation entre le traitement par statines et la toxicité rectale est non significative $p = 0.78$	91
Tableau X: La distribution des valeurs dosimétriques prévisionnelles en fonction des événements toxiques ne montre aucune différence entre les groupes rectite ou non rectite de $G \geq 2$. Les paramètres prévisionnels des traitements ne sont pas associés à la présence ou non d'une toxicité, ce qui écarte l'hypothèse d'erreurs techniques de planification.	92

Tableau XI: Corrélations avec les valeurs dosimétriques, contrôle de qualité de la dosimétrie.
.....92

PREAMBULE

La radiothérapie est un moyen thérapeutique fiable et de plus en plus sophistiqué visant toujours à améliorer le rapport efficacité/toxicité. Néanmoins, certains effets radioinduits restent surprenants. L'absence d'explication technique pose la question d'un contexte biologique propre au patient telle qu'une radiosensibilité individuelle. C'est ce sujet que nous traitons dans cette thèse dans le cadre plus particulier de la radiothérapie des cancers de la prostate.

Médecin clinicien, spécialisé en cancérologie-radiothérapie, j'ai pu en 2008, sous l'égide du Pr Jacques Balosso et sa direction de recherche, obtenir un Master de physique médicale orienté vers la recherche. Ce Master m'a permis de me pencher sur des questions scientifiques particulières notamment à l'interface de la physique et de la radiobiologie : les deux bases fondamentales de la radiothérapie.

Comme tous nos confrères, nous traitons nos patients selon des recommandations basées sur de grandes séries cliniques et d'une biostatistique documentée. A chaque fois que nous sommes confrontés à des événements indésirables, comme tout praticien préoccupé de l'intérêt de son patient, nous nous sommes penchés sur la question de l'apparition d'effets secondaires parfois d'une sévérité disproportionnée chez certains patients traités par radiothérapie conventionnelle. Dans ce contexte, le cancer le plus étudié à Grenoble, où j'ai reçu l'essentiel de ma formation, est le cancer de la prostate et les effets secondaires associés en sont souvent les rectites.

Plus tard, durant mon passage en radiothérapie au CHU de Genève j'ai pu aussi enrichir ma formation en matière de tumeurs cérébrales, ce qui a fait l'objet d'une publication en 2011 (Weber, Caparrotti et al. 2011).

Les données bibliographiques décrivant des événements post-radiques comme réactions anormales s'avèrent peu informatives. En effet, le phénomène, bien que fréquemment décrit n'est pas à ce jour inclus dans un cadre nosologique spécifique et n'est pas clairement élucidé. Connaissant les contributions du laboratoire du Dr Nicolas Foray et de son équipe, référence en radiobiologie, et après plusieurs discussions informelles, nous avons convenu de la nécessité d'un travail de recherche sur cette question touchant particulièrement la pratique clinique. Le modèle clinique auquel nous avons voulu attaché notre travail de thèse a donc été naturellement les rectites radiques.

L'étude a porté sur des facteurs prédictifs de la sévérité de la rectite radique chez les patients atteints d'un cancer de la prostate, traités par radiothérapie dans des conditions très standardisées. Est-ce la technique ou la biologie qui fait la différence ? Ou encore l'utilisation concomitante de certaines médications ?

Le cancer de la prostate est une tumeur très fréquente chez les hommes de plus de 60 ans. Cette tranche d'âge est aussi affectée par de nombreuses comorbidités telles que l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, la coronaropathie, voire l'ostéoporose... et les polymédications chroniques sont fréquentes.

Le traitement de référence recommandé pour les cancers de la prostate classés en stades de risque intermédiaire ou de risque élevé est une hormono-radiothérapie concomitante (Bolla, Fournier et al. 2008, Matzinger, Duclos et al. 2009).

L'irradiation du cancer de la prostate, a montré une bonne réponse thérapeutique corrélée à l'escalade de dose dans les traitements usuels par radiothérapie (normo-fractionnée). Néanmoins, ce traitement connaît encore des limites dues aux doses de tolérance des organes à risque (vessie, rectum, tissus neuro-vasculaire), qui sont toujours respectées par le prescripteur. Malgré cela, certains patients développent une rectite radique de grade 2 ou 3 qu'on ne peut attribuer à une cause technique. Ces cas posent donc la question de la radiosensibilité spécifique de ces patients.

Par ailleurs, certaines médications fréquemment prises pour les comorbidités banales citées précédemment ont été suspectées d'avoir un rôle dans la genèse de ces réponses anormales chez ces patients, telle que les statines, les bisphosphonates, plus rarement utilisés, ou encore les antiagrégants plaquettaires (Fowke, Motley et al. 2011). Cette situation mérite d'être analysée à la lumière des connaissances récentes de la radiobiologie appliquée à la radiothérapie.

Il faut noter, par ailleurs, que les développements technologiques permettent aujourd'hui d'envisager des modalités thérapeutiques qui sont autant de défis à la radiobiologie clinique. En effet, outre les manipulations pharmacologiques plus ou moins volontaires inhérentes aux polymédications des patients, des modifications des volumes, des débits de dose et du fractionnement sont devenues possibles.

Par exemple, plusieurs équipes de radiothérapies ont déduit de leurs travaux cliniques que les caractéristiques biologiques tissulaires, résumées par le rapport α/β , permettent d'améliorer l'index thérapeutique dans le cancer de prostate par un traitement hypofractionné. En effet, le

rapport α/β de la tumeur semble plus faible que celui des tissus sains voisins, 1,5 au lieu de 2 (Zaider, Zelefsky et al. 2005).

Par ce travail doctoral, nous avons voulu avancer dans la compréhension des déterminants radiobiologiques qui pourraient avoir une implication dans la compréhension, d'une part, mais aussi dans la modulation, d'autre part, des risques biologiques de la radiothérapie. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à l'hypothèse d'une interaction entre les niveaux de radiosensibilité des tissus sains et la prise de médicaments fortement actifs sur le métabolisme cellulaire et éventuellement pris par les patients de manière intercurrente à leur prise en charge en radiothérapie. Il s'agit des antiagrégants plaquettaires, des statines hypocholestérolémiantes et des bisphosphonates antiostéoporotiques.

Pour permettre cette confrontation clinico-biologique, ont été mis en lien dans ce travail, deux équipes, l'une clinique formée par le directeur de thèse, le Pr Jacques Balosso et moi-même, en tant que cliniciens au CHU de Grenoble, et l'autre, scientifique, du laboratoire Inserm de radiobiologie dirigé par le codirecteur de thèse, le Dr Nicolas Foray au Centre Léon Bérard à Lyon.

A. Introduction – Rappels bibliographiques

1. Constatations cliniques

1.1. Les différents types de réactions tissulaires

Le traitement par radiothérapie externe expose nécessairement les tissus sains à une certaine dose de radiations ionisantes. On essaie par tous les moyens techniques de minimiser cette irradiation inutile dans les volumes situés au voisinage de la cible et situés en bordure du volume cible planifié ou PTV (Planning Target Volume). Ces tissus sains étant irradiés à des doses plus faibles que la cible mais selon le même nombre de fractions, l'effet biologique attendu peut être assez variable d'un traitement à un autre. Notamment, à dose totale semblable mais avec un fractionnement différent, la toxicité de l'irradiation sera différente. La base pour calculer les doses biologiques équivalentes à ces situations diverses est la loi linéaire-quadratique (LQ). Ce modèle descriptif et empirique de prédiction des effets biologiques est basé sur l'étude des courbes de survie cellulaires et est d'usage courant dans des conditions standards (fraction < 5 Gy) (Zackrisson, Franzen et al. 1994). Cependant, il reste très limité et ne permet pas la prise en compte de tous les éléments de la radiobiologie humaine. Heureusement, les connaissances actuelles sur la radiosensibilité en radiothérapie constituent une science plus précise qui permet de situer et de décrire les différents acteurs responsables de l'effet de l'irradiation sur les tissus sains.

Comme mentionné précédemment, l'irradiation des tissus sains étant inévitable, il faut définir des seuils de tolérances à respecter afin de ne pas entraîner des complications qui effaceraient tout bénéfice du traitement de la tumeur. De ce point de vue, parmi les bases de prescription de la radiothérapie externe, on peut mentionner le concept de dose de tolérance 5% à 5 ans (DT 5/5) qui signifie à ce niveau de dose qu'on attend et accepte 5% de risque pour les tissus sains dans les 5 ans qui suivent l'irradiation. D'autres relations entre les doses et les volumes de tissus sains sont aussi communément utilisées du fait de l'hétérogénéité des irradiations qui ne permet pas d'appliquer strictement les limites de la DT 5/5 (qui suppose une irradiation homogène d'un organe). Ce sont, par exemple, les limites portant sur les doses à des volumes partiels pulmonaires (le V20Gy doit rester inférieur à 30% du volume pulmonaire, etc.). Néanmoins, ceci n'empêche pas d'observer des effets cliniques moins graves mais bien plus fréquents qui sont de deux types :

1.1.1. Effets aigus et précoces

- La radiodermite, quand la peau reçoit des doses substantielles, est la première expression cutanée à l'exposition aux rayonnements ionisants. Au cours de la 2^{ème} ou la 3^{ème} semaine d'un traitement par radiothérapie externe, on observe généralement une rougeur ou radio-épithélite de grade 1. A dose cumulative et vers la fin d'un traitement classique normo-fractionné et normo-étalé, on peut observer une réaction cutanée de grade 2 (radiodermite sèche).

Dans certains cas de radiosensibilités radiques ou en cas de surexposition, une réaction de grade plus important, 3 (radiodermite suintante) ou 4 (nécrose cutanée), peut être observée (voir chapitre 1.2 Les échelles de gravité).

- La mucite radique, est l'équivalent de la radiodermite au niveau endobuccal. C'est une réaction radique plus pénible sur le plan symptomatique car généralement nettement plus inflammatoire. La cavité buccale abrite des germes saprophytes qui, à l'occasion de l'atrophie transitoire que constitue cette mucite, vont proliférer et traverser la muqueuse créant une réaction inflammatoire douloureuse pour le patient. Les modifications consécutives à cette prolifération bactérienne - comme l'acidification du milieu buccal - va en outre favoriser le développement d'une surinfection mycotique qui peut à son tour aggraver la mucite.

Grade de la mucite	Description clinique
0	Pas de changement de la muqueuse
1	Douleur supportable ne nécessitant pas l'utilisation d'un antalgique
2	Mucite inflammatoire +/- séro-sanglante nécessitant un antalgique
3	Mucite + fibrine, nécessitant un antalgique de palier >2
4	Ulcération, hémorragie ou nécrose

Tableau I : Les différents grades de la mucite radique

Le mécanisme d'apparition de ces effets radiques correspond à la diminution de l'efficacité du renouvellement continu de la muqueuse ou de la peau pendant l'irradiation conduisant, dès l'érosion suffisante du tissu (ce qui apparaît rapidement, d'où le terme d'effets précoces),

à une défaillance fonctionnelle transitoire, car régressive après la fin de l'irradiation, (d'où l'autre qualificatif d'effets aigus). Ces effets n'apparaissent que dans les tissus à renouvellement rapide (épithélium, muqueuses, phanères, moelle hématopoïétique).

1.1.2. Effets chroniques ou tardifs

Ces effets correspondent à une détérioration très lente et progressive des tissus à renouvellement lent. Ils apparaissent plus de 3 à 6 mois après la fin de la radiothérapie en cause et ont souvent une tendance générale à s'aggraver. D'où les qualificatifs de « tardifs » et « chroniques » que l'on donne à ces effets.

La fibrose en est l'expression la plus fréquente, observée en clinique après des années post-radiothérapie. Ce phénomène a été étudié de manière approfondie dans les laboratoires qui ont pu élucider les mécanismes de cette transformation des tissus sains (Figure 1).

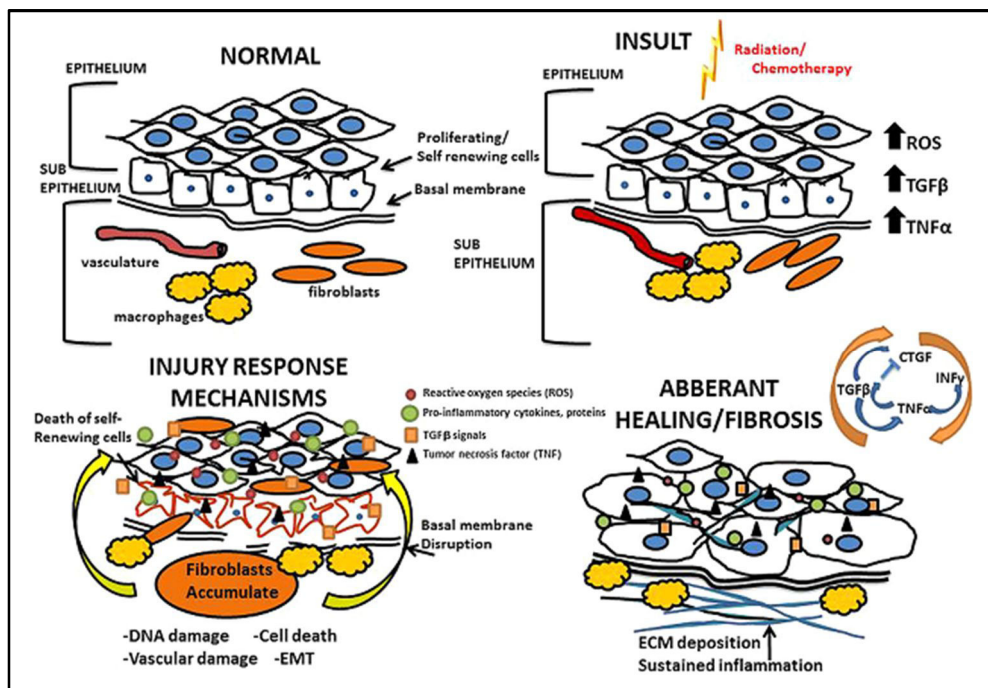


Figure 1 : Mécanisme schématique de la fibrose induite par la radiothérapie en mettant en évidence les facteurs cellulaires, vasculaires, inflammatoires profibrosants et les perturbations de la signalisation moléculaire (Mancini and Sonis 2014).

1.2. Les échelles de gravité :

1.2.1. De la difficulté de quantifier la toxicité à la réalité clinique

Dans un but d'homogénéiser la conduite thérapeutique, plusieurs échelles existent et essaient de bien décrire et codifier les effets secondaires observés.

Afin de permettre un langage commun et une compilation utile des données cliniques, une quantification des symptômes, qui reste subjective, est communément utilisée. Parmi ces échelles utilisées en radiothérapie, on cite :

- **La CTCAE* *Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0***

La CTCAE est une échelle en 5 grades (1 à 5) de description clinique:

Grade 1 : le patient n'éprouve pas de souffrance et ne nécessite pas particulièrement de prise en charge.

Grade 2 : c'est un stade modéré caractérisé par une expression non invasive locale et minimale de l'effet secondaire, nécessitant rarement une prise en charge particulière.

Grade 3 : il s'agit des lésions sévères mais n'engageant pas immédiatement le pronostic vital. Un traitement spécifique, l'hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation sont indiqués.

Grade 4 : le pronostic vital est engagé, une prise en charge urgente est indiquée.

Grade 5 : Décès lié aux effets secondaires.

- **L'échelle RTOG/EORTC****

Cette échelle est utilisée par les groupes coopérateurs de recherche clinique américains (RTOG) et européens (EORTC). Cette échelle se subdivise en 5 stades allant de la simple réaction à la mort selon le degré de gravité, très semblable dans son principe avec la CTCAE.

*(<http://www.hrc.govt.nz/sites/default/files/CTCAE>)

**<http://www.rtog.org/ResearchAssociates/AdverseEventReporting/RTOGEORTCLateRadiationMorbidityScoringSchema.aspx>

1.2.2. Exemple d'une étude concernant le foie irradié : toxicité aiguë biologique (article 1 : Correlation of dosimetric parameters with subclinical liver function test alterations after radiotherapy for upper gastrointestinal tract tumors)

Il s'agit d'une étude, qui a constitué le sujet de mon master II de physique médicale, rétrospective des patients traités par radiothérapie pour des tumeurs sus-méso colique dont le foie est un organe sain de voisinage à risque entre 2002 et 2008 traités par le même radiothérapeute à l'hôpital A. Michalon Grenoble, France.

- 167 dossiers étudiés uniquement 38 dossiers exploitables (rétrécissement de l'échantillon): sont exclues tous les patients métastatiques.
- 11 complications recensées sur 38 soit 29%!!! Traités pour des tumeurs du pancréas, de l'estomac et des voies biliaires.
- Suivi médian: 1an.
- Eléments étudiés: les Histogrammes Doses Volumes cumulatifs et différentiels, les marqueurs biologiques tumoraux, bilan biologique hépatique (ALAT/ASAT, GGT, PAL et bilirubine).
- **modèle de Lyman** est le premier modèle bio-statistique qui a permis de montrer une corrélation entre la dose-volume et la complication RLID (Radiation Liver Induced Disease).

L'hypothèse de l'existence d'une relation entre les données dosimétriques (Visodose – cumulatif isodose – différentiel, (Effectif, D référence) et le risque de complications aiguës, semi-retardées et tardives (données biologiques pour différentes dates) est testée statistiquement et fournit une base rationnelle à la corrélation de certains paramètres dosimétriques aux signes cliniques observés.

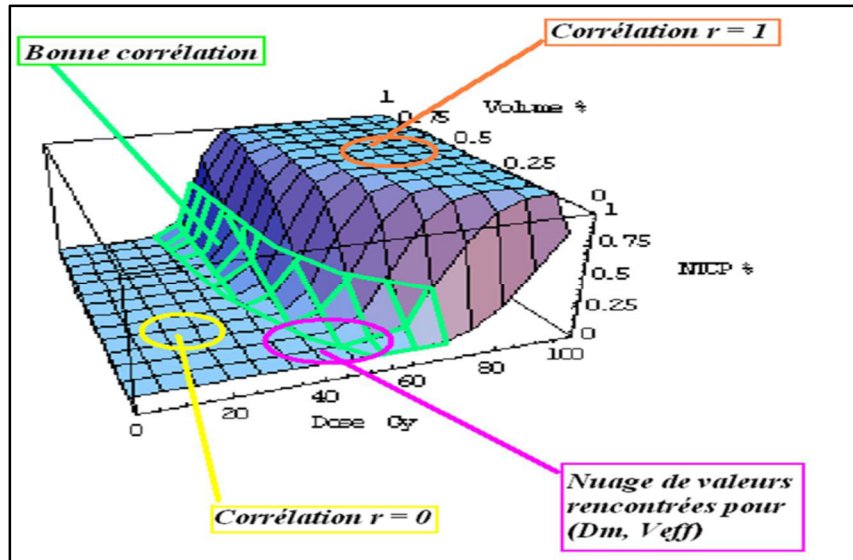


Figure 2 : le Modèle de Lyman

Les résultats de ce travail sont les suivants,

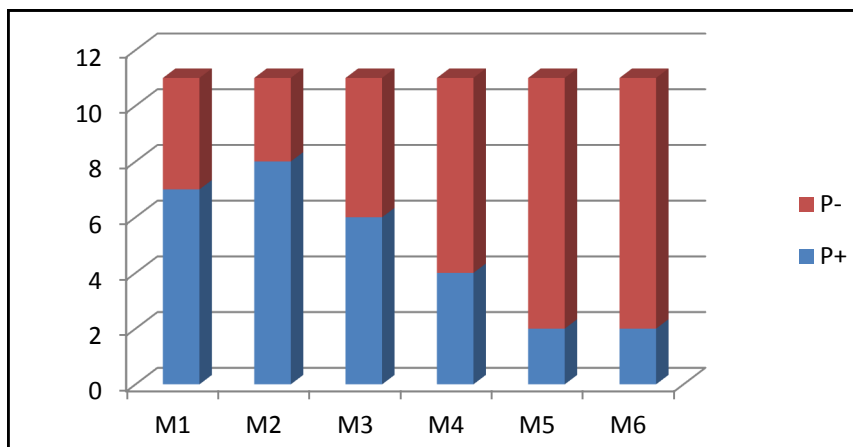


Figure 3 Normalisation de quasi-totalité des paramètres biologiques hépatiques 6 mois après la fin du traitement.

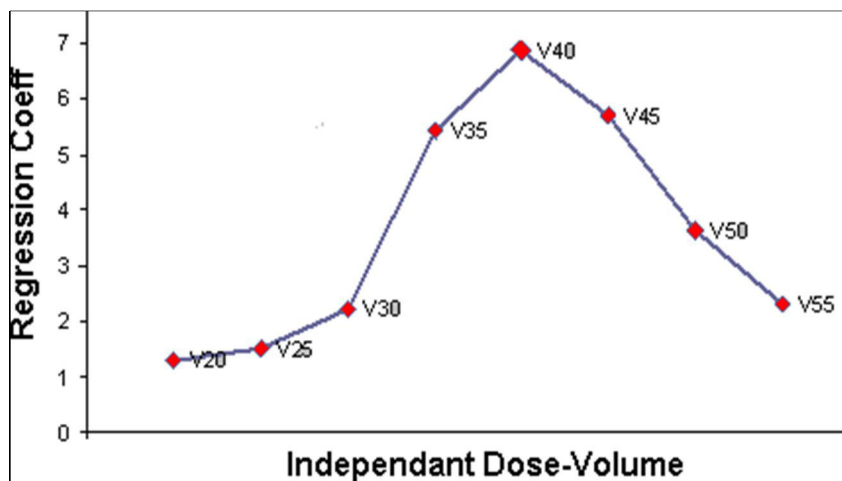


Figure 4 : L'étude statistique par régression multiple non linéaire confirme que V40 Gy est le plus responsable des troubles hépatiques conformément au modèle de Lymann.

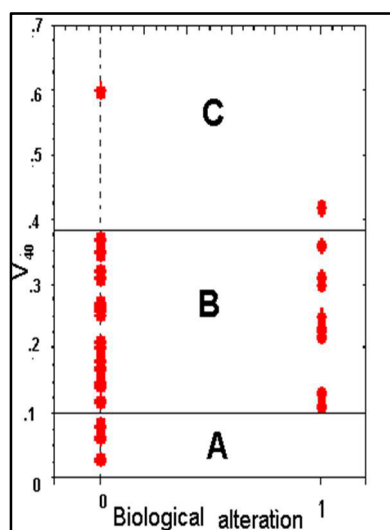


Figure 5 : Aucune altérations biologiques constatées si V40 inférieur à 10% (zone A), un tel désordre peut être attendue si V40 est supérieure à 38% (zone C). Entre ces 2 limites l'interprétation est difficile (zone B).

Critique: L'échantillon est étroit pour conclure, (manque de données cliniques) d'où une sur ou sous-estimation de la corrélation malgré un R^2 faible.

- L'ensemble des calculs a été effectué avec les paramètres fournis par le modèle de Lymann ce qui n'est pas forcément aussi proche de la réalité, d'où la nécessité de faire

un travail de réflexion avec un échantillon plus grand et de recalculer pour une population donnée les paramètres spécifiques n , m et TD50.

- le modèle sigmoïdal de la courbe des complications paraît insuffisant vu l'inhomogénéité de l'irradiation du foie d'où la nécessité de chercher un autre type de régression (logarithmique ou autre...) afin de mieux refléter la réalité.

- Aucune complication n'a pu être identifiée réellement (histologie), raison pour laquelle nous recommandons pour les cas les plus suspects d'une hépatite radique d'effectuer une biopsie hépatique systématique.

La complexité de la réponse radioinduite, la subjectivité de l'évaluation creuse un chemin qui mérite plus d'investigations pour contourner les réactions observées.

1.3. Les événements en radiothérapie, de la dosimétrie à la génétique

La radiothérapie suit un certain nombre de procédures, notamment la réalisation systématique d'une dosimétrie prévisionnelle avec détermination en 3D de la dose à la cible et aux organes à risque avoisinants. Cette dosimétrie permet notamment d'étudier et de limiter la dose aux tissus sains. Des événements indésirables inattendus peuvent cependant survenir :

- en cas de prescription erronée,
- en cas de défaillance technique dosimétrique et/ou dans la réalisation du traitement au plateau technique,
- enfin en cas d'une réponse radiobiologique individuelle anormale qui peut surprendre le prescripteur et être à l'origine d'un événement indésirable tout-à-fait inattendu.

Les événements dus à des erreurs ou des défaillances techniques sont de plus en plus rares grâce à l'assurance qualité et aux procédures de sécurité de plus en plus élaborées. La dosimétrie préalablement étudiée pour chaque patient, le repositionnement quotidien contrôlé par imagerie embarquée (EPID, IGRT), plus récemment encore la dosimétrie in vivo, font que la chaîne du traitement est de plus en plus sécurisée et la dose administrée de mieux en mieux documentée.

Le traitement par radiothérapie a connu plusieurs étapes d'évolution notamment des débuts marqués par des traitements par un faisceau de photons direct d'intensité et de calibre mal définis, puis dans les années 70 le traitement fut modernisé et passa au traitement sous le mode 2D avec des faisceaux de rayons gamma du cobalt parfaitement caractérisés et stables. Avec l'arrivée des accélérateurs linéaires, la puissance des faisceaux très pénétrants a nécessité le renforcement des capacités en dosimétrie, le traitement devient en 3 dimensions (3 D) avec des définitions standardisées internationales des volumes cibles (GTV-CTV-PTV) et des organes à risque avec des recommandations de limite de doses à ne pas franchir. Ces recommandations ont été le fruit d'un travail remarquable de compilation et de convergence mené par l'ICRU et l'AIEA.

Des propositions opérationnelles de doses limites furent données surtout, en 1987 par les travaux de Chao et al. Basés sur la modélisation NTCP des organes sains exposés aux radiations ionisantes selon le modèle de Lyman.

Parallèlement, l'analyse des résultats des essais internationaux a montré la nécessité et la possibilité d'augmenter les doses à la cible tumorale pour une meilleure efficacité. On parle alors « d'escalade de dose ». Cette escalade de dose n'est possible que si une plus grande discrimination de la dose anti-tumorale par rapport à la dose délivrée aux organes à risque est possible. Pour aboutir à ceci, depuis les années 2000, la radiothérapie est entrée dans l'ère de la modulation d'intensité (IMRT, VMAT) permettant des gradients de doses entre cible et tissus sains jusqu'alors impossibles à réaliser. Permettant plus de précision, plus de dose à la tumeur et moins d'exposition des OAR, les techniques de modulation d'intensité sont appelées à se généraliser. Elles exigent néanmoins un renforcement des compétences techniques des opérateurs et un réel souci de l'assurance qualité. Toute défaillance dans ces domaines peut rapidement conduire à des accidents voire des séries d'accidents comme ce fut le cas en France avec l'accident d'Epinal(Ash 2007, Peiffert, Simon et al. 2007, Parmentier 2008, Marchesi, Aigle et al. 2009).

La caractérisation de la vitalité des cellules exposées aux RI, l'étude des courbes de survie notamment la quantification du nombre des cassures double-brin de l'ADN (CDB) radio-induites et la modélisation de la réparation de l'ADN, puis la caractérisation génétique des acteurs moléculaires impliqués constituent des apports

importants sur lesquels se fonde la compréhension sans cesse croissante des événements biologiques en radiothérapie, notamment face à des événements indésirables graves. (Ash 2007, Peiffert, Simon et al. 2007, Parmentier 2008, Marchesi, Aigle et al. 2009

1.4. L'accident d'Épinal

L'accident survenu au centre hospitalier d'Épinal (Département des Vosges, France) est le plus grave de l'histoire de la radiothérapie en France. Il est classé niveau 6/7 sur l'échelle de gravité de l'ASN/SFRO (Autorité de sûreté nucléaire / Société française de radiothérapie oncologique). Il s'agit d'une cascade d'anomalies de fonctionnement. Un surdosage de 20 % a été enregistré chez les patients lié à une utilisation inadéquate des filtres en coin. Cet accident a concerné 24 patients traités pour cancer de la prostate entre mai 2005 et août 2006 et a eu des conséquences gravissimes (Peiffert, Simon et al. 2007). La découverte de séquelles de grades 2 à 5 selon l'échelle CTCAE 3.0 a nécessité la mise en œuvre d'une prise en charge spécifique par l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire). Une deuxième cohorte de 397 patients a reçu une dose supplémentaire de moindre importance (+10 %), en rapport avec la réalisation de contrôles quotidiens par imagerie portale sans prise en compte de cet excès de dose, expliquant un taux important de rectites de grades 2–3. La prévention d'un tel accident nécessite l'évaluation des pratiques et des compétences et une politique de formation ainsi que de contrôles internes et externes, en particulier lors de la mise en route des nouvelles techniques ou la modification de procédures critiques (Ash 2007, Peiffert, Simon et al. 2007, Parmentier 2008, Marchesi, Aigle et al. 2009, Yang, Chew et al. 2012).

Néanmoins, même dans ce cas où les doses ont dépassé les niveaux recommandés, l'analyse de l'ensemble des données cliniques permet de constater une variabilité de la gravité des conséquences dans cette cohorte de patients, c'est-à-dire que pour un même surdosage, on observe des réponses et des événements différents. Ceci évoque, comme pour la variabilité « habituelle », l'existence de facteurs individuels de sensibilité indépendants de ces événements.

1.5. Exemple du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate représente la localisation cancéreuse la plus fréquente en Europe chez l'homme de plus de 60 ans. En France on compte plus de 50.000 nouveaux cas/an et 8000 décès liés au cancer de la prostate :

Incidence et mortalité estimées des principaux cancers en France métropolitaine chez l'homme en 2012				
Localisation	Effectif- Nouveaux cas	Contribution à l'ensemble des cancers	Effectif-décès	Contribution à l'ensemble des décès par cancers
PROSTATE*	53 465	26.7	8 876	10.4
Colon-rectum	23 226	11.6	9 275	10.9
Poumon	28 211	14.1	21 326	25.0
Vessie	9 549	4.8	3 574	4.2
Pancréas	5 963	3.0	nd	nd
Rein	7 781	3.9	2 651	3.1
Lèvre-bouche-pharynx	8 033	4.0	2 465	2.9
Mélanome cutané	5 429	2.7	954	1.1
Foie	6 867	3.4	nd	nd
Thyroïde	2 324	1.2	145	0.2
Estomac	4 308	2.2	2 834	3.3
Système nerveux central	2 814	1.4	1 761	2.1
Œsophage	3 503	1.7	2 653	3.1
Larynx	2 821	1.4	783	0.9
Testicules	2 317	1.2	85	0.1
Tous cancers**	200 350	100.0	85 255	100.0

* : compte tenu des fluctuations récentes de l'incidence du cancer de la prostate les résultats postérieurs à la dernière année observée par les registres (2009) ne sont pas présentés.

** : somme des estimations par localisation en supposant une stabilité des taux d'incidence pour la prostate entre 2009 et 2012 et en ajoutant les estimations pour les hémopathies malignes et la localisation Autres cancers

nd : nondéterminé; Les données de mortalité des cancers du foie et du pancréas ne sont pas présentées du fait d'une moindre fiabilité de ces données par rapport aux autres localisations

Tableau II: Incidence et mortalité estimées des principaux cancers en France métropolitaine chez l'homme en 2012.

Sources : Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012.Partiel-
Tumeurs solides Traitement : INCa 2013

Généralement, le diagnostic est posé précocement au stade de maladie confinée à l'organe. La prostatectomie radicale ou la radiothérapie externe +/- hormonothérapie représentent les principaux traitements de ce cancer (Yang, Chew et al. 2012).

L'escalade de dose pour cette tumeur a été remarquablement convaincante et a prouvé son intérêt dans l'amélioration du contrôle biochimique et l'amélioration du taux de guérison avec une toxicité acceptable en utilisant des techniques de radiothérapie contemporaines.

La radiothérapie externe (EBRT) est devenue le traitement le plus employé. Une dose totale délivrée à la prostate de 74-78 Gy avec fractionnement et étalement classique (2Gy/fraction, 5 fractions par semaine, 8 semaines) est le schéma le plus adopté dans cette situation (Zietman, Bae et al. 2010, Jemal, Bray et al. 2011).

La rectite radique constitue l'une des complications redoutables de ce traitement, allant de la simple symptomatologie rectale, type ténesme, aux saignements de grande abondance avec anémie secondaire.

Le respect, dans la prescription, des recommandations des doses administrées aux organes à risque permet au mieux, chez un patient de radiosensibilité « normale », d'éviter ce type de complication. Néanmoins, malgré toutes les précautions, il peut encore exister des conditions qui peuvent provoquer des rectites radiques à des degrés divers telles que les variations et les incertitudes de la position antéro-postérieure de la paroi antérieure du rectum (dilatation de l'ampoule rectale) et les incertitudes dans le repositionnement quotidien du patient, ou plutôt de la cible, sur la table de traitement (Withers 1985). Cependant le traitement du cancer de la prostate connaît plus d'efficacité et moins d'évènements indésirables inattendus. Ceci devrait donc permettre de mieux distinguer et de mieux prendre en compte les phénomènes d'hyper radiosensibilité liée à des facteurs individuels.

Le traitement à une dose par fraction de 2 Gy/j s'est montré satisfaisant jusqu'à présent dans la mesure où son usage depuis de nombreuses années a permis la réalisation de l'escalade de dose évoquée précédemment avec succès et sécurité. Il représente un bon compromis entre la réparation des CDB qui est inversement proportionnelle à la dose par fraction et favorise les tissus sains, et la sensibilité de la tumeur et sa tendance à la repopulation favorisée par l'étalement plus ou moins long selon le fractionnement.

Pour des raisons de confort ou d'économie face à la durée du traitement par EBRT sur 7 à 8 semaines ou d'éloignement des centres de radiothérapie, la possibilité de réaliser des traitements hypo fractionnés est très sérieusement étudiée et connaît des applications dans certains centres pionniers notamment sous forme d'études prospectives contrôlées. La radiothérapie hypo fractionnée (en fractions de 2.1 à 3.5 Gy, cinq jours par semaine, pendant environ quatre semaines) a ainsi gagné un intérêt considérable au cours des dernières années. Elle semble particulièrement bien adaptée au cancer de la prostate dans la mesure où le rapport α/β de la tumeur, proche de 1.5 est plus faible que celui des organes à risque, environ 2 (Teh, Dong et al. 2005).

Ainsi, l'augmentation de la dose par fraction aura un effet plus considérable sur la tumeur que sur les tissus sains, augmentant ainsi l'effet différentiel. A noter que cette situation est assez exceptionnelle en cancérologie-radiothérapie.

La radiothérapie stéréotaxique (SBRT, en fractions de 3,5 à 15,0 Gy, cinq jours par semaine, pendant environ deux semaines) a aussi fait récemment l'objet de recherches en raison des améliorations techniques, comme la radiothérapie en conditions stéréotaxiques, qui ont rendu possible l'administration de fractions encore plus grandes (Fowler, Toma-Dasu et al. 2013).

Thames (Khadige, Peiffert et al. 2014), Withers et Fowler ont largement étudié l'influence de la dose par fraction sur la réponse cellulaire. Leurs études pionnières ont montré que la dose iso-effective augmente plus rapidement avec la diminution de la dose par fraction pour les effets tardifs que pour les effets précoces, ce qui indique une plus grande sensibilité des réponses tardives aux changements de dose par fraction. La relation entre la dose totale iso-effective et la dose par fraction, de radiothérapie fractionnée, peut être décrite en utilisant le modèle de survie cellulaire linéaire-quadratique (LQ) (Thames, Ang et al. 1988), qui est le modèle standard pour le calcul classique des équivalences de dose en cas de fractionnement modifié (Jemal, Bray et al. 2011). À l'heure actuelle, il est fortement recommandé de recourir systématiquement au modèle LQ évidemment avec les ratio α/β correctement choisis, pour décrire la relation entre dose totale et des doses par fraction pour les fractions comprises entre 1 et 5 Gy (Withers 1985, Teh, Dong et al. 2005, Zietman, Bae et al. 2010). Le regain d'intérêt pour l'hypofractionnement et le développement des radiothérapies stéréotaxiques a soulevé le problème de la nécessité d'adapter le modèle LQ à des doses plus élevées par fraction car cliniquement le modèle LQ sous-estime souvent, dans ces conditions, le

contrôle de la tumeur (Rosser, Levy et al. 2003). Toutefois, les travaux récents concluent que les données disponibles ne permettent pas forcément d'adapter le modèle LQ aux fortes doses par fraction, même si le rapport α/β est choisi de manière appropriée (Zietman, Bae et al. 2010, Valicenti, Bae et al. 2011). Il semble que la différence de relation dose-réponse est due à la répartition différente des cellules à travers le cycle car la radiosensibilité d'une population de cellules varie en fonction de cette distribution (Fowler, Toma-Dasu et al. 2013).

1.6. Médication incidentalum

Presque tous les patients, particulièrement, ceux qui sont traités pour un cancer de la prostate sont d'un âge supérieur à 60 ans et ils présentent fréquemment des comorbidités multiples faisant administrer souvent, et entre autres, un traitement hypocholestérolémiant, dont des statines. Les bisphosphonates, médication de l'ostéoporose et des remaniements osseux néoplasiques sont moins fréquemment prescrits. Dans ce chapitre on va détailler les effets biologiques et radio-biologiques des statines et des bisphosphonates et leurs rôles.

1.6.1. Les statines

Il s'agit de la famille la plus utilisée de médicaments hypolipémiants efficaces par leur action sur le cycle de la biosynthèse du cholestérol. Leur utilisation est très répandue vu leur innocuité (peu d'effets secondaires) et leur efficacité.

Les statines sont administrées sous forme inactive (lactone) puis métabolisées au niveau du foie par le cytochrome P450 en forme active (acide hydroxylé) (Davidson 2000, Khadige, Peiffert et al. 2014). La forme inactive (lactone) présente une fonction modulatrice du proteasome (Cohen, van Leeuwen et al. 2000).

L'acétyl CoA est le substrat de base de la production du cholestérol par l'intermédiaire d'une cascade de réactions dont le chef de file est le 3 hydroxy 3 méthyl glutamyl CoA qui, sous l'effet de l'enzyme *HMG-CoA réductase*, se transforme en acide mévalonique. Les statines, inhibiteurs compétitifs de l'*HMG-CoA réductase*, inhibent cette étape et bloquent ainsi la production du cholestérol.

1.6.1.1. Effets sur le bilan lipidique

Le cholestérol est un composé hydrophobe, insoluble dans le sang. Son transport est assuré par des particules appelées lipoprotéines comme les VLDL, LDL, HDL.

Les statines agissent principalement au niveau du foie. Elles accroissent d'une part, le nombre de récepteurs de LDL à la surface des hépatocytes et augmentent la captation du LDL cholestérol, renforçant ainsi son catabolisme et inhibant la synthèse des VLDL. Le but final est de réduire le nombre de particules de VLDL et LDL, chargées en cholestérol, circulant dans le sang.

Le métabolisme de chaque produit lui est propre et est un paramètre important de la posologie. L'absorption digestive est rapide après un effet de premier passage hépatique, l'élimination est biliaire, et la demi-vie d'élimination est de 24 heures en moyenne.

1.6.1.2. Effets indésirables

Les statines sont très bien tolérées, néanmoins il existe des toxicités musculaires et hépatiques dont l'expression est corrélée à la dose et à la molécule.

- atteinte musculaire : myalgies, crampes, rhabdomyolyse.
- troubles digestifs, diarrhées, flatulence
- asthénie
- insomnie
- rarement céphalées ou une réaction d'hypersensibilité type angio-œdème, urticaire.
- moins fréquent : Paresthésies, neuropathie périphérique, pancréatite, ictère, hépatite, hyper- ou hypoglycémie, thrombopénie.
- anorexie, vomissements.
- réactions cutanées, prurit, rash, photosensibilisation, alopécies.
- impuissance.
- élévation des transaminases et/ou des enzymes musculaires.

1.6.1.3. Contre-indications

- Absolues :

- insuffisance hépatique, ou atteinte hépatique grave,
- myopathie familiale,
- grossesse et allaitement
- hypersensibilité à l'un des constituants,
- une hypothyroïdie,

- Relatives :

- insuffisance rénale sévère, selon les molécules.
- myopathie.
- association avec un fibrate

1.6.1.4. Statines et réponse à l'irradiation:

Outre leur action hypolipémiante, les statines ont des actions complexes sur les voies de signalisation intracellulaires et ont ainsi de multiples effets sur les mécanismes anti prolifératifs et sur les réactions radio induites. Ces actions passant notamment par une modification de la farnésylation, ne sont pas pharmacologiquement optimisées, et sont complexes à mettre en évidence.

- La farnésylation (Rao, Porter et al. 1999) :

La voie de signalisation transmembranaire des cellules fait intervenir plusieurs acteurs, notamment certains qui nécessitent d'être accrochés à la face interne de la membrane cellulaire par l'ajout d'un radical hydrophobe par une farnésyl transférase. Cette modification s'appelle la farnésylation.

Les inhibiteurs de la farnésyl transférase (des agents thérapeutiques anti-Ras) sont utilisés en tant que thérapies ciblées associées ou pas à la radiothérapie de certaines tumeurs solides. Les statines, bien que n'étant pas utilisées en oncologie ont un effet inhibiteur sur la farnésylation (voir Figure 2).

Ce type d'action permettrait une réduction du stress oxydatif.

- Action sur la réponse radio induite :
 - **Les statines (lovastatine)** atténuent la réponse des tissus sains irradiés par diminution des agents pro-inflammatoires et de la fibrose. La lovastatine n'affecte pas la voie de réparation de l'ADN par H2AX (Efu et al. 2006).
 - **Les statines** ont été identifiées en tant qu'inducteurs synergiques de la voie d'**apoptose** ou de la mort cellulaire dans le cadre du cancer de la prostate après irradiation (Ostrau, Hulsenbeck et al. 2009).

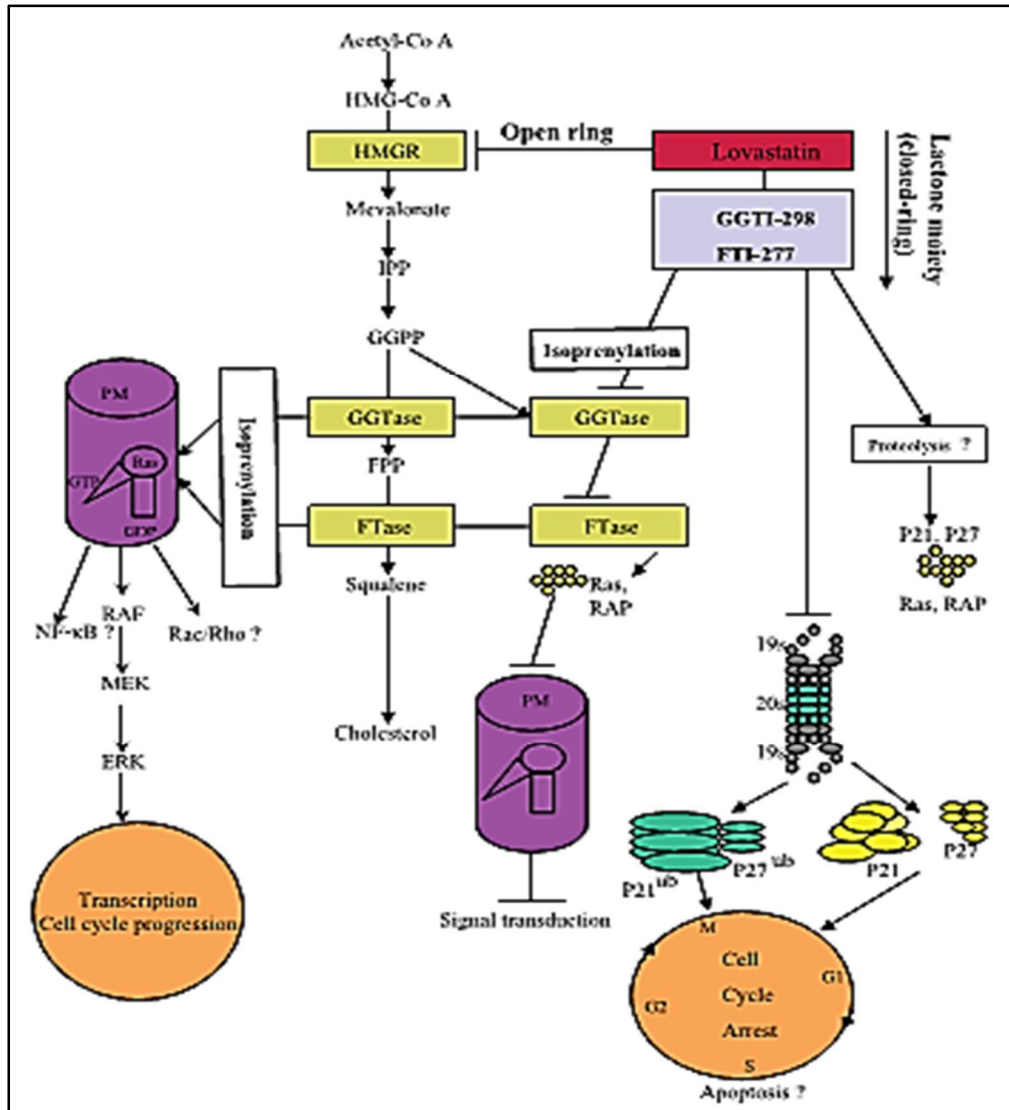


Figure 6 : Exemple d'un modèle d'inhibition du protéasome par anti-farnesylation (He, Mangala et al. 2012)

- Les statines sont décrites comme protectrices de l'endothélium vasculaire contre les effets radio-induits (Efu et Keyomarsi 2006).
- Récemment, a été fournie la preuve que l'inhibition de la prénylation de la progerine grâce à la pravastatine et au zolétronate (ZoPra) améliore le nucleoshuttling du gène ATM (Nubel, Damrot et al. 2006); (Varela, Pereira et al. 2008).

1.6.1.5. Action anti-tumorale des Statines

Plusieurs voies sont explorées pour une validation de certaines actions anti tumorales des statines. Les effets collatéraux des statines semblent toucher à tous les niveaux de la cancérogénèse. La plupart de ces effets ont été observés chez les animaux (Figure 3).

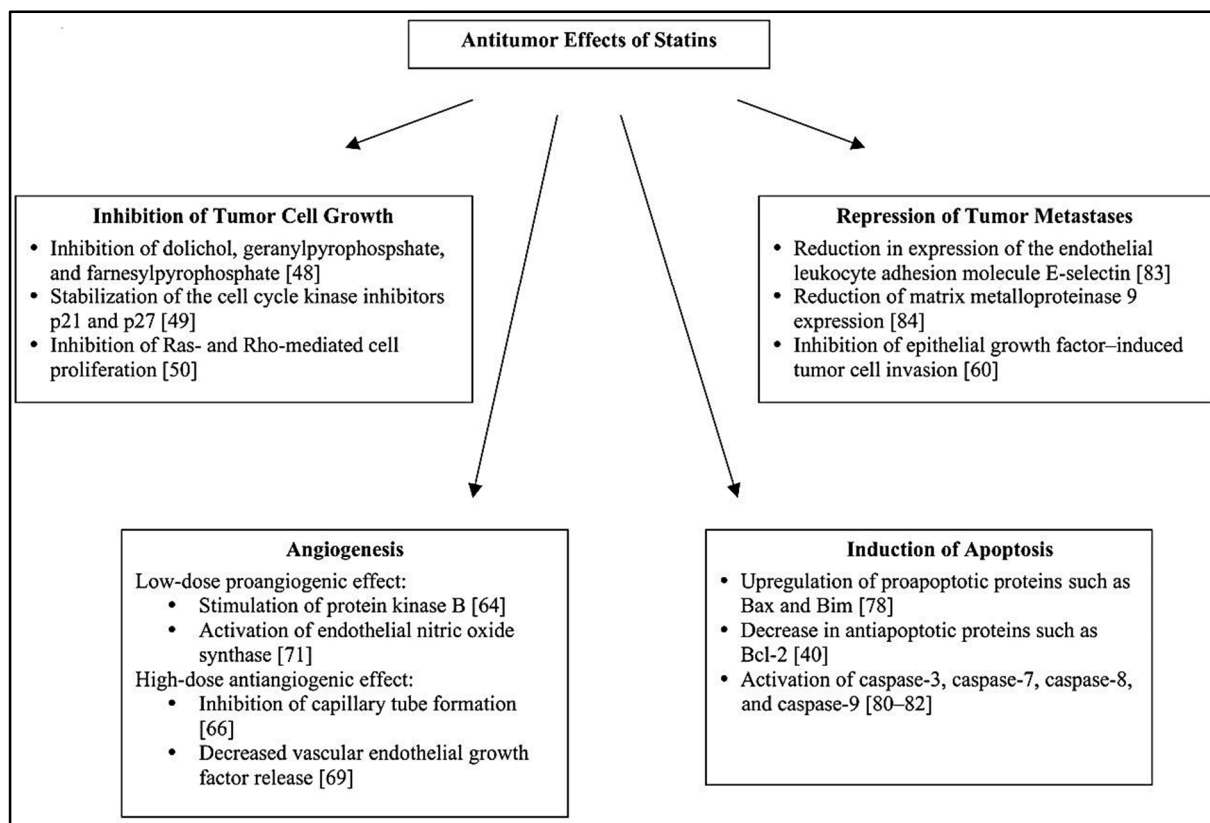


Figure 7: Mécanismes d'action anti-tumoraux des statines (Gordon, Massaro et al. 2014)

- Sur un modèle murin, de paragangliome, les statines pourraient être une option thérapeutique par l'inhibition des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ceci induit l'apoptose et une inhibition de la dissémination tumorale (Hindler, Cleeland et al. 2006).

1.6.1.6. Les statines et cancers

Les statines sont l'objet d'une controverse à propos de savoir si elles peuvent être un facteur de risque de cancer ou si elles peuvent avoir un effet radioprotecteur. La majorité des études a exclu que les statines soient à l'origine de cancers mais leurs interactions et effets alternatifs à leur indication de base sont nombreuses et diverses notamment en oncologie. Dans ce chapitre, outre la question du lien avec le cancer, on détaille uniquement les sujets relatifs aux

effets des statines se traduisant par une atténuation des effets secondaires que ce soient ceux de la chimiothérapie et ou de la radiothérapie :

- Statines facteur de risque de cancers ?

Plusieurs études plaident en faveur de l'absence de relation entre cancer et utilisation des statines voire au contraire en faveur d'une réduction du risque de cancer. Une étude récemment publiée sur l'utilisation prolongée de ce médicament, rapporte une réduction statistiquement significative de 34% du risque de cancer pancréatique chez les hommes (Fliedner, Engel et al. 2014) ; de même dans une grande cohorte 71000 patients atteints d'hépatite B où a été évaluée l'implication des statines (associées ou non à la Metformine) dans la réduction du risque du cancer hépatique, un effet protecteur significatif a été trouvé (Walker, Ko et al. 2015).

Sans pouvoir considérer ce sujet comme définitivement clos, ces éléments sont plutôt rassurants et ont plutôt tendance à écarter un effet carcinogène de ces molécules voire au contraire évoquer un effet protecteur qui mériterait d'être approfondi.

- Statines et traitements anti-néoplasiques :
 - Statines et FEVG (fraction d'éjection ventriculaire gauche) au cours d'une chimiothérapie par les anthracyclines. Les anthracyclines sont très cardiotoxiques, ce qui limite leur utilisation à des doses cumulatives limitées. Leur toxicité se manifeste par une baisse de la fraction d'éjection du ventricule gauche. Une récente étude a confirmé que l'utilisation des statines a un effet cardio-protecteur dans cette population avec des données statistiquement significatives bien que la différence soit faible (Chen, Kuan et al. 2015) . En effet l'utilisation des statines réduit le risque d'environ 6.5% ($p = 0.003$).
 - Dans le cancer de la prostate, les effets possibles de l'utilisation des statines pendant et/ou après radiothérapie restent controversés. Dans une étude récente sur 3800 patients au Canada, l'utilisation des statines n'a pas eu d'impact sur la survie spécifique, mais un éventuel effet sur la tolérance de la radiothérapie n'a pas été étudié (Chotenimitkhun, D'Agostino et al. 2014).

1.6.2. Exemple d'une étude de l'impact de la prise de statine sur la tolérance à l'irradiation (article 6).

Dans ces dernières années les études ont évoqué à plusieurs reprises le rôle des hypocholestérolémiantes dans le diagnostic et le pronostic du cancer de la prostate. Une étude récente a montré l'impact des statines sur la récurrence biochimique du cancer de la prostate après prostatectomie radicale (Caon, Paquette et al. 2014). In vitro les statines sont des modulateurs de la réparation des CDB de l'ADN, notamment par leur effet sur la translocation de la protéine ATM au niveau du noyau (Ritch, Hruby et al. 2011) (Joubert, Zimmerman et al. 2008) (Sarkaria, Bush et al. 1998) (Granzotto, Joubert et al. 2011).

In vivo, l'étude sur un modèle murin a montré que les inhibiteurs de la HMG-CoA (comme une statine, par exemple) atténuent la probabilité d'endommagement des tissus sains (NTCP) après irradiation (Alexander and Walker 2010) (Joubert, Zimmerman et al. 2008).

Des études ont analysé l'effet des statines sur le risque de cancer de la prostate (Sarkaria, Bush et al. 1998) (Agalliu, Salinas et al. 2008, Haukka, Sankila et al. 2010). En ce qui concerne le pronostic, l'usage des statines semble associé avec un cancer de la prostate moins agressif (Katz, Carroll et al. 2010).

Aucune étude de l'influence d'une prise de statine sur la radiosensibilité humaine n'a été effectuée à ce jour.

Dans le cadre de ce travail nous avons mené une étude sur une petite cohorte de 66 patients traités par RT 3D pour des cancers de la prostate. Cette étude sera détaillée plus loin dans cette thèse. Nous avons conclu que les statines, comme on peut s'y attendre, n'augmentent en aucun cas la rectite post radique mais en diminuent possiblement la sévérité (voir chapitre RESULTATS).

1.6.3. Les bisphosphonates

Les bisphosphonates sont des médicaments indiqués dans certaines formes d'ostéoporose et dans les métastases osseuses de toutes origines.

1.6.3.1. Aspects moléculaires et mécanismes d'action

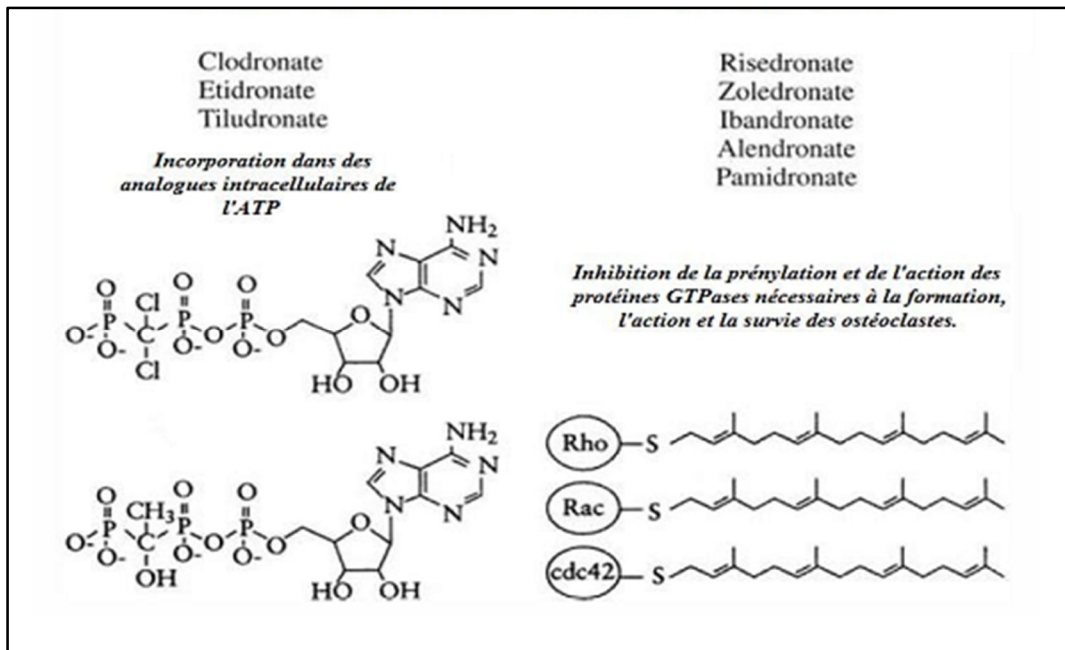


Figure 8: Mécanisme d'action des bisphosphonates (Alizadeh, Sylvestre et al. 2012).

Mode d'action anti tumoral des Bisphosphonates :

Les bisphosphonates, qui ont été, au début, essentiellement développés pour lutter contre les métastases ostéolytiques grâce à leur grande affinité pour les ions calcium, produisent une liaison rapide avec la matrice minéralisée de l'os, puis quand les ostéoclastes résorbent l'os, il y a une endocytose des produits de l'os et des bisphosphonates qui représentent des métabolites cytotoxiques. Après l'endocytose par l'ostéoclaste, il y a une perte de fonction et apoptose de l'ostéoclaste par blocage de l'ATPase.

Par ailleurs ils stimulent l'ostéogénèse par activation des ostéoblastes et inhibition des ostéoclastes (en inhibant l'enzyme farnésyl-pyrophosphate synthétase), inversant ainsi le mécanisme princeps des métastases osseuses notamment dans le modèle premium étudié : les métastases d'origine prostatique (Russell 2006).

La classe de ces molécules s'est constamment élargie depuis 40 ans et la classe des bisphosphonates aminés présentent des mécanismes anti-tumoraux bien plus diversifiés qui peuvent expliquer leurs actions sur la régulation des mécanismes de la réparation de l'ADN.

Ainsi les bisphosphonates contenant de l'azote agissent au niveau intracellulaire en inhibant la farnésyl diphosphate synthase, une enzyme de la voie du mévalonate, ce qui empêche la prénylation de petites protéines GTPase nécessaires à la fonction cellulaire normale de

signalisation. L'inhibition de la farnésyl diphosphate synthase semble également rendre compte de leurs effets anti-tumoraux observés *in vitro* et notamment leur capacité d'activation des cellules $T\gamma\delta$, ce qui correspond à une caractéristique de la réponse précoce à un traitement par N-bisphosphonate chez l'homme (Cleazardin, Gligorov et al. 2000).

Le bilan des actions des bisphosphonates est ainsi assez large : apaisement de la douleur osseuse, réduction de la destruction osseuse et de la croissance tumorale intra osseuse ; inhibition des facteurs de croissance endothéliaux réduisant la néo vascularisation.

Ils peuvent agir directement sur les cellules tumorales en bloquant l'adhésion, l'invasion et la prolifération des cellules tumorales et ils induisent l'apoptose de ces cellules. Des études (réalisées pour la plupart avec le zolédronate) montrent que les bisphosphonates ont une activité antitumorale *in vivo*. Les bisphosphonates interfèrent avec la croissance de tumeurs et de métastases qui se développent dans des tissus autres que le tissu osseux. L'importance de ces résultats expérimentaux est discutée à la lumière de différents essais cliniques en cours qui évaluent les bénéfices du zolédronate et d'autres bisphosphonates en situation adjuvante dans le traitement des cancers à un stade précoce de la maladie.

Cependant leur biodisponibilité est médiocre car ils présentent un fort tropisme osseux qui participe certainement à limiter leur activité anti tumorale *in vivo*. (Roelofs, Thompson et al. 2006)

✓ *Les bisphosphonates sont donc classées en 2 catégories :*

- *les bisphosphonates non aminés* ou « *bisphosphonates simples* » de 1ère génération sans atome d'azote. Tels que le clodronate, l'étidronate et le tiludronate.
- *les bisphosphonates aminés*, ou amino-bisphosphonates, la molécule contient dans sa partie du radical R2 un atome d'azote. Qui peut être soit une amine primaire, groupement alkyl, comme l'alendronate ou le pamidronate, ou une amine secondaire, comme l'ibandronate, ou une amine tertiaire incluse dans une structure hétérocyclique, tel que le risédronate et le zolédronate. La molécule a une activité beaucoup plus importante lorsqu'un azote est fixé sur un cycle.

✓ Les bisphosphonates ont été classés en fonction de la chaîne latérale de la molécule et on distingue 3 générations :

- La première génération possède des chaînes latérales alkyles: le clodronate, l'etidronate et le tiludronate ;
- la seconde génération comprend les amino-bisphosphonates avec une chaîne latérale amino-terminal: le pamidronate et l'alendronate
- la troisième génération possède une chaîne latérale cyclique : zolédronate, le risédronate et l'ibandronate.

1.6.3.2. Pharmacocinétique (Holmberg, Lerner et al. 2010, Hasan, Schumacher et al. 2014)

Les bisphosphonates sont absorbés, accumulés et excrétés du corps tout en restant inaltérés. En effet, le pont P-C-P est stable à haute température et face à de nombreux agents chimiques. Il est résistant à une hydrolyse enzymatique. Ces molécules sont généralement bien tolérées, mais ont une mauvaise absorption digestive ce qui implique une prise strictement à jeun mais ceci peut entraîner une irritation de la muqueuse digestive, en particulier œsophagienne..

- ✓ Modes d'administration : Les bisphosphonates peuvent être administrés par:
 - voie orale pour les affections bénignes, (ostéoporose, maladie de Paget...)
 - voie intraveineuse pour les affections malignes, (myélome multiple, hypercalcémie maligne...)

Les bisphosphonates azotés ont un potentiel d'action sur les ostéoclastes 1000 à 10.000 fois plus important que l'etidronate, bisphosphonate non azoté pris pour base de référence.
- ✓ L'absorption intestinale des bisphosphonates oraux est très limitée. Leur biodisponibilité varie de 1 à 5 %. L'absorption se fait par diffusion passive, peut être perturbée par les aliments notamment s'ils contiennent du calcium. Les bisphosphonates oraux doivent être administrés à jeun, à distance des repas, avec de l'eau. L'administration par voie intraveineuse assure une meilleure biodisponibilité (40 à 61%).
- ✓ La demi-vie plasmatique est de quelques heures, la demi-vie osseuse est de plusieurs années. L'élimination se fait par voie rénale. 20 à 80 % des bisphosphonates absorbés se dirige vers l'os. Environ 50 % sont stockés dans le tissu osseux.

- ✓ L'élimination est urinaire en 6 heures, elle se fait au niveau glomérulaire et tubulaire. En cas d'insuffisance rénale, une adaptation de la dose administrée au taux de la clearance de la créatinine s'impose.

1.6.4.3. Indications

Pathologies bénignes

- ✓ Ostéoporose post ménopausique
- ✓ Maladie de Paget
- ✓ Ostéogenèse imparfaite
- ✓ Nécrose aseptique de la hanche
- ✓ Ostéoporose cortico-induite

Pathologies malignes

- ✓ Myélome
- ✓ Métastases osseuses ostéolytiques
- ✓ Hypercalcémie malignes dans le cadre des hémopathies malignes
- ✓ Hypercalcémie maligne secondaire aux métastases osseuses
- ✓ En association avec les anti-aromatases (effet de potentialisation)

DCI	Nom commercial	Voie d'administration	Puissance	Indications
<i>Bisphosphonates première génération</i>				
Étidronate	Didronel®	Per os	1	Ostéoporose
Clodronate	Clastoban®	Per os/i.v.	10	Oncohématologie
	Lytos®	Per os	10	Oncohématologie
Tiludronate	Skélid®	Per os	10	Maladie de Paget
<i>Bisphosphonates deuxième génération</i>				
Pamidronate	Pamidronate®	i.v.	100	Oncohématologie, maladie de Paget
Alendronate	Fasamax®	Per os/i.v.	1 000	Ostéoporose
	Fosavance®	Per os	1 000	Ostéoporose
<i>Bisphosphonates troisième génération</i>				
Risédrionate	Actonel®	Per os	5 000	Ostéoporose, maladie de Paget
Ibandronate	Bonviva®	Per os/i.v.	10 000	Ostéoporose
	Bondronat®	i.v.	10 000	Oncohématologie
Zolédronate	Zometa®	i.v. (1 injection/mois)	20 000	Oncohématologie
	Aclasta®	i.v. (1 injection/an)	20 000	Ostéoporose, maladie de Paget

DCI : dénomination commune internationale ; i.v. : intraveineux.

Tableau III: Les principaux bisphosphonates et leurs indications.

1.6.4.4. Contre-indications

- insuffisance rénale sévère
- hypersensibilité à l'un des composants du produit
- ostéonécrose
- **Grossesse / allaitement**
- **hypocalcémie**

1.6.4.5. Effets secondaires

- l'inflammation oculaire,
- l'irritation gastrique et gingivale.
- L'effet secondaire le plus redoutable étant la nécrose des os maxillaires (Cavanna, Berte et al. 2007, Garcia Saenz, Lopez Tarruella et al. 2007, Kumar, Meru et al. 2008, Rattin, Vanoli et al. 2008, Miyakoshi 2014) nécessitant des précautions particulières notamment de réaliser des soins dentaires avant tout traitement. La prise en charge des ostéonécroses secondaires à l'utilisation des bisphosphonates est complexe et doit être multidisciplinaire. Elle peut faire appel à une chirurgie, un traitement par des antifibrosant (pentoxifilline + la vitamine E), etc.
- Ce traitement pourrait induire une fragilité osseuse et/ou les douleurs osseuses.

1.6.4.6. Bisphosphonates et cancer de la prostate :

La plus grande crainte dans le cancer de la prostate est la dissémination hémato-gène de la tumeur au niveau osseux. Cette situation est fréquente. Dans la prise en charge en radiothérapie, le clinicien est de plus en plus confronté à une situation oligométastatique, qui nécessite à la fois d'irradier la prostate, le pelvis et un ou plusieurs sites métastatiques (Ripamonti, Maniezzo et al. 2009).

Les bisphosphonates, notamment l'acide Zolédronique est un traitement systémique de référence des métastases osseuses du cancer de la prostate (Ahmed, Barney et al. 2012). Associé ou non à la privation androgénique, l'action recherchée est le blocage de l'ostéolyse induite par les cellules métastatiques. Les bisphosphonates sont indispensables dans cette phase de prise en charge.

Certains auteurs proposent une indication prophylactique des bisphosphonates en situation non métastatique mais à haut risque (Suzuki, Kamiya et al. 2010) ce qui n'est pas validé à ce jour.

2. Éléments de radiobiologie - Interaction des rayonnements ionisants avec la matière vivante

2.1 Rappels des bases structurales de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) représente le support de l'information génétique chez la plupart des organismes vivants. L'ADN est une macromolécule complexe localisée dans le compartiment nucléaire (génome nucléaire) ainsi que dans les mitochondries (génome mitochondrial). Il s'agit d'une double hélice formée par deux brins complémentaires et antiparallèles. Ces derniers sont formés de la polymérisation d'unités de base de l'ADN, les désoxyribonucléotides, associés par des liaisons phosphodiester (Figure 5). Un nucléotide résulte d'une liaison ester entre un nucléoside (base azotée + désoxyribose) et un groupement phosphate.

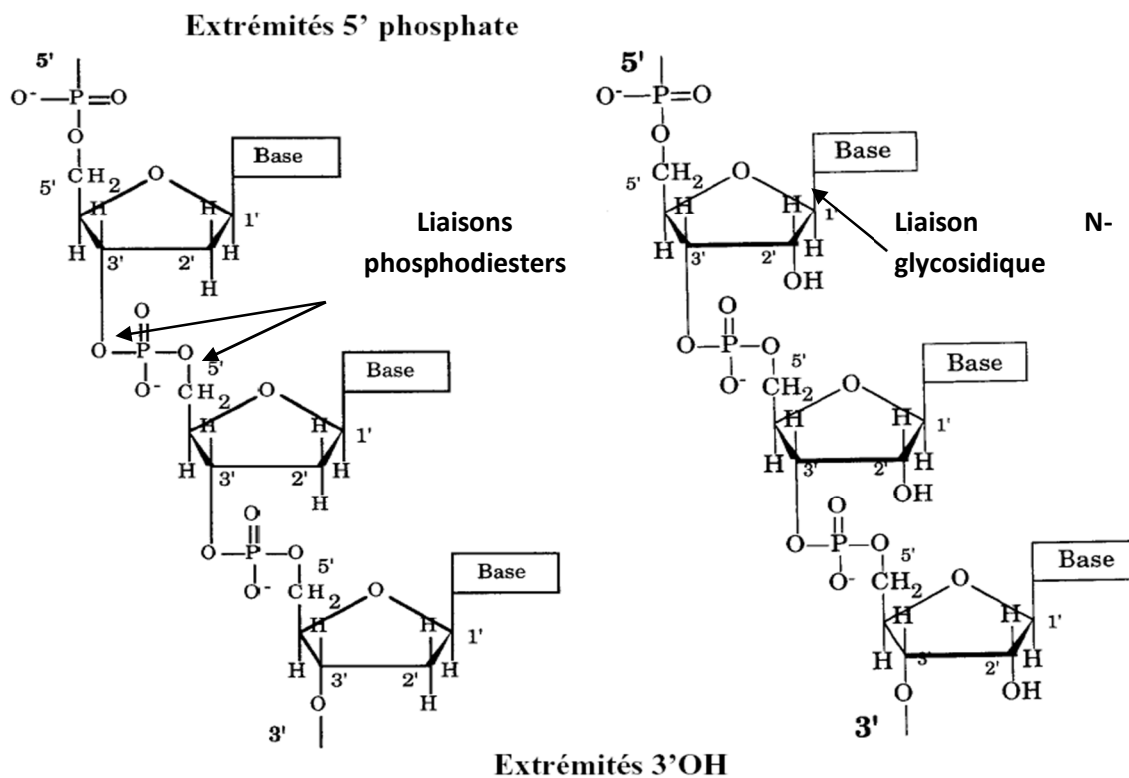


Figure 9 : A gauche : structure d'un fragment d'une chaîne d'ADN.

A droite : structure d'un fragment d'une chaîne d'ARN

Les bases azotées constituant l'ADN sont des hétérocycles aromatiques subdivisés en purines ou bases puriques (adénine (A), guanine (G)) et en pyrimidines ou bases pyrimidiques (cytosine (C) et thymine (T)). Ces quatre bases forment l'alphabet de l'ADN grâce auquel le message génomique est inscrit et stocké. Les bases sont empilées à l'intérieur de la double hélice et leur plan est perpendiculaire à l'axe de la double hélice. L'appariement de deux brins d'ADN est assuré grâce à la complémentarité entre les bases assurée par des liaisons hydrogène : deux liaisons reliant A à T (A=T) et trois entre G et C (G≡C). Les liaisons hydrogène sont de faible énergie et la dissociation des deux brins d'ADN peut être assurée soit par un traitement thermique ou chimique (ph alcalin) relativement ménagé.

Sur le plan structural et selon la séquence et la concentration ionique du milieu, l'ADN peut prendre différentes formes hélicoïdales : A, B, et Z. L'ADN, y compris l'ADN humain, prend le plus souvent la forme B ayant les caractéristiques suivantes :

- 10 paires de bases par tour d'hélice.
- Un tour d'hélice mesure 3,4 nm de pas.
- Le diamètre de l'hélice est égal à 2 nm.
- Les brins antiparallèles délimitent deux sillons de taille inégale : un sillon majeur (profond et large) et un sillon mineur (étroit et peu profond). Ces sillons sont les lieux de liaison des protéines avec l'ADN qui peuvent être des liaisons spécifiques (liaisons hydrogène) ou non spécifiques (interactions de van der Waals et électrostatiques générales). En effet, les interactions ADN-protéine sont des processus essentiels à la vie cellulaire (activation ou répression de la transcription, réplication et réparation de l'ADN) (Figure 6).

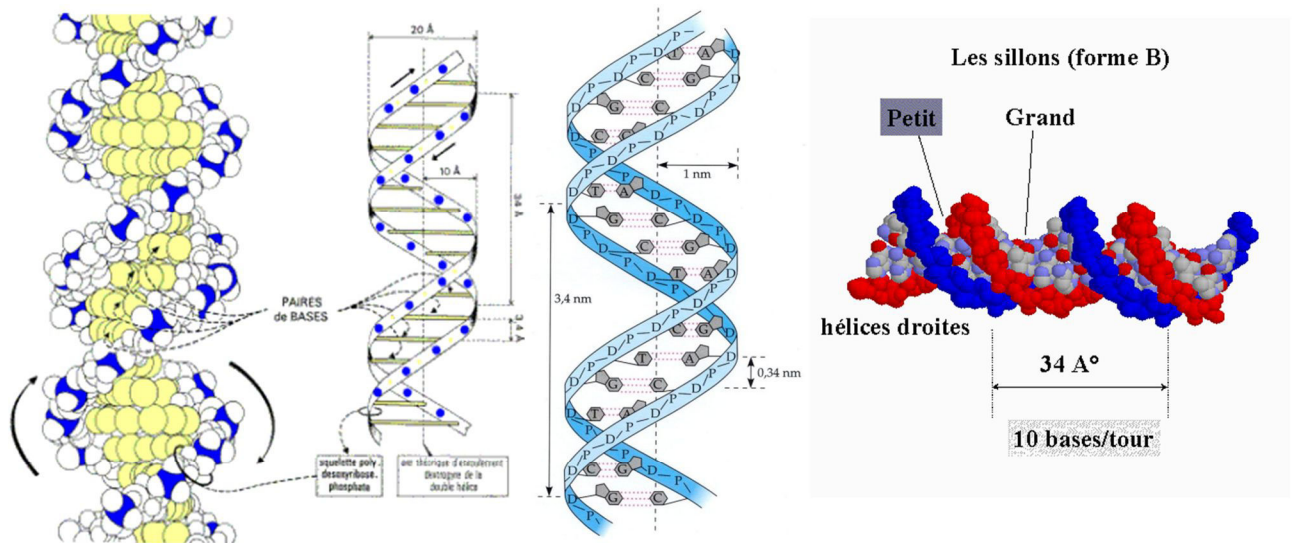


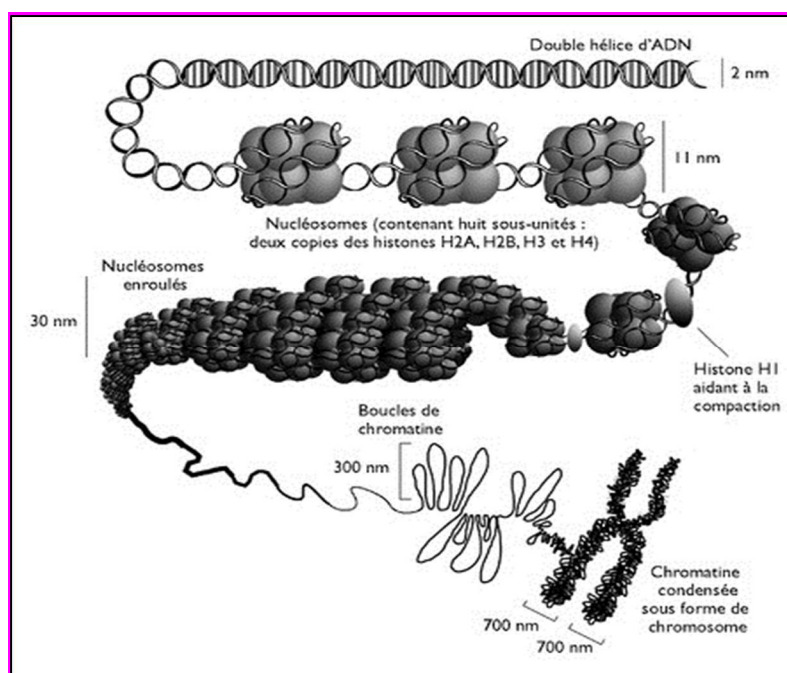
Figure 10 : Structure de l'ADN

Puisqu'une molécule d'ADN native est beaucoup plus longue qu'un chromosome, il doit forcément exister un système de compaction.

Les chromosomes représentent le plus haut niveau de compaction de l'ADN. Le constituant de base des chromosomes eucaryotes est appelée chromatine, constituée d'ADN complexé à des protéines basiques. L'unité fondamentale de la chromatine (unité de l'empaquetage) est appelée nucléosome qui est composé d'ADN et d'histones. Il constitue le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Un nucléosome est formé d'un complexe central de huit protéines d'histones (octamère d'histones) de structure $2x$ ($H2A$, $H2B$, $H3$, $H4$) entourées d'un segment d'ADN double brin (≈ 200 pb). En effet, l'ADN s'enroule autour du corps octamérique sur une distance d'environ 146 paires de bases et les nucléosomes adjacents sont connectés par l'ADN internucléosomique (*spacer*) de 60 pb en moyenne. Ces liens sont en relation avec l'Histone H1 qui aurait pour rôle de maintenir l'empilement des nucléosomes. H1 est collée à l'entrée et à la sortie de l'ADN. Un nucléosome présente 11 nm de long sur 6 nm de large et environ 10 nm de diamètre, dont la fonction principale est la compaction de la chromatine.

Les nucléosomes subissent un deuxième niveau de compaction. Les histones H1 lient les nucléosomes les uns aux autres, ce qui contribue à enrouler davantage l'ADN en fibres de chromatine de 30 nm de diamètre, connues sous le nom de solénoïdes. Le solénoïde est formé par des nucléosomes organisés en une hélice gauche comprenant 6 nucléosomes par tour, formant ainsi une fibre compacte de 30 nm de diamètre observée pendant l'interphase.

Lors de la division cellulaire, les nucléofilaments de 30 nm se condensent pour former les différents chromosomes bichromatidiens. En effet, chaque chromatide est formée de boucles de fibres chromatiniennes, contenant approximativement 75 kb d'ADN par boucle. Ces boucles chromatiniennes sont attachées à des sites de fixation (*SAR: Scaffold Attachment Regions*) dont les séquences sont riches en AT. Le complexe résultant, boucle-structure centrale, est compacté de façon supplémentaire par enroulement pour engendrer la chromatide (Figure 7). La chromatine est ainsi largement constituée de protéines qui assurent le soutien et la protection de l'ADN. Cette protection est notamment particulièrement efficace vis-à-vis des attaques radicalaires et donc, comme vu plus loin, des conséquences des irradiations ionisantes.



Un génome est une entité dynamique faisant l'objet de changements résultant de l'accumulation de petites lésions touchant la séquence d'ADN ainsi que des réarrangements plus larges créés par recombinaison. Mutation et recombinaison sont deux mécanismes distincts jouant un rôle clé dans les changements du génome et la variabilité génétique.

La recombinaison constitue une restructuration d'une séquence d'ADN suite à un échange de matériel génétique entre deux chromosomes homologues. Elle peut être également définie par une transposition d'un élément mobile d'une position à une autre dans un chromosome ou entre des chromosomes. D'autres types de réarrangements génétiques tels que l'inversion, la translocation et les réarrangements permettant le codage des gènes d'immunoglobulines et de leurs récepteurs sont également des résultats de recombinaison.

Une mutation est un changement touchant une séquence du génome d'un organisme. Certaines mutations sont des erreurs endogènes liées à l'activité cellulaire telle que les erreurs répliquatives ou mésappariements. D'autres lésions sont engendrées par des agents mutagènes qui peuvent être chimiques ou physiques (rayonnements X, γ , rayons UV et la chaleur).

2.2 Chronologie des événements radio induits :

On entend par rayonnement ionisant tout rayonnement susceptible d'ioniser une molécule d'air ou d'eau (à partir de 14 eV) (Saad 2014). 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 par des ionisations et/ou des excitations des atomes concernés (Tubiana, Dutreix et al. 1986). Nous reviendrons d'ailleurs sur ce point dans le chapitre 2.2.3

Lors de son passage dans la matière, toute particule (électron, photon,...) dépose son énergie suivant différents processus qui dépendent de sa nature, de son énergie initiale et des atomes rencontrés. Les étapes reliant le dépôt primaire d'énergie (*échelle atomique*) à ses conséquences biologiques (*échelle cellulaire*) sont nombreuses, complexes et pour certaines seulement partiellement connues. Chronologiquement, on peut distinguer quatre étapes successives après une interaction rayonnement-matière : physique, chimique, biologique et clinique.

2.2.1 La phase physique :

Un des enjeux de la radiobiologie est de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la formation des lésions de l'ADN, principale cible des radiations, ainsi qu'à leurs conséquences biologiques et cliniques. De ce fait, il est indispensable de connaître la façon dont le rayonnement interagit avec la matière afin d'aborder les notions de base de la dosimétrie et de relier quantitativement l'effet biologique à la dose de radiation. L'interaction

des rayons X avec la matière peut s'effectuer selon trois processus principaux : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la création de paires.

2.2.1.1 Les différentes interactions photon-matière

2.2.1.1.1. Effet photoélectrique

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 sont éjectés avec une énergie cinétique (T_{e^-}) initiale égale à : $T_{e^-} = h\nu_0 - E_s$ où $h\nu_0$ est l'énergie du photon incident et E_s correspond à l'énergie de liaison de l'électron à l'atome pour la sous-couche S (Figure 8). L'atome retourne alors dans son état initial par des processus qui correspondent à l'émission de rayonnement dit de *fluorescence*, dont le spectre de raies discontinu est caractéristique de l'atome en question. Le mode de désexcitation non radiatif ou électronique est connu sous le nom de *cascade Auger*. Les cascades Auger issues de la couche K sont aussi appelées « événements K » par certains auteurs et sont potentiellement très délétères pour l'ADN (Goodhead 1988).

L'effet photoélectrique est prédominant à basse énergie (<100 keV) et sa probabilité d'apparition, qui diminue avec l'énergie du photon incident, est approximativement proportionnelle à Z^4 . L'effet Auger est, quant à lui, prédominant dans les matériaux légers ($Z < 20$). Dans les matériaux lourds ($Z > 50$), la fluorescence est le mode majoritaire de désexcitation.

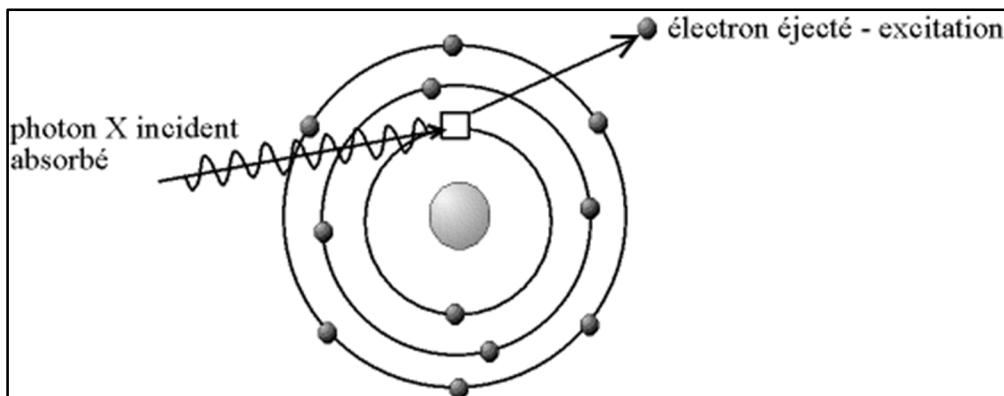


Figure 11: L'effet photoélectrique, le photon incident est absorbé et son énergie permet l'éjection d'un ou plusieurs électrons.

2.2.1.1.2. Effet Compton

Contrairement à l'effet photoélectrique, le photon incident ne perd qu'une partie de son énergie pour mettre en mouvement un électron peu lié d'un atome constituant le matériau traversé et le photon est finalement dévié de sa trajectoire initiale, dans une direction de l'espace dépendant de son énergie incidente et constitue le rayonnement diffusé : c'est l'effet Compton. L'électron Compton est émis dans le demi-espace situé au-delà du point d'impact. La proportion de l'énergie emportée par l'électron Compton est d'autant plus grande que l'énergie du photon incident est élevée. Cet effet est le mode d'interaction principal des photons de haute énergie avec les matériaux légers et donc en particulier la matière vivante (Figure 9).

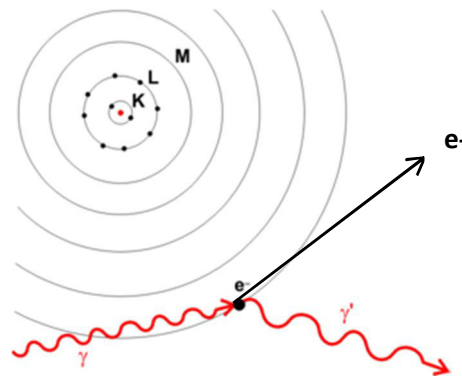


Figure 12: Effet Compton

2.2.1.1.3. Création de paires ou matérialisation

Si le photon incident possède une énergie supérieure à 1.022 MeV, il peut se matérialiser en créant une paire électron + positon. Ce dernier s'annihilera rapidement avec un autre électron et fera à nouveau apparaître de l'énergie sous forme de deux photons de 0.511 MeV s'éloignant à 180° l'un de l'autre.

2.2.1.2 Importance relative des différents effets

L'importance relative des principaux effets dominants dans la gamme d'énergie comprise entre 10 keV et 10 MeV utilisée couramment en radiologie et en radiothérapie est schématisée sur la Figure 10.

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.

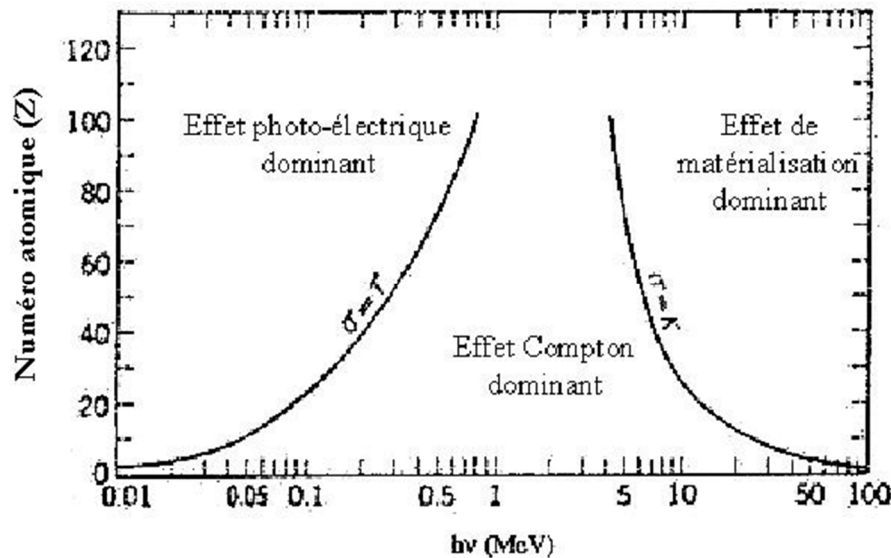


Figure 13 : Importance relative des trois modes d'interaction des photons avec la matière d'après (Evans 1985, Chetioui, Despiney et al. 1994).

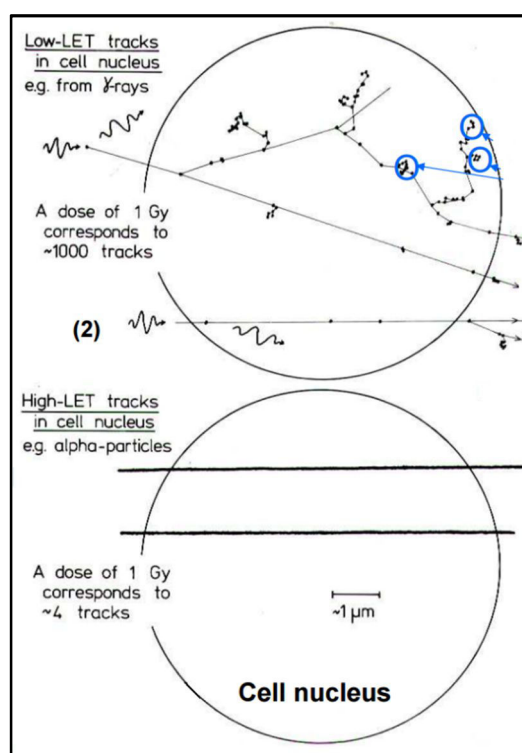
2.2.1.3 Les micro-dépôts d'énergie

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 : ce sont les micro-dépôts d'énergie. La notion de micro-dépôts d'énergie remonte aux années 1920, où les chambres à bulles permettaient la visualisation du parcours de particules chargées dans un gaz sous pression. Les trajectoires des particules étaient distribuées de façon irrégulière, avec des bulles plus ou moins grandes suivant le dépôt d'énergie, mais suivaient toujours les lois physiques d'interaction rayonnement-matière évoquées ci-dessus. Leur simulation était donc possible. Par conséquent, il fut nécessaire de développer des outils mathématiques afin d'exploiter ces données à l'échelle des cibles biologiques.

Dans les années 80, Dudley T. Goodhead a été l'un des premiers radiobiologistes à s'intéresser aux micro-dépôts d'énergie. Les travaux de Goodhead ont conduit à plusieurs principes directement applicables aux radiations. Premièrement, le passage d'un photon dans le milieu biologique produit une arborescence de micro-dépôts d'énergie aléatoirement espacés et de densités d'énergie différentes. La variété de ces micro-dépôts est probablement

l'une des causes de la grande hétérogénéité biochimique des dégâts créés dans l'ADN. Deuxièmement, le facteur qui détermine l'efficacité biologique des radiations ionisantes est la densité d'ionisation (Evans 1985) et par extension le TEL (transfert d'énergie linéique) d'une particule exprimé en keV/μm. La Figure 11, présente les trajectoires de différentes particules à travers un noyau cellulaire. Les particules de faible TEL déposent leur énergie sous forme d'ionisations éparses. En revanche, les particules de haut TEL, comme les particules α, déposent leur énergie sous forme d'une trace dense. Ainsi pour une dose de 1 Gy de radiation de faible TEL, on remarque un très grand nombre de « petits » micro-dépôts (quelques eV.nm⁻³), alors que les dépôts de quelques centaines d'électronvolts sont très rares (Goodhead 1989).

Figure 14 : Représentation schématique de la trajectoire des rayons γ de faible TEL et des particules α de haut TEL traversant le noyau d'une cellule, d'après (Goodhead 1989).



Les radiations ionisantes se distinguent de tous les autres agents cytotoxiques par la diversité et la multiplicité des lésions qu'elles créent dans l'ADN.

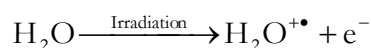
Un parallèle a été établi entre la nature biochimique des lésions radio-induites de l'ADN et la valeur des micro-dépôts d'énergie. Les modifications de bases (1000 à 10.000 par Gy) sont avec les cassures simple-brin (SSB : *Single Strand Break*) (1000 par Gy), les événements les plus fréquents : on chiffre à 1-10 eV.nm⁻³ l'énergie nécessaire pour créer une modification de base et 10-100 eV.nm⁻³ pour une SSB. Les pontages ADN-protéines (150 par Gy) et surtout les cassures double-brin (DSB : *Double Strand Break*) (40 par Gy) sont des événements beaucoup plus rares (Goodhead 1988). Il faut plus de 100 eV.nm⁻³ pour en créer une seule. Ainsi, la nature des lésions de l'ADN dépend de la densité d'énergie des micro-dépôts. Nous

verrons plus loin que cette densité d'énergie influence également la « réparabilité » des lésions considérées (Frankenberg-Schwager 1989).

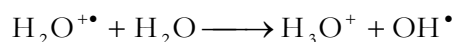
2.2.1.3.1.. La phase chimique

2.2.1.3.1.1. La radiolyse de l'eau

Les micro-dépôts d'énergie, évoqués ci-avant concernent avant tout la molécule d'eau et les lésions décrites et dénombrées en fonction de l'importance des micro-dépôts dans le § 2.2.1.3 sont en réalité causés par les effets de la radiolyse de l'eau qui sont eux-mêmes plus ou moins denses selon les micro-dépôts. En effet, les molécules d'eau représentent plus de deux tiers du poids du corps humain. La décomposition de l'eau par les rayonnements ionisants est un élément essentiel dans la chaîne de réactions physico-chimiques secondaires à l'irradiation ionisante. L'ionisation d'une molécule d'eau nécessite environ 13 eV.



Elle aboutit rapidement à la formation de deux ions radicaux très instables qui vont donner naissance à des radicaux neutres stables. L'ion $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ dont la durée de vie est de 10^{-10} s, subit une réaction ion-molécule bien connue en spectroscopie de masse :



La formation de l'ion (H_3O^+) entraîne une acidification du milieu. Le radical OH^\bullet est un oxydant très puissant, qui possède une grande réactivité chimique sur toutes les molécules avoisinantes (oxygène ou organique). L'électron formé perd progressivement son énergie cinétique initiale dans d'autres ionisations ou dans des excitations. Lorsqu'il est ralenti en deçà du premier potentiel d'excitation de l'eau (≈ 6.6 eV), les électrons primaires et secondaires vont donner des électrons de *sous excitation* jusqu'à ce qu'ils finissent par être thermalisés (≈ 0.02 eV). Les électrons thermiques se stabilisent dans le milieu et forment des électrons aqueux, réducteurs très puissants. Ainsi, le résultat des collisions décrites ci-dessus, est la présence presque exclusive dans l'eau de e^-_{aq} , OH^\bullet , H^\bullet , et de H_3O^+ qui proviennent d'une part de la dissociation radiochimique de H_2O , puis de la dissociation radiolytique de la molécule d'eau (Figure 12).

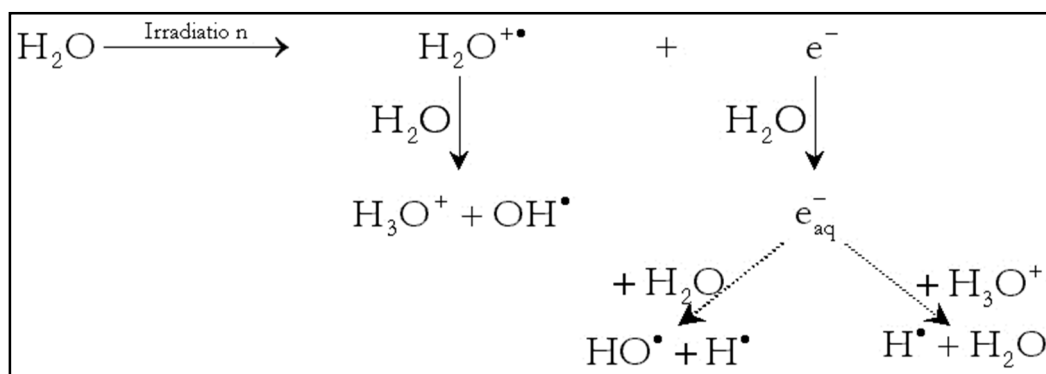


Figure Erreur ! Il n'y a pas de texte répondant à ce style dans ce document.-15 : Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.

Les composants chimiques, énoncés ci-dessus, décroissent dans les zones où ils ont été produits, et ce, selon trois processus simultanés :

- Par des réactions de recombinaison. En effet, immédiatement après le passage de la particule ionisante, 10^{-12} s, les radicaux sont distribués de façon très hétérogène autour de la trajectoire de la particule à l'instar des dépôts d'énergie eux-mêmes, cette distribution dépend donc du TEL de la particule et varie le long de la trajectoire. De leur lieu de naissance, les radicaux H^\bullet et OH^\bullet diffusent et peuvent réagir entre eux (recombinaison de H_2O , H_2O_2 et H_2).
- Par diffusion jusqu'à l'homogénéisation dans l'ensemble du milieu irradié.
- Par des réactions avec les molécules du milieu cellulaire et en particulier les macromolécules telles que membranes, protéines et acides nucléiques. Par exemple, la guanine (une des bases de l'ADN) est la cible la plus probable pour les réactions oxydatives médiées par OH^\bullet et d'autres radicaux libres. Le produit résultant, le 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) [plus connu encore sous son autre nom de 8-Oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), est un bio marqueur témoin clef de l'attaque oxydative de l'ADN (Floyd 1990, Foray, Monroco et al. 1998). Les radicaux libres peuvent aussi frapper la partie sucre-phosphate de l'ADN et produire des CSB ou des CDB ; plus d'une centaine de motifs différents ont été identifiés (Breen and Murphy 1995, Haegele, Wolfe et al. 1998).

2.2.1.3.1.2. La radiolyse d'une solution aqueuse

Les rayonnements ionisants peuvent avoir une action *directe* sur les biomolécules et une action *indirecte* due à l'interaction secondaire des produits de radiolyse de l'eau avec les

solutés. Les molécules qui ont été ionisées ou excitées sont instables. L'excédent d'énergie peut provoquer la rupture d'une liaison covalente et ainsi produire la scission d'une molécule en 2 radicaux :

$$R\cdot R' \longrightarrow R\cdot + R'\cdot$$

Une liaison covalente est constituée d'une paire d'électrons appariés (de spins opposés). Lors de la rupture d'une telle liaison, chaque fragment emporte avec lui un seul électron non couplé, ce qui confère à chaque radical une grande réactivité. Ainsi, les radiations ionisantes peuvent également décomposer toute molécule en solution aqueuse en entités chimiques secondaires qui peuvent être très réactives avec le milieu. Cependant cette action *directe* est minoritaire, probablement moins de 10% des lésions moléculaires identifiées en radiobiologie lui sont attribuables et c'est de loin la radiolyse de l'eau qui intervient le plus dans les tissus vivants.

2.2.1.3.2. La phase biologique

2.2.1.3.2.1. Les dommages radio induits de l'ADN

La molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) est l'un des constituants essentiels des organismes vivants, représentant plus d'un dixième du poids sec des cellules. Environ cinquante milliards de kilomètres d'ADN se trouvent accumulés dans le noyau de quelques cinquante mille milliards de cellules d'un organisme humain. Lors de leur développement, les cellules ont à faire face à des dommages de l'ADN qu'elles ont elles-mêmes créés. C'est le cas notamment des cassures de l'ADN en phase de synthèse, des cassures chromosomiques lors de la méiose ainsi que de certaines cassures spécifiques lors de la production des immunoglobulines (recombinaison V(D) J) (Cadet, Delatour et al. 1999). De plus, certains agents physiques ou chimiques, dits *génotoxiques* (UV, radiations ionisantes, drogues chimiothérapeutiques) sont à l'origine de plusieurs types de dommages de l'ADN comme le montre la Figure 13 (10.) Il existe donc plusieurs modes de réparation de l'ADN, spécifiques du type biochimique des dommages.

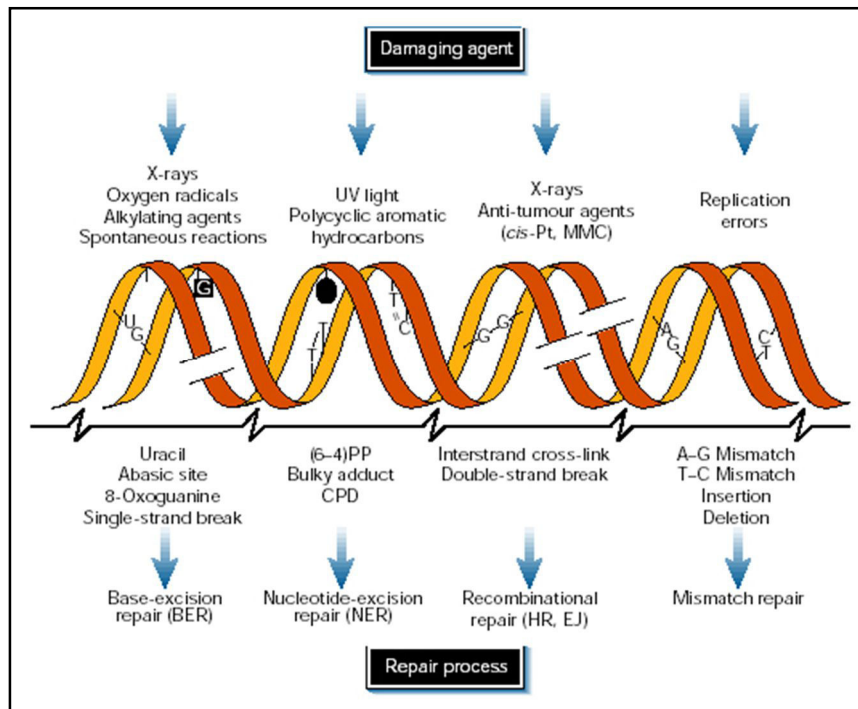


Figure -16: Dommages de l'ADN et modes de réparation d'après (Morrison, Smith et al. 1997).

Les lésions induites par les rayonnements ionisants sont les dommages de bases, les CSB et les CDB qui ont des conséquences biologiques plus ou moins importantes selon leur nature (Hoeijmakers 2001).

Les dommages concernant les bases 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). Leur réparation est rapide et est généralement exécutée en moins de quelques minutes. Elle s'effectue par le processus d'*excision-resynthèse* (Moustacchi 2000).

Les CSBs ont leur réparation exécutée en quelques dizaines de minutes par des processus d'*excision-resynthèse* mais aussi de recombinaison (Lindahl and Wood 1999).

Les CDB sont plus rares (environ 40 par Gy pour une irradiation γ (Lindahl and Wood 1999)). Goodhead a montré qu'une cassure double-brin radioinduite ne peut résulter de l'addition de deux cassures simple-brin suffisamment proches et portées sur des brins opposés. Au contraire, les CDB résulteraient d'une peroxydation instantanée due au dépôt de quelques centaines d'eV par nm^3 (Ward 1988). Les CDB non réparées peuvent conduire, dans certains cas, à la perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone altérée. La

réparation des CDB peut prendre plusieurs heures (Goodhead 1989). Dans les cellules eucaryotes, il existe deux systèmes de réparation des CDB :

- La recombinaison, majoritaire au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire,
- La suture ou (*NHEJ : non-homologous end joining*) qui est prédominante pendant la phase G1.

2.4.1.1. La réparation des CDB

2.4.1.1.1. La recombinaison

La réparation par recombinaison consiste à remplacer la séquence endommagée soit par celle, identique du chromosome homologue (*recombinaison homologue*) (Frankenberg-Schwager 1989) soit par une séquence au hasard. On parle alors de recombinaison illégitime ou *non-homologue* (Thyagarajan, McCormick-Graham et al. 1996). La reconnaissance des CDB réparées par recombinaison est assurée par les anneaux heptamériques Rad52 qui coulisent 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 (Ehrlich, Bierne et al. 1993). Singulièrement, alors que l'absence de toute recombinaison homologue est létale chez les mammifères, il a été montré qu'un défaut de contrôle de la recombinaison pouvait contribuer à une forte instabilité génétique : c'est l'hyper-recombinaison (Lengauer, Kinzler et al. 1998, Wu, Davies 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 certains types de cancer (Zhou, Akgun et al. 2001).

2.4.1.1.2. La suture : *non-homologous end joining* (NHEJ)

Pour les cellules de mammifères, le NHEJ est le principal système de réparation des CDB. La protéine Ku80 s'associe à la protéine Ku70 (Khanna and Jackson 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 de kinase essentielle dans le processus de réparation NHEJ : cette kinase phosphoryle

certaines protéines histones (cf. paragraphe 2.1). Les protéines de réparation (Ligase 4 et XRCC4) sont ensuite recrutées pour liguer les deux extrémités de l'ADN. Les erreurs chromosomiques typiques d'un défaut de suture NHEJ sont généralement des délétions qui peuvent être associées à une forte radiosensibilité et une immunodéficience sévère (Walker, Corpina et al. 2001).

2.4.1.1.3. Phosphorylation de l'histone H2AX en réponse aux CDB :

Chez les eucaryotes, l'ADN est condensé et sur-condensé suivant la phase du cycle cellulaire. Nu (en double-hélice) en synthèse, il est constitué par des boucles de nucléosomes composées de 145 paires de bases d'ADN et de 8 protéines histones (H1 à H4). En phase G2/M, les nucléosomes se super-enroulent pour former la chromatine qui donnera les chromosomes (voir § 2.1). Lors de l'activation des sérine-thréonine kinases de la famille des PI3-K (comme DNA-PKcs, ATM ou ATR (Smith and Jackson 1999, Dai, Kysela et al. 2003), le résidu sérine 139 (motif SQE) de l'histone H2AX est phosphorylé (Rogakou, Pilch et al. 1998, Zhou and Elledge 2000, Brown and Baltimore 2003). Cette phosphorylation fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDB. 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 CDB induites après irradiation (Rogakou, Boon et al. 1999, Burma, Chen et al. 2001). Récemment, une corrélation directe et parfaite (un focus pour une CDB) a été observée entre le nombre de *foci* et le nombre de CDB.

A travers l'approche novatrice du laboratoire d'accueil, nous aborderons plus loin en détail le lien entre la signalisation ATM-dépendante des CDB et la radiosensibilité cellulaire (voir § 2.4).

2.4.1.2. Rôle de la régulation du cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est contrôlé par de nombreuses protéines régulatrices qui sont à l'origine du contrôle des 4 phases G1, S, G2 et M. Les kinases cycline-dépendantes ou Cdk (cyclin-dependent kinases) sont des enzymes de type sérine-thréonine kinase et permettent de catalyser le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine provenant de leurs substrats spécifiques. Lors du déroulement du cycle de division cellulaire, une anomalie peut se produire à tout moment. Dans ce cas,

les points de contrôle permettent l'arrêt de la progression du cycle cellulaire lorsque l'ADN est endommagé ou bien lorsque la réplication de l'ADN ou l'alignement des chromosomes en mitose ne se déroule pas correctement. Le cycle cellulaire doit alors être freiné ou stoppé afin de corriger cette erreur ou bien si l'anomalie est trop importante de déclencher la mort cellulaire. C'est le rôle des différents points de contrôle du cycle cellulaire.

Le contrôle interne au cycle cellulaire se situe aux différents niveaux (Figure 14):

- *Transition G1/S ou G1/S checkpoint,*
- *Transition G2/M ou G2-damage checkpoint,*
- *Transition métaphase/anaphase,*
- *Point de restriction R,*
- *Duplication du centrosome,*
- *Fuseau mitotique.*

2.4.1.2.1 Transition G0/G1 :

La phase G0 à G1 est une étape ciblée par certains anticancéreux notamment par la famille des inhibiteurs de tyrosine kinase.

La présence de facteurs mitogènes, comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou PDGF (Platelet Derived Growth Factor), près d'une cellule en phase de quiescence (en G0) entraîne le démarrage de la phase G1.

Lors de la transition, a lieu la transcription des gènes essentiels pour G1 et l'entrée en division. Cette transcription est stimulée par deux voies de signalisation:

- Par des facteurs de croissance, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase ainsi que des stimuli mitogènes, par l'intermédiaire de récepteurs couplés à des protéines G qui doivent être farnésylées pour être correctement positionnées sous la membrane dans la voie de transduction des signaux (voir § 1.6.1.4) , déclenchent des cascades de type MapKKK/MapKK/MapK, qui stimulent la transcription de gènes tels que Cycline D et Cdk4 et 6.
- Par dimérisation des protéines Myc et Max qui activent la transcription des gènes de Cdc25 A, Cdk4, Cdk6, Cycline D, Cycline E, E2F. [REF](#)

2.4.1.2.2 Transition G1/S :

Les deux points de contrôle primordiaux sont situés : lors de la transition G1/S, empêchant l'entrée en phase S de la cellule ; et lors de la transition G2/M, empêchant l'entrée en mitose de la cellule, par une inhibition spécifique des complexes activateurs de la division cellulaire.

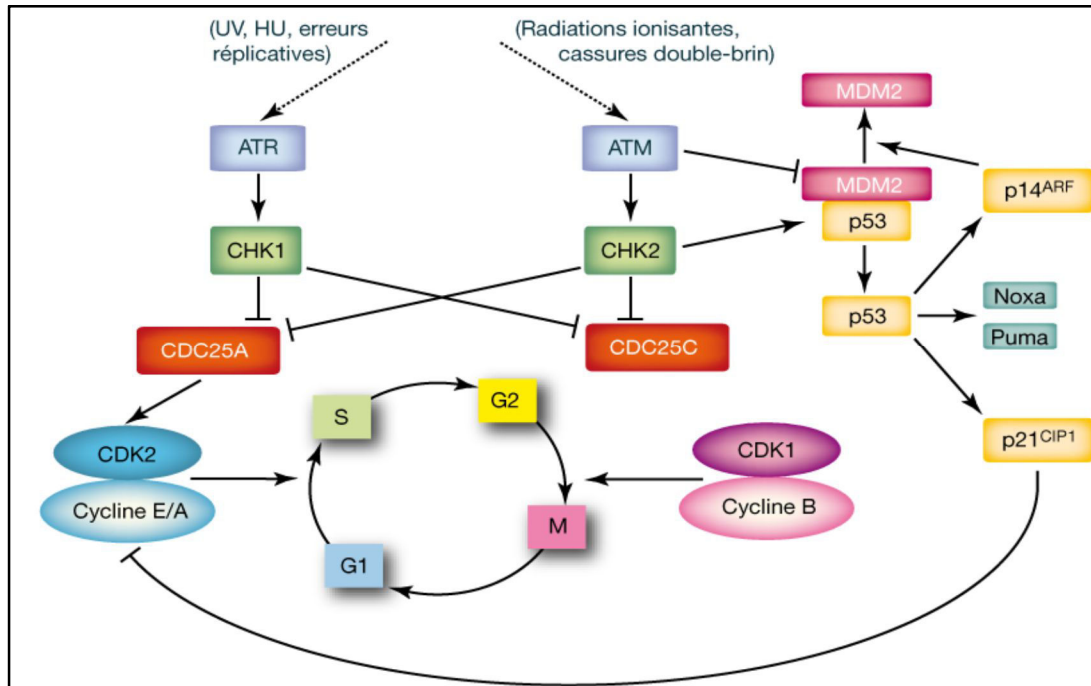


Figure 17 : Schéma sommaire de la régulation des points de contrôle G1/S et G2 DNA damage

Au niveau de ces deux «check points» de régulation, la kinase **ATM** (Ataxia Telangiectasia Mutated) est activée en cas d'irradiation ionisante de l'ADN qui engendre généralement des coupures double-brin CDB. Cette kinase est une enzyme dérivée de la famille des phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases (Pi3kK), lors d'une irradiation de faible dose ou lors d'une exposition aux rayons d'UV une autre kinase de la même famille est activée: c'est la kinase **ATR** (Atm-and Rad3-related). Ces deux kinases ont chacune une modalité d'action différente :

- ATR et ATM déclenchent respectivement la phosphorylation des kinases Chk1 et Chk2 ce qui active les points de contrôle du cycle cellulaire. Ces réactions aboutissent à la phosphorylation des Cdc25A et Cdc25C qui, dans ce cas, sont inactivées. Ainsi les

Cdk2 et Cdk1 ne peuvent pas être activées par ces dernières et le cycle cellulaire s'arrête respectivement en G1/S ou G2/M (Figure 17).

- les kinases ATM empruntent également une voie appelée voie p53-dépendante, plus lente que celle décrite précédemment (Figure 17). La protéine p53 est aussi appelée «suppresseur de tumeur» car en cas de lésions de l'ADN, notamment à risque carcinogène, et par l'intermédiaire d'un système complexe, celle-ci peut déclencher l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, G2 ou S. Il est remarquable que 90% environ des cancers humains présentent une invalidation de la fonction de p53 par différents mécanismes.

Dans le noyau d'une cellule saine, la protéine p53 stimule la transcription d'un gène codant pour la protéine p21, inhibitrice du complexe Cdk2/Cycline A ou E, empêchant la cellule d'entrer en phase S. De plus, les kinases ATM phosphorylent et activent les protéines de contrôle Chk2 et ces dernières sont responsables de la phosphorylation activatrice du facteur de transcription de p53. La protéine p53 qui contribue à son tour à la transcription et à la traduction du gène p21, etc.

2.4.1.2.3. La phase G2/M :

La transition de G2/M est régulée par le complexe Cdk1 et une cycline de type B formant ainsi le *MPF* (mitosis promoting factor). Ce complexe phosphoryle de nombreuses protéines permettant le bon déroulement de la mitose:

- Les histones H1 et H3, les condensines intervenant lors de la compaction des chromosomes,
- Les lamines favorisant la désorganisation et la fragmentation de *l'enveloppe nucléaire* lorsqu'elles sont déphosphorylées,
- Le complexe promoteur de l'anaphase permettant à la séparase de lyser la cohésine (Scc1) qui unit les deux chromatides de chacun des chromosomes métaphasiques.

2.4.1.3. La mort cellulaire:

La mort radiobiologique d'une cellule est définie par la perte définitive de sa capacité de division. Ainsi, avant sa disparition physique proprement dite, une cellule morte peut continuer à métaboliser et notamment à réparer les dégâts créés dans l'ADN. Par exemple, c'est avec des populations de cellules qui ont reçu des doses 4 à 20 fois supérieures à la dose létale moyenne que l'on étudie la réparation des CDB . La

méthode des colonies a permis de quantifier la mort des cellules irradiées (courbes de survie) (Foray and Verrelle 2011). Ainsi, chaque lignée humaine, y compris les témoins, est caractérisée par sa propre radiosensibilité ou *radiosensibilité intrinsèque* (Puck and Marcus 1956).

La perte de la capacité de division est la conséquence de plusieurs types de réponses aux radiations ionisantes. En effet, trois principaux types de morts radioinduites *définies fonctionnellement* ont été répertoriés pour des doses inférieures aux milliers de Gy: la mort mitotique, la mort par sénescence et la mort apoptotique (Fertil and Malaise 1981, Hennequin, Quero et al. 2008, Favaudon, Caplier et al. 2014). 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. Nous ne décrivons ici que les trois morts fonctionnelles radio induites.

Une CDB induite en G1 ou en S qui reste non réparée se propage tout au long du cycle de la cellule et devient une cassure *chromosomique*. Le fragment chromosomique issu de cette cassure est soumis aux mêmes phénomènes de réplication 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*. La mort mitotique est considérée comme le type de mort radio-induite le plus répandu. Le nombre de micronoyaux augmente linéairement avec la dose. Il a été corrélé très tôt à l'effet létal des radiations ionisantes (Hennequin, Quero et al. 2011).

L'*apoptose* est une mort dite *programmée* déclenchée par une CDB non réparée (Foray and Verrelle 2011). Elle se traduit par une libération d'endo-nucléases qui digèrent massivement l'ADN (Bursch, Kleine et al. 1990, D'Amico and McKenna 1994). L'apoptose requiert généralement une protéine p53 fonctionnelle (Walker, Kokileva et al. 1993). Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent *en interphase* (G1, G2).

Plus récemment encore, l'*arrêt irréversible en G1* a été décrit lui aussi comme une cause de mort radiobiologique (Lowe, Schmitt et al. 1993). L'arrêt irréversible en G1 est également associé à une CDB non réparée et dépend de p53 mais surtout de p21 (Di Leonardo, Linke et

al. 1994). A l'inverse de l'apoptose, l'arrêt irréversible en G1 est abondant chez les fibroblastes témoins (en moyenne, 67% de cellules sont définitivement arrêtées avec une dose de 4 Gy) et il est compatible avec une existence métabolique prolongée de la cellule et même sa croissance en volume dans la mesure où elle ne peut plus se diviser (on l'a même comparé à une forme de vieillissement, la *sénescence*).

3. De l'inflammation radio-induite à la lésion tissulaire constituée

Certaines équipes, en France notamment celle de l'IRSN, ont travaillé sur le rôle des voies de l'inflammation (endothélium vasculaire) dans la réponse radiobiologique suite à l'exposition du tissu sain aux rayonnements ionisants.

Ces équipes suggèrent que la réaction à l'exposition aux rayons de ces tissus sains est une cascade d'événements dont l'élément clef est *l'endothélium responsable de l'initiation, la progression et la chronicité du phénomène*.

Les dommages tissulaires observés sont la résultante d'une activation d'une séquence biologique complexe (Li, Nagasawa et al. 1995) faisant intervenir, dans le complexe global de l'inflammation, des réactions immunitaires et humorales parmi lesquelles l'endothélium vasculaire a un rôle possiblement important, notamment par l'intermédiaire du facteur PAI-1.

La rectite radique est un exemple typique de ce type de réactions. Son occurrence est en diminution depuis les progrès du repositionnement (IGRT) et plus récemment ce permis par l'IMRT et mieux encore avec l'arc-thérapie VMAT.

Néanmoins, cette complication reste un problème par sa gravité potentielle et son caractère limitant pour les traitements des cancers pelviens. Les rectites peuvent être classées en deux catégories :

- Les rectites aiguës : caractérisées par un saignement pendant le traitement et/ou pendant les six premiers mois post-traitement. Ces réactions sont constituées d'une congestion associée ou non à un saignement muqueux. Parfois on observe des télangiectasies. Dans les formes sévères on observe une radionécrose où la muqueuse est d'aspect noirâtre.

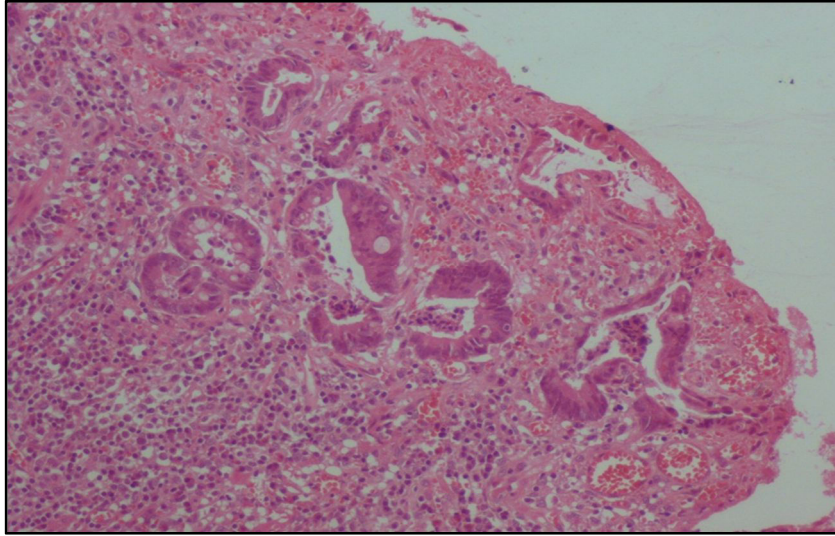
- Les rectites chroniques : caractérisées par une muqueuse atrophique avec accentuation des télangiectasies. On observe parfois des fistules associées ou non à une sténose ulcérée (Figure 18).

Sur le plan histologique, l'épithélium est marqué par une nécrose faite par des atypies cellulaires régénératives reposant sur une musculature atrophique. Le tissu conjonctif est œdématié, riche en fibrine. Le stroma est caractérisé par une congestion associée à une fibrose hyaline contenant des fibroblastes atypiques (Figure 19).

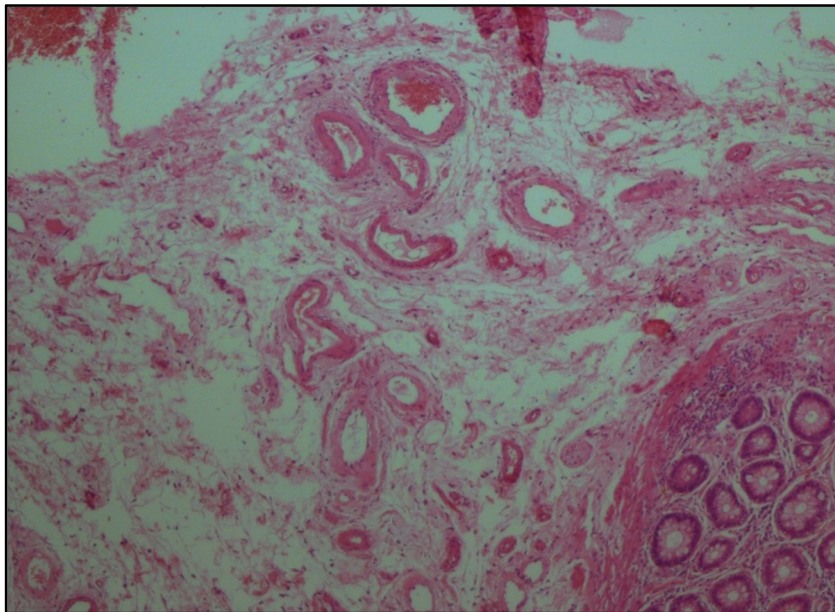
Les vaisseaux sont caractérisés par des capillaires dilatés, des veines thrombosées et surtout une endartérite lipidique.



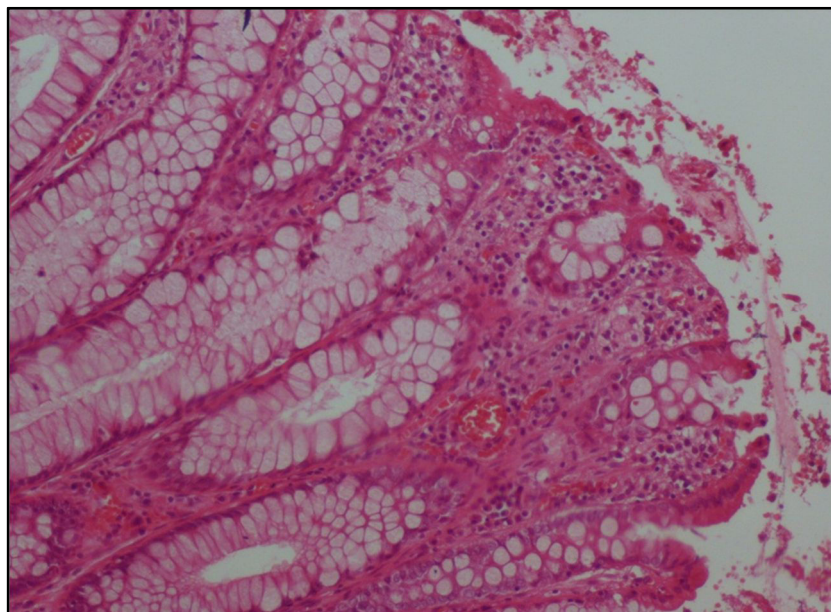
Figure 18: Aspect macroscopique d'une rectite postradique, caractérisées par une muqueuse atrophique avec accentuation des télangiectasies et dépôts lipidiques.



1. Les cryptes sont raréfiées atrophiques bordées par un épithélium d'aspect régénératif au sein d'un chorion riche en hématies extravasées (HEx100)



2. La sous-muqueuse œdémateuse avec des artérioles à paroi épaisses hyalinisées (HEx100)



(Photos fournies par Dr Moussa, laboratoire anatomopathologie, CHU Monastir, Tunisie)

3. L'épithélium de surface est atrophique et érodé. (HEx100)

Figure Figure 19: aspect histologique d'une rectite radique chronique montrant des cryptes distordus, une fibrose du chorion avec des capillaires dilatés.

Plusieurs tentatives d'explications de l'implication vasculaire dans la fibrose radio-induite ont été avancées dans ces dernières années [Dong, 2015 #189; Nishioka, 2015 #190; Paun, 2015 #191; Tahamtan, 2015 #192]. L'étude de Choi et coll. (Millat, Sreenath et al. 2008) dont le but était d'approfondir, sur un modèle animal, les connaissances sur les phénomènes endothéliaux lors de la fibrose pulmonaire, est particulièrement intéressante. Ils ont observé après l'irradiation des poumons de souris :

1. La phase précoce de la fibrose qui est marquée par un dépôt accru de collagène, en particulier autour des vaisseaux sanguins,
2. un tel dépôt devient plus évident dans les tissus irradiés.
3. le dépôt de collagène est accompagné d'une transition mésenchymato-endothéliale vasculaire EndMT (endothéliale-mésenchymateuse transition), concomitant à des EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) des cellules alvéolaires (AE) de type II, dans un contexte hypoxique, spécifique des dommages de cellules endothéliales dans les tissus pulmonaires irradiés.

4. Dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaines (HPAECs), l'apparition de l'EndMT radio-induite est due à l'activation de la signalisation TGF-R1 / Smad qui est dépendante de l'expression de HIF1 α .
5. Le HIF1 α et le 2-méthoxy oestradiol (2-ME) inhibent la EndMT induite par l'irradiation par régulation à la baisse de la signalisation Smad HIF1 α -dépendante.
6. In vivo, le 2-ME inhibe la EndMT vasculaire, et diminue le dépôt de collagène associé à la fibrose radioinduite.
7. La EndMT liée à HIF1 α a été observée également dans les tissus humains.

L'observation de cette transition endothélio-mésenchymateuse est un argument fort en faveur du modèle vasculaire. De plus cette transition cellulaire inflammatoire (EndMT), qui est associée au développement de la fibrose radique, peut être efficacement inhibée par la modulation des dommages hypoxiques vasculaires spécifiques des cellules endothéliales.

3.1. La théorie de la réponse aux radiations développée par le laboratoire d'accueil

Le laboratoire d'accueil a développé pendant ces dernières années une approche contribuant à clarifier les phénomènes observés en radiobiologie humaine.

3.1.1. Justification des choix techniques

3.1.1.1. Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB

Depuis les années 90, trois grandes approches ont été adoptées pour déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité (Choi, Hong et al. 2015).

- L'approche génomique, qui consiste à déterminer, par la connaissance des séquences des gènes, certaines mutations qui seraient associées à une radiosensibilité anormale. C'est le cas de la recherche des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) ;
- L'approche protéomique, qui consiste à déterminer, par l'étude de l'expression des gènes, des protéines dont la régulation conditionnerait la réponse aux radiations ;
- L'approche fonctionnelle, qui consiste à déterminer, par l'analyse phénoménologique des anomalies des réponses moléculaires à l'irradiation, quelles fonctions biochimiques peuvent être déficientes et partant, comment certaines protéines peuvent être impliquées dans la radiosensibilité.

Comme on l'a vu plus haut, des données de la littérature de plus en plus nombreuses montrent que les CDB sont les dommages de l'ADN les mieux corrélés à la létalité cellulaire et à la toxicité - si elles ne sont pas réparées - et à l'instabilité génomique et au risque de cancer - si elles sont mal réparées (Jeggo and Lobrich 2007, Granzotto, Joubert et al. 2011). Etablie à l'origine pour les CDB radio-induites, une telle conclusion semble être aussi valable pour tous les agents cassants de l'ADN. Dès lors, une évaluation du risque toxique et cancérigène basée sur la quantification des CDB et l'étude des dysfonctionnements de leurs voies de réparation apparaît donc comme logique. Outre les conclusions de la littérature, ces éléments se basent sur trois constats essentiels :

- La très grande majorité des syndromes associés à une hyper-radiosensibilité significative sont causés par la mutation de protéines impliquées dans la réparation et la signalisation des CDB (On verra

cependant plus loin que l'étude des exceptions à cette observation est à l'origine du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM).

- Les CDB sont à l'origine des cassures chromosomiques, événements cytogénétiques dont l'implication dans la létalité ou la transformation cellulaire fait consensus.
- De tous les dommages radioinduits de l'ADN, les CDB sont les seules dont l'induction et/ou le rythme de réparation sont modulés, comme la radiosensibilité, par l'oxygénation, l'hyperthermie, ou le transfert d'énergie linéique de l'irradiation (Joubert, Vogin et al. 2011).

En dépit de ces arguments, la facilité des expériences de génomique ou de protéomique (notamment expliquée par leur rapidité et leur simplicité) a occulté l'intérêt des tests fonctionnels concernant les CDB dans la détection des anomalies de la radiosensibilité. D'ailleurs, ces derniers devenaient de moins en moins accessibles car leur mise en place fait souvent appel à un « savoir-faire » technique important. En parallèle, et en ne suivant guère de logique les tests apoptotiques à partir de lymphocytes devenaient également populaires en dépit d'artéfacts techniques rédhibitoires qui ne se révélèrent que très récemment (Steel 1993, Joubert and Foray 2006, Granzotto, Joubert et al. 2011). L'approche du laboratoire, délibérément basée sur des tests fonctionnels de la réparation et de la signalisation des CDB ne pouvait apparaître que comme une démarche à contre-courant des modes actuels.

3.1.1.2. Choix des modèles cellulaires

Les données radiobiologiques (non-épidémiologiques) qui constituent la base des règles de radioprotection sont issues de modèles animaux. Les modèles moléculaires mécanistiques de la réparation des dommages radio induits, du contrôle du cycle ou de la mort cellulaire sont essentiellement étayés par des données issues de modèle animaux et le développement des recherches depuis ces 20 dernières années n'a pas démenti ce constat. Pourtant, l'usage de modèles animaux en radiobiologie peut être facilement contesté par au moins deux arguments :

- L'homologie de séquence et encore moins l'homologie fonctionnelle des gènes des espèces animales sont loin d'être vérifiées avec les gènes humains correspondants. D'ailleurs, l'homologie des gènes entre espèces est généralement basée sur une simple affirmation d'un groupe d'auteurs à partir de l'existence de certains domaines

en commun voire identique. L'exemple représentatif est le gène *brca1* du rongeur qui n'a que 58% d'identité avec le gène humain *BRCA1*. La mutation de *brca1* chez le rongeur ne conduit à aucune prédisposition au cancer mammaire alors que chez l'homme, les mutations hétérozygotes *BRCA1*+/- augmentent d'un facteur 6 à 10 le risque de cancer du sein. (Bennett, Brownlee et al. 1999, Joubert, Vogin et al. 2011).

- La taille du noyau des modèles cellulaires animaux est généralement inférieure à la taille d'un noyau humain. Par voie de conséquence, la cible étant plus petite, les animaux sont plus radiorésistants que l'homme (ex : la dose létale moyenne est de 15 Gy chez le rat alors qu'elle est de 4,5 Gy chez l'homme). Ainsi, toutes les courbes effet-dose et les valeurs de seuil sont différentes suivant les espèces et le passage de l'une à l'autre ne suit pas une loi forcément linéaire.

Ainsi, en dépit des difficultés pratiques de culture cellulaire, le laboratoire d'accueil a délibérément choisi de n'utiliser que des cellules humaines non-transformées. Par contre, le choix pouvait se porter sur les lymphocytes ou les fibroblastes de peau. Là encore, l'argumentation devait être rigoureuse :

- Durée de vie en culture : les lymphocytes ont une durée de vie limitée en culture, ce qui pousse généralement les laboratoires à les immortaliser par le virus Epstein-Barr (EBV) dont l'effet peut conduire à une modification drastique d'un grand nombre de fonctions géniques et à une plus grande radiorésistance. A l'inverse, les fibroblastes de peau sont plus résistants en culture (une vingtaine de passages sont possibles) et ils supportent mieux la conservation dans l'azote liquide.
- Contribution de la mort par apoptose : comme on l'a mentionné plus haut, l'apoptose n'est pas la mort prépondérante en radiobiologie. Par contre, c'est la mort majoritaire pour le cas particulier des lymphocytes. C'est pourquoi ce type particulier de cellules peut ne pas être représentatif de la réponse aux radiations, avec en plus, le risque d'artéfact technique dû à la production de CDB au cours du processus apoptotique et non immédiatement après l'irradiation.
- Cycle cellulaire : les fibroblastes se mettent naturellement en phase de plateau (quiescence ou G0/G1) grâce à la propriété d'inhibition de contact qui garantit l'homéostasie. Ce n'est pas le cas des lymphocytes qui peuvent évoluer dans le cycle et donc ne pas former une population homogène de cellules.

- Représentativité : en plus des spécificités évoquées ci-dessus, on peut s'interroger sur la vraie représentativité des lymphocytes pour une réponse aux radiations qui va surtout provoquer l'inflammation du tissu conjonctif. En effet, dermites et rectites peuvent-elles être fidèlement prédites par l'analyse de la réponse des lymphocytes qui, par la taille de leur noyau et de leur cytoplasme, n'ont pas la même radiosensibilité que des fibroblastes ?
 - Le laboratoire d'accueil se focalise donc depuis sa création sur la réponse aux radiations de fibroblastes humains non-transformés en phase de plateau. Là encore, cette démarche qui a beaucoup de contraintes, est à contre-courant de la pratique d'autres laboratoires qui favorisent l'utilisation de lignées qui poussent très rapidement mais sans s'assurer de contrôler les artéfacts causés par les facteurs évoqués ici (Granzotto, Joubert et al. 2011). Ces choix ont été illustrés et argumentés entre le laboratoire et le clinicien dans la publication suivante *Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose ? C R Biol. 2011 Feb;334(2):140-57. doi: 10.1016/j.crv.2010.12.018.*

3.1.2. Les acquis du laboratoire d'accueil depuis 2003

3.1.2.1. Une première corrélation quantitative entre radiotoxicité et CDB non réparées.

A partir de 2003, les techniques d'immunofluorescence appliquées à l'histone H2AX a permis d'utiliser cette protéine dans sa forme phosphorylée comme biomarqueur des CDB avec la capacité de détecter chaque CDB dans chaque noyau de cellule (Granzotto, Joubert et al. 2011). Toutefois, à l'époque, aucun élément ne permettait de déterminer si les foci pH2AX reflétaient toutes les CDB ou seulement, les CDB reconnues par la suture. Une dose de 1 Gy de rayons X produisant environ 40 CDB par cellule, cette technique extraordinairement sensible a permis aux radiobiologistes de mesurer pour la première fois des effets de l'ordre du mGy.

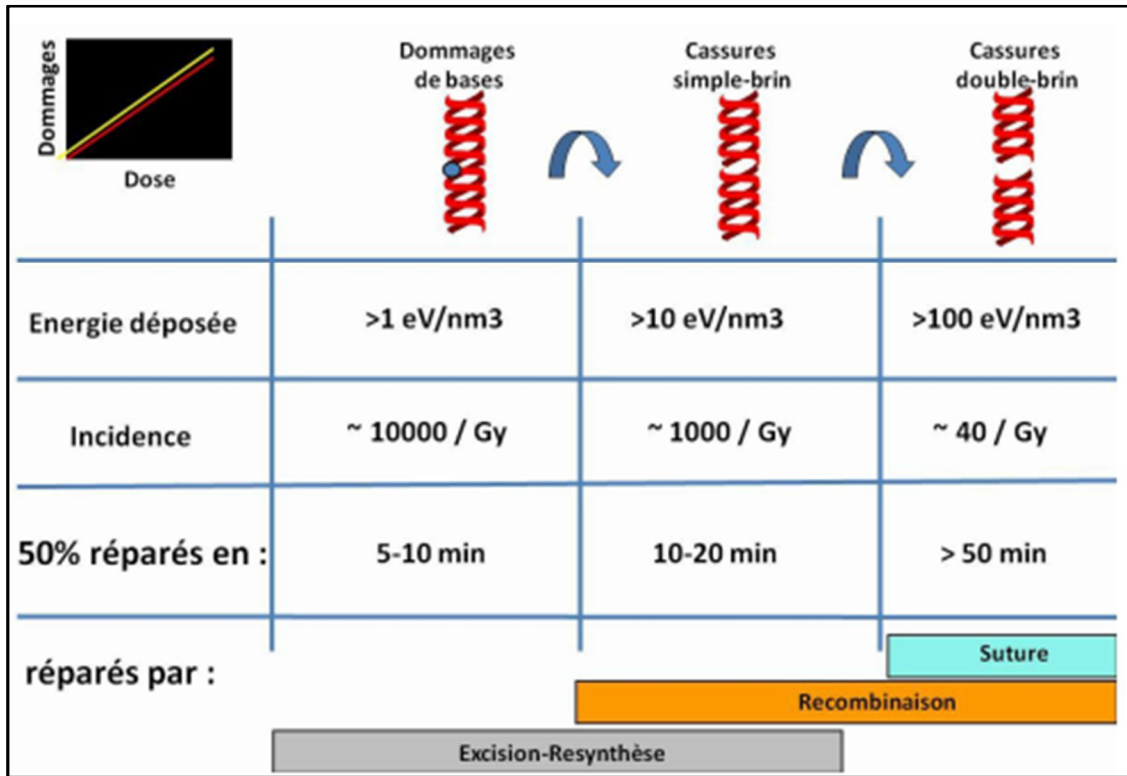


Tableau IV : Schématisation de type de lésion de l'ADN en fonction de l'énergie déposée (thèse de L.BODGI)

L'analyse des effets biologiques de doses de radiation compatibles avec certaines expositions professionnelles ou médicales devint alors possible. Depuis 1995 et la thèse du Dr Nicolas Foray puis à partir de 2003, le laboratoire d'accueil créé par Pr Jacques Balosso auprès de l'ESRF, synchrotron européen de Grenoble, commença à rassembler ce qui est aujourd'hui l'une des plus grandes collections de fibroblastes humains provenant de syndromes génétiques associés à une hyper radiosensibilité significative. A travers le projet sur fonds propres CELLINE, le laboratoire d'accueil entreprit d'étudier l'induction et le rythme de réparation des CDB en utilisant plusieurs techniques comme l'électrophorèse en champs pulsés et l'immunofluorescence pH2AX. En plus du marqueur H2AX, d'autres furent utilisés, notamment pDNA-PK et MRE11 pour mesurer respectivement l'activité kinase DNA-PK impliquée dans la suture et l'activité endonucléase MRE11 impliquée dans la recombinaison non-homologue (fautive). La distinction entre ces deux modes de réparation en G0/G1 avait déjà été évoquée à travers les artéfacts techniques observés en co-immunofluorescence (Rothkamm and Lobrich 2003).

En 2008, à partir de 40 lignées fibroblastiques représentant 8 syndromes génétiques différents, La valeur de la survie clonogénique à 2 Gy (SF2) (dose d'une séance de radiothérapie classique) apparut comme inversement proportionnelle au taux de CDB non réparées à 24 h, quelle que soit la mutation du gène considéré ou la technique utilisée. Cette loi semble également valable pour toutes les cellules de mammifères (Renier, Joubert et al. 2007). A la suite de ces résultats, le laboratoire d'accueil a proposé une première classification en 3 groupes (voir **Figure 20**) sur la base des valeurs de SF2, du taux de CDB non réparées 24h après une dose de 2 Gy quantifiée par le nombre de foci pH2AX et du taux de foci pMRE11: groupe I, radorésistance (situation normale) ; groupe II, radiosensibilité modérée ; groupe III : hyper-radiosensibilité (Joubert, Gamo et al. 2008).

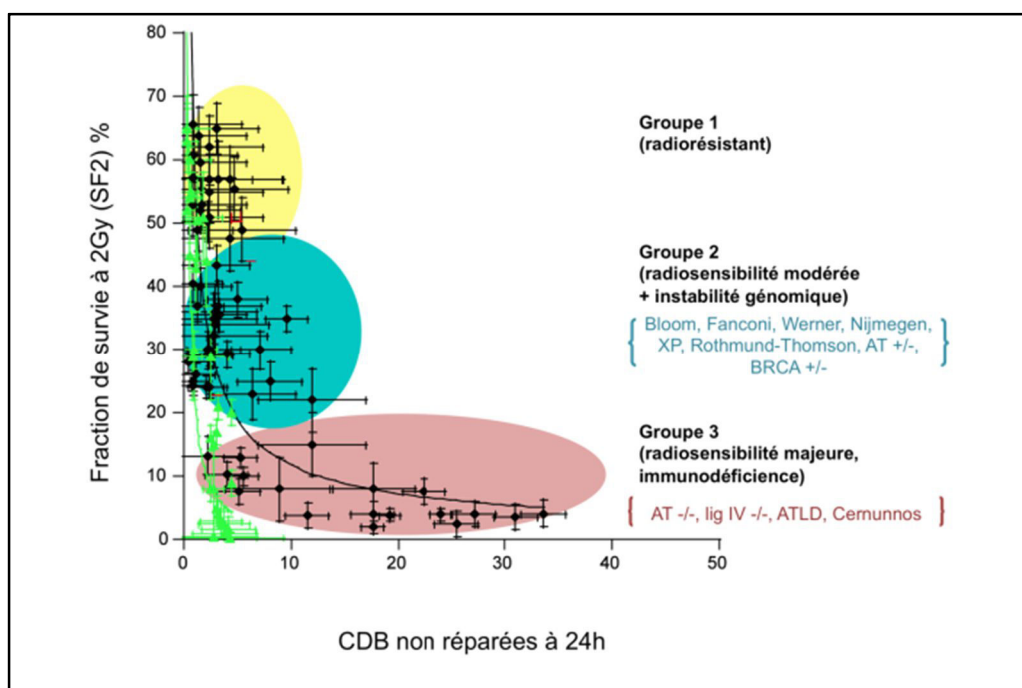


Figure 20: Classification en 3 groupes de radiosensibilité proposée par l'équipe du laboratoire d'accueil.

3.1.2.2. La genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

En parallèle du projet CELLINE qui se poursuit encore au laboratoire d'accueil, deux démarches furent entreprises :

- L'accumulation de données systématiques sur toutes les protéines qui forment des foci nucléaires, en particulier de pATM, marqueurs de l'auto (trans)phosphorylation de la protéine pATM.

- Le début d'une collecte de fibroblastes issus de patients traités par radiothérapie et ayant montré une hyper-radiosensibilité clinique significative sous la forme de réactions tissulaires inhabituellement importantes. Ce projet sur fonds propres fut appelé COPERNIC (Collection pour l'étude de la radiosensibilité au niveau clinique).

En accumulant un grand nombre de biopsies de peau (plus de 200 aujourd'hui), les premières conclusions sont les suivantes :

- *Plus que les foci pDNA-PK, les foci pATM sont très informatifs et suggèrent un transit cyto-nucléaire de la protéine après irradiation. Cette hypothèse est notamment renforcée par l'effet du traitement statines + bisphosphonates qui semble accélérer le transit d'ATM (Joubert, Gamo et al. 2008, Varela, Pereira et al. 2008).*
- *Les critères de sélection pour les groupes I, II et III définis précédemment apparaissent comme valables pour les cellules des patients de la cohorte COPERNIC.*

Ainsi, les données CELLINE et COPERNIC pouvaient alors être fusionnées dans un ensemble cohérent. Toutefois, nous avons dû proposer un modèle impliquant ATM pour mieux traduire l'importance de son transit. Dans notre modèle, les CDB sont prises en charge par « le mode majoritaire de réparation par suture » dont l'initiation passe par la phosphorylation ATM-dépendante de l'histone H2AX (pH2AX). En cas de retard du transit, les CDB sont soit non-reconnues donc non-réparées par suture soit pourraient être prise en charge par « le mode minoritaire de réparation fautive » de type recombinatoire dépendant de la nucléase MRE11 et inhibée par le passage de ATM dans le noyau. L'équilibre entre ces deux modes est donc contrôlé par la protéine ATM à travers son transit du cytoplasme dans le noyau et son activité kinase. Les foci nucléaires pMRE11 indiqueraient alors un arrêt de l'activité nucléasique de MRE11 (Joubert and Foray 2006, Joubert and Foray 2007, Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014) (**Figure 21**).

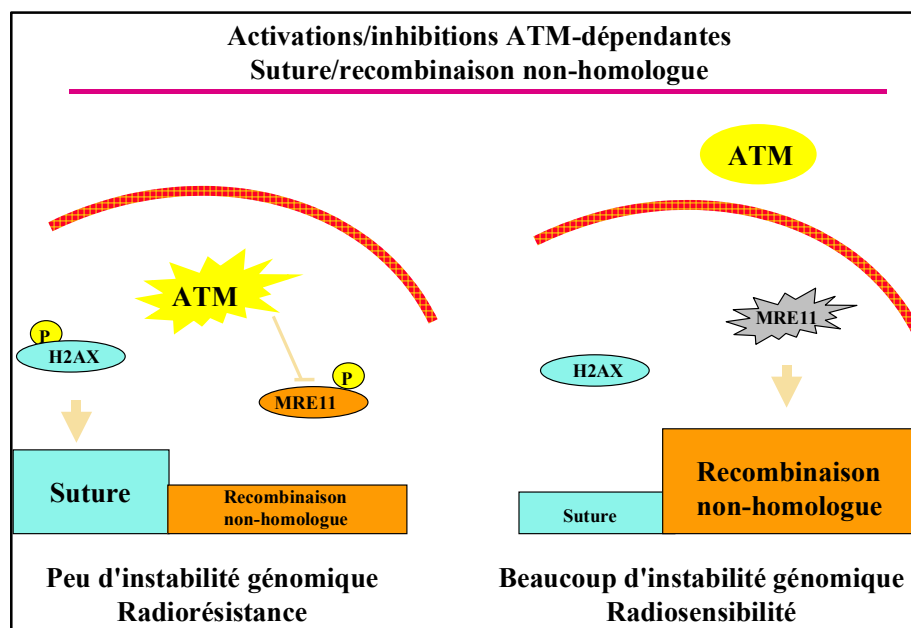


Figure 21: Notre modèle pATM/MRE11/pH2AX dans des cellules en G0/G1

3.1.2.3. La genèse de l'étude des effets des statines et des bisphosphonates

En 2008, à travers une collaboration avec l'unité 910 Inserm dirigée par Nicolas Levy, le groupe de radiobiologie a contribué à montrer les effets antioxydants d'un traitement combiné de statine et bisphosphonates (traitement qui a été nommé ZOPRA pour zolédronate + pravastatine) sur des fibroblastes issus de patients souffrant du syndrome progéroïde d'Hutchinson-Gilford (mutations de la lamine A) dans un article publié dans Nature Medicine (Joubert, Gamo et al. 2008) en collaboration avec le laboratoire d'accueil. Cet article montre notamment que les statines et bisphosphonates diminuent le nombre de CDB spontanées observées généralement dans les cellules progéroïdes. L'une des explications avancées est que ce traitement inhiberait la farnésylation de la lamine A et permettrait ainsi d'augmenter la perméabilisation de la membrane nucléaire.

Toutefois, les expériences ne concernaient pas des cellules irradiées et l'hypothèse avancée ne concernait que l'intérieur de la membrane nucléaire ou le noyau lui-même. L'application du même traitement à d'autres syndromes associés à des radiosensibilités significatives (progeria, neurofibromatose de type I, maladie de Huntington ou maladie de Bruton) a suggéré non

seulement l'efficacité des statines et des bisphosphonates pour radio protéger mais suggère une action de ce traitement dans le cytoplasme puisqu'à l'exception de la progeria, tous les syndromes testés sont causés par des mutations de protéines cytoplasmiques. Nous reviendrons sur ce point important dans la discussion.

Des tests spécifiques pour déterminer la part des statines et des bisphosphonates dans cet effet radio protecteur du ZOPRA a conclu à une synergie entre les deux médicaments.

B. Buts de la thèse et démarche scientifique

1. Deux constats généraux

1 La réalité des effets indésirables causés par la radiothérapie et les différentes formes qu'ils peuvent prendre. En particulier, la toxicité tissulaire lorsqu'elle est grave peut être aujourd'hui une situation pouvant justifier une déclaration aux autorités de santé voire une procédure en réparation médico-légale. Cette réalité nous impose de développer une approche de prévention des risques qui tienne aussi compte des risques propres à chaque patient, comme corollaire à une véritable personnalisation des traitements.

2 - Les bases biologiques de la radiosensibilité sont de mieux en mieux connues, grâce aux développements technologiques mais aussi aux progrès conceptuels réalisés dans le cadre des recherches sur la réparation et la signalisation des CDB. A ce titre, le laboratoire d'accueil propose une théorie originale basée sur le transit cyto-nucléaire de la protéine ATM qui permettrait de mieux prédire les phénomènes de radiosensibilité individuelle.

Ces deux constats, l'un fondé sur les réalités cliniques et l'autre sur des découvertes biologiques nous ont incité à développer dès 2008 au moment de notre master 2 à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1, une démarche d'analyse objective des marqueurs de la toxicité et des déterminants de son apparition d'une part dans le cas du foie irradié (Article 1) et d'autre part dans le cas de l'encéphale irradié (Article 2). Il s'agit là de deux travaux purement cliniques.

2. Cheminement d'une logique clinique

Puis, plus particulièrement dans le cadre de ce travail doctoral, nous nous sommes intéressés aux fondements biologiques des effets toxiques sévères de la radiothérapie. Nous avons commencé par une approche méthodologique, contribuant à standardiser le recueil clinique des biopsies de peau de patients radiosensibles, contribution technique à la cohorte COPERNIC. Puis nous avons participé à la réflexion sur les tests les plus appropriés à la détection des anomalies de la radiosensibilité. Pour répondre à cette question, une revue approfondie a été menée au laboratoire d'accueil afin de recenser toutes les techniques et paramètres qui pourraient servir à quantifier la radiosensibilité (Article 3). Cette analyse

collective nous a permis de sélectionner une catégorie de tests prédictifs basés sur l'immunofluorescence de marqueurs de la réparation et de la signalisation des CDB.

Enfin nous avons abordé l'étude de quelques aspects des mécanismes pathologiques par l'angle de l'intervention clinique en se fondant sur l'hypothèse d'un rôle important du trafic intracellulaire d'ATM dans l'efficacité de la réparation des CDB et par conséquent de la radiosensibilité tissulaire et cellulaire. En particulier, à la fois des publications scientifiques et des travaux récents du laboratoire d'accueil ont suggéré que les statines et les bisphosphonates pourraient avoir des effets radioprotecteurs par la restauration du transit cyto-nucléaire d'ATM lorsqu'il est défaillant (article 4). Ainsi, les tests d'immunofluorescence γ H2AX/pATM/MRE11, déjà utilisés pour prédire la radiosensibilité, s'imposaient logiquement pour l'étude de la modulation de la réponse aux radiations ionisantes par l'usage de statines ou de bisphosphonates.

Dans ce cadre nous, sommes ensuite revenus à la clinique et nous avons étudié l'impact clinique possible des statines sur la réduction de la radiosensibilité rectale dans la radiothérapie des cancers de prostates (Article 6) puis l'effet d'une combinaison statine – bisphosphonates sur le syndrome de sénescence pathologique associée à une forte radiosensibilité qu'est la progéria (Article 5). A la suite de ces études, la question des mécanismes d'une radioprotection par les statines a été posée. Nous avons approfondi cet aspect en caractérisant, pour la première fois à notre connaissance, les paramètres radiobiologiques de fibroblastes humains non transformés du rectum et l'influence des statines sur ces paramètres dans ce que nous appelons ci-après le projet HERACLES (Article 6 synthétisant les constatations cliniques et biologiques).

Ainsi, cette thèse est-elle basée sur un aller-retour du patient au laboratoire. Nous sommes partis du questionnement clinique des effets secondaires de la radiothérapie, puis avons exploré des interventions pharmacomodulatrices de la radiosensibilité en passant par la contribution à l'étude et l'appropriation de certains aspects fondamentaux de la réponse moléculaires des cellules humaines à l'irradiation ionisante.

C. RESULTATS

Ce travail de thèse, a permis de réaliser le développement de l'accessibilité aux tests de radiosensibilité clinique pour les radiothérapeutes. Ceci a été réalisé au cours de la première année de thèse en constituant et en diffusant une procédure standardisée de prélèvement associée à un kit de biopsie (voir annexe 7).

Ce travail a permis d'amplifier l'expérience acquise en multipliant les prélèvements grâce à la mise en place d'un réseau de collecte de biopsies de patients radiosensibles. Cette démarche s'appuie sur une analyse algorithmique séquentielle et standardisée des éléments radiobiologiques conduisant à des conclusions quantitatives. La traduction en termes qualitatifs permettant à un clinicien de prendre une décision afin d'arriver à une véritable situation « d'examen complémentaire » de radiobiologie clinique.

La validation du concept clinique et théorique au laboratoire constitue une preuve fondée du cheminement logique de cette thèse.

1. Résumé des travaux antérieurs

Article 1

Simultaneous in-field boost for patients with 1 to 4 brain metastases treated with volumetric modulated arc therapy with or without surgery: a prospective study on quality-of-life.

Damien C. Weber (1,2)*, Francesca Caparrotti (1), Mohamed Laouiti (1) and Karim Malek (1).

Radiat Oncol. 2011 Jun 30;6:79. doi: 10.1186/1748-717X-6-79

Résumé

Ce travail a consisté à évaluer la toxicité du traitement et de la survie ainsi que la qualité de vie (QV) des patients après arc thérapie volumétrique modulée (VMAT) avec un boost simultané (SIB) pour les patients atteints de cancer avec une à quatre métastases cérébrales (BM) traités avec ou sans chirurgie.

Entre Mars et Décembre 2010, 29 patients BM (BM volume total, <40 cm³) ont été évalué selon des critères internationaux de prise en charge des métastases cérébrales notamment l'indice de Karnofsky, l'âge, et le score RPA.

Il s'agit d'une étude prospective d'une cohorte de patients âgés de <80 ans, KPS \geq 70, RPA <III. Le traitement à l'aide de la VMAT a consisté à délivrer au cerveau entier (30 Gy) et un SIB à la BM (40 Gy) en 10 fractions, 1 fraction par jour, 5 fractions par semaine, pendant deux semaines.

L'âge moyen était de $62,1 \pm 8,5$ années. Quinze patients (51,7%) ont subi une intervention chirurgicale. Le KPS et le MMSE ont été prospectivement évalués. Un questionnaire d'auto-évaluation a été utilisé pour évaluer la qualité de vie (EORTC QLQ-C30 avec module BN20).

Après un suivi moyen de $5,4 \pm 2,8$ mois, 14 (48,3%) patients sont décédés. La survie globale à 6 mois était de 55,1%. Une alopecie n'a été observée que chez 9 (31%) patients. Chez les survivants à 3 mois, le KPS était significativement ($p = 0,01$) diminué. Le score MMSE est toutefois resté stable ($p = 0,33$). Dans l'ensemble, la qualité de vie a baissée après VMAT. Le

statut moyen QLQ-C30 de la santé globale ($p = 0,72$) et les scores fonctionnels émotionnels ($p = 0,91$) ont bien diminué (faible qualité de vie). Le score physique ($p = 0,05$) et celui du fonctionnement ($p = 0,01$) étaient significativement pires et avaient rapidement diminué au cours du traitement. La majorité des domaines BN20 aggravée 3 mois après la VMAT sauf les céphalées ($p = 0,046$) et le contrôle de la vessie ($p = 0,26$) qui ont été améliorés.

Cette étude a permis de conclure que 40 Gy délivrés en 10 fractions avec un boost intégré sur 1 à 4 métastases cérébrales utilisant le VMAT est possible sans aucune toxicité aiguë significative. La qualité de vie et le statut de performance à 3 mois ne se sont pas améliorés mais plutôt aggravés. Le MMSE, néanmoins, a eu tendance à s'améliorer après traitement.

Ce travail a permis de prendre conscience que le choix des critères d'évaluation de la toxicité n'était pas idéal pas plus que le modèle des métastases cérébrales pour une étude à moyen long terme.

En effet l'étude de la toxicité cérébrale suite à l'irradiation, ne pouvant pas être déterminée à ce jour par IRM, ou par des tests neurologiques objectifs, une caractérisation radiobiologique s'avère pour l'instant impossible.

Ce travail permet une prise de conscience sur les modèles à choisir.

Article 2

Correlation of Dosimetric Parameters with Subclinical Liver Function Test Alterations after Radiotherapy for Upper Gastrointestinal Tract Tumors

K. Malek, H. Zhang , Y. Boudam , M. Colonna , R. Sihanath , C. Rebischung & J. Balosso.

doi:10.5539/ccco.v3n2p70

URL: <http://dx.doi.org/10.5539/ccco.v3n2p70>

Résumé

Ce travail a consisté à collecter rétrospectivement des données biologiques et dosimétriques des patients traités par radiothérapie externe pour des tumeurs digestives sus-méso coliques. Cette étude a pour but de déterminer une corrélation entre les désordres biologiques hépatiques et les caractéristiques dosimétriques du foie sain irradié en tant qu'organe à risque.

Il s'agit d'une cohorte de 169 patients traités entre 2002 et 2008 par radiothérapie externe conformationnelle 3D pour des tumeurs sus méso coliques où le foie est un organe sain. L'étude a porté sur la confrontation des histogrammes dose-volumes et des données biologiques telles que les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, GGT et PA) et les marqueurs tumoraux (CA19.9 et ACE) avant puis à 1, 3 et 6 mois du traitement. La significativité d'un désordre biologique a été définie par un taux élevé de plus de 1.5 x la normale. L'étude statistique a été basée sur les paramètres du modèle de Lymann.

Les résultats de cette étude ont montré que sur 38 dossiers de patients retenus, 11 patients ont montré un désordre des fonctions hépatiques (RILD). Aucun désordre n'a été observé au-delà de 6 mois.

Les résultats sont conformes à la description Burman. Les profils dosimétriques des cas de toxicité sont différents et une corrélation apparaît entre la survenue d'une RILD et le niveau de doses administrées au foie. Le V40Gy est le paramètre dosimétrique le plus prédictif de ces changements subcliniques de la fonction hépatique.

En conclusion, bien que les paramètres dosimétriques soient prédictifs d'un trouble biologique hépatique, le modèle de Lyman n'est pas prédictif de ces troubles légers tout à fait différents d'une fibrose ou d'une hépatite radique grave.

Article 3

Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif (s) choisir ?

Adeline Granzotto ^{a, b, 1}, Aurélie Joubert ^{c, 1}, Muriel Viau ^a, Clément Devic ^a, Mira Maalouf ^{a, d}, Charles Thomas ^a, Guillaume Vogin ^{a, b, e}, **Karim Malek** ^f, Catherine Colin ^{e, g}, Jacques Balosso ^{b, f}, Nicolas Foray ^{a, *}

doi:10.1016/j.crvi.2010.12.018

Résumé

Le traitement par radiothérapie externe est prescrit sur une base de données épidémiologique dont la dose est déterminée par référence aux prescriptions habituelles, cependant, le patient subit une irradiation dite « modèle connu » dont la réponse est personnelle.

La réponse individuelle aux radiations ionisantes serait une donnée utile pour réaliser un traitement radiothérapie efficace contre la tumeur tout en évitant les complications dans les tissus sains.

En 1981, Fertil et Malaise démontrèrent que l'évaluation de la survie clonogénique de cellules irradiées issues d'une biopsie pouvait prédire la radiocurabilité des tumeurs. De plus, ces auteurs ont rappelé le bien-fondé du concept de radiosensibilité intrinsèque spécifique à chaque individu, organe ou tissu (Fertil et Malaise, 1981) (Varela, Pereira et al. 2008).

Plusieurs groupes de recherche ont tenté de déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité pour proposer des tests prédictifs fiables et plus rapides que les protocoles de survie clonogénique. La révolution récente de la génomique a fourni de nombreuses données mais leur lien avec la radiosensibilité reste insuffisant.

Le dépistage de certaines mutations de gènes ne suffit pas à décrire toute la radiosensibilité humaine. Les approches consistant à examiner certaines fonctions biologiques comme la réparation de l'ADN paraissent plus prometteuses pour prédire les réactions suraigües

survenant au cours ou après une radiothérapie. Dans cette revue, ont été analysées les contributions majeures pour l'approche de la prédiction de la radiosensibilité humaine.

Dans cet article nous avons aussi analysé la réparation de l'ADN après irradiation sur les fibroblastes cutanés de ces patients. On a constaté que la meilleure approche de détection de la radiosensibilité était le test pH2AX-MRE11.

Article 4

Impact of the nucleo-shuttling of the ATM protein in the response to radiotherapy: towards a molecular classification of human radiosensitivity

Adeline Granzotto^{1*}, Guillaume Vogin^{1,2*}, Clément Devic¹, Mélanie Ferlazzo¹, Larry Bodgi^{1,3}, Laurène Sonzogni¹, Muriel Viau¹, Aurélie Etaix¹, **Karim Malek**¹, Marie-Thérèse Zabet⁴, Aurélie Joubert⁵, Anne Vincent¹, Nicole Dalla Venezia¹, Michel Bourguignon⁶, Edmé-Philippe Canat⁷, Bernard Talon⁷, Anne D'Hombres⁸, Ronan Tanguy⁸, Estelle Thébaud⁹, Pierre Souteyrand¹⁰, Daniel Orbach¹¹, Dominique Stoppa-Lyonnet¹¹, Raouf Radgi¹², Eric Doré¹³, Yoann Pointreau¹⁴, Carmen Llacer-Moscardo¹⁵, Céline Bourcier¹⁵, Pierre Leblond¹⁶, Anne-Sophie Defachelles¹⁶, Cyril Lervat¹⁶, Stéphanie Guey¹⁷, François Gilsoul¹⁸, Claire Berger¹⁹, Coralie Montcharmont¹⁹, Marie-Virginie Moreau-Claeys², Nicole Chavaudra²⁰, Isabelle Martel-Lafay²¹, Cécile Laude²¹, Ngochanh Hau-Desbat²¹, Amira Ziouéche²¹, Frédéric Baleyrier²¹, Bertrand Fleury²¹, Marie-Pierre Sunyack²¹, Séverine Racadot²¹, Pascal Pommier²¹, Line Claude²¹, Renaud de Crevoizier²², David Azria¹⁵, Jean-Marc Simon¹⁷, Pierre Verrelle²³, Yazid Belkacemi²⁴, Jean Bourhis²⁵, Eric Lartigau¹⁶, Christian Carrie²¹, Alain Puisieux¹, Jean-Léon Lagrange²⁴, Jacques Balosso²⁶, Nicolas Foray^{1§}

¹INSERM, UMR1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France; ²Centre Alexis Vautrin, Nancy, France; ³Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; ⁴Centre de Biotechnologie Cellulaire, Hospices Civils de Lyon, France; ⁵CEA, Cadarache, France; ⁶Autorité de Sûreté Nucléaire, Paris, France; ⁷Clinique Jean-Mermoz, Lyon, France; ⁸Hôpital Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France; ⁹Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ¹⁰Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France; ¹¹Institut Curie, Paris, France; ¹²Centre Joliot-Curie Rouen, France; ¹³Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France; ¹⁴Centre Jean-Bernard, Tours, France; ¹⁵Institut du Val d'Aurelle, Montpellier, France; ¹⁶Centre Oscar-Lambret, Lille, France; ¹⁷Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹⁸Hôpital Saint Joseph, Charleroi, Belgique; ¹⁹Centre Hospitalier Universitaire, Saint-Etienne, France; ²⁰Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; ²¹Centre Léon-Bérard, Lyon, France; ²²Centre Eugène-Marquis, Rennes, France; ²³Centre Jean-Perrin, Clermont-Ferrand, France; ²⁴Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ²⁵Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse; ²⁶ Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 GRENOBLE cedex 9.

* The two authors have equally contributed to this work

Soumission en cours

Résumé

Ce travail a consisté à la quantification de la radiosensibilité humaine observée par le clinicien en étudiant la toxicité des tissus sains. Ces tissus ont été étudiés indépendamment de la tumeur primitive de type de réaction tardive ou précoce. Dans cette étude le grade étiquetant la réponse induite englobe les différents tissus et par conséquent ceci affaiblie l'hypothèse (manque de caractérisation).

Depuis 2013, nous avons recueilli des centaines de biopsies de la peau de patients traités par radiothérapie pour différentes localisations tumorales présentant des réactions anormales. L'objectif de la présente étude était d'établir des liens entre les paramètres moléculaires et cliniques de toxicité radio-induits en tenant compte des niveaux de toxicité – grades – de l'échelle CTCAE et RTOG.

L'exploration a été faite par immunofluorescence sur un ensemble de fibroblastes de la peau de 11 patients qui ont présenté une radiorésistance non expliquée, 6 hyper-radiosensibles et 100 patients qui ont eu une réaction d'hypersensibilité. Ces fibroblastes ont été irradiés à 2 Gy et observés à 10 min et 1, 4 et 24 h après l'irradiation: la quantité de micronoyaux, de foci de γ H2AX et de patm nucléaire reflète les différentes étapes de la reconnaissance de l'hypersensibilité et de réparation ce qui a permis d'évaluer et classer ces réactions en fonction de la gravité.

Les réactions d'hypersensibilité chez ces patients ne présentent pas nécessairement un défaut de réparation des CDB (cassure double brin), ce qui est en contradiction avec les paradigmes qui considèrent que la réparation des CDB seule est le meilleur prédicteur de la radiosensibilité. A l'inverse, les patients qui ont suscité un retard systématique de la nucléo-shuttling de la protéine ATM nécessaire pour une reconnaissance complète des CDB ont présenté un retard de réparation.

Le nombre de micronoyaux et des foyers nucléaires γ H2AX et patm est corrélé au degré de sévérité de ces réactions d'hypersensibilité anormales observées en clinique.

Ces résultats sont compatibles avec un classement général de la radiosensibilité humaine basée sur trois groupes: radiorésistance (groupe I); radiosensibilité modérée causé par le retard de nucléo-shuttling de l'ATM qui inclus les patients qui sont hypersensibles type (groupe II) et hyper-radiosensibilité causée par un défaut de réparation de CDB (groupe III).

Article 5

Prenylation inhibitors partially rescue normal ATM-dependent DNA repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome cells

Sandrine Pereira¹, Catherine Massart¹, Adeline Granzotto¹, Muriel Viau¹, Mélanie L. Ferlazzo¹, Clément Devic¹, **Karim Malek**, Pierre Cau², Nicolas Lévy^{2,3*} and Nicolas Foray^{1,3*}

Soumis

Résumé

Le syndrome de Hutchinson-Gilford progeria (HGPS), est une maladie caractérisée par un vieillissement prématuré important causé par une mutation hétérozygote spécifique dans le gène LMNA. Cette mutation conduit à la production de progerin qui correspond à la prélamine A privée de 50 acides aminés mais ayant conservé son ancrage par farnésylation. Récemment, nous avons fourni la preuve que l'inhibition de la prénylation de la progerin grâce à la pravastatine et au zolédronate (ZoPra), reverse partiellement le phénotype de vieillissement et les défauts de la réparation des cassures double-brin (CDB) induites par les rayons X dans la lignée cellulaire HGPS. Ici, nous avons étudié la phosphorylation induite par les rayons X sur les principaux substrats d'ATM intervenant dans la réparation des DSB et les voies de signalisation dans les fibroblastes HGPS. HGPS présente un défaut précoce d'activité kinase ATM qui a pour conséquence un défaut de reconnaissance des DSB, l'inhibition précoce de la kinase DNA-PK et la sur activation de la voie de réparation des DSB MRE11-dépendante conduisant ainsi à une hyper-radiosensibilité et une instabilité génomique. Une des conséquences de cette inhibition cellulaire est une altération de la phosphorylation de CHK2. Ces phénotypes ont été partiellement ou totalement reversés par le ZoPra. Nos résultats suggèrent que la présence de progérine altère le nucléoshuttling d'ATM et réduit l'activation de la réparation de l'ADN ATM-dépendante et les voies de signalisation associés.

2. Résultats cliniques

2.1. Résultats radiobiologiques, caractérisation radiobiologique du tissu rectal

Rationnel

Après avoir identifié la possibilité d'une implication des statines dans les rectites, telle que décrite dans la littérature et observée dans la cohorte que nous avons étudiée, une approche du concept radiobiologique sous-jacent paraissait nécessaire.

En absence d'une réelle étude prospective clinico-radiobiologique, une vérification au laboratoire du comportement de composantes cellulaires représentatives du tissu rectal a été réalisée.

En rapport avec les événements récents liés à la radiosensibilité qui démontrent de plus en plus que les CDB non réparées peuvent induire la mort cellulaire et que les CDB mal réparées augmentent le risque de cancer (Jeggo and Lobrich 2007, Joubert, Gamo et al. 2008), les corrélations entre le nombre des CDB non réparées *in vitro* et la mort cellulaire clonogénique ont été établies (Joubert, Gamo et al. 2008). Des liens solides avec la radiosensibilité clinique ont été confirmés. La quantité des CDB radio-induites peuvent être déterminer facilement par le nombre de foci nucléaires formés par la phosphorylation des histones (pH2AX) en r immunofluorescence (Fertil and Malaise 1981).

Les foci pH2AX reflètent les CDB reconnues par la voie de suture non homologue « non-homologous end-joining » (NHEJ) qui est la voie majeure de réparation des CDB chez les mammifères.

Récemment le laboratoire d'accueil a mis en évidence que les radiations ionisantes induisent un transit d'ATM du cytoplasme vers le noyau qui est une étape primordiale à la reconnaissance des CDB avant de les réparer (Bodgi, Granzotto et al. 2013, Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014).

Nous avons constaté que l'adjonction d'un traitement par une statine et un bisphosphonate ZOPRA accélère le nucleoshuttling de l'ATM vers le noyau en augmentant ainsi la radiorésistance des cellules (Rothkamm and Lobrich 2003, Varela, Pereira et al. 2008).

Concernant l'effet potentiellement radioprotecteur des statines, celui-ci est de plus en plus rapporté dans la littérature surtout dans des essais précliniques (Haydont, Gilliot et al. 2007, Holler, Buard et al. 2009, Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014). Ceci est prometteur quant aux possibilités futures d'agir utilement sur les lésions radiques.

Les statines semblent de plus en plus prescrites notamment chez les patients âgés et les patients traités par radiothérapie externe pour un cancer de la prostate.

Des progrès techniques notables ont été à l'origine d'une baisse de la rectite radique notamment avec l'avènement de la radiothérapie par modulation d'intensité associées aux progrès du repositionnement de la cible (Nubel, Damrot et al. 2006, Zilli, Rouzaud et al. 2010, Zilli, Jorcano et al. 2011). Néanmoins la rectite radique, de grade 2 et plus, touche encore 15% des patients traités par radiothérapie prostatique (Jorcano, Molla et al. 2010).

Dans cette étude, nous tentons de documenter l'effet de radioprotection joué par les statines dans le cadre de la radiothérapie du cancer de la prostate en testant une lignée de fibroblaste rectal comme modèle de tissu sain irradié.

Matériels et méthodes

Lignées cellulaires utilisées

On a choisi des fibroblastes pour leurs stabilités génomiques, et pour éviter les difficultés d'interprétation introduites par les lignées transformées. HIF ou Human Intestine Fibroblasts, provenant du laboratoire de Sciencell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) isolés à partir d'un tissu intestinal fœtal. Un deuxième type de fibroblaste, déjà bien documenté, les fibroblastes HF19, ont été décrits ailleurs et ont été isolés à partir de tissu de poumon fœtal humain (Foray, Priestley et al., 1997). Les cellules ont été cultivées en routine sous forme de monocouches avec du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Gibco-Invitrogen, France, Cergy-Pontoise, France) complété avec 20% de sérum bovin fœtal, de la pénicilline et de la streptomycine. Toutes les expériences ont été effectuées avec des cellules en phase de croissance en plateau (90 à 99% en G0/G1) pour éliminer les effets du cycle cellulaire (Foray, Priestley et al. 1997). A noter qu'il n'y avait pas de différence significative dans la distribution dans les phases du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires testées, soit spontanément, soit jusqu'à 24 h après l'irradiation (données non présentées). Les principales caractéristiques radiobiologiques de la HF19 sont sa radiorésistance et sa nature non transformée. Les lignées

AT5BI (ATM^{-/-}) et 180BR (LIG4^{-/-}) ont été utilisées comme références d'hyper-radiosensibilité (Foray, Priestley et al. 1997, Joubert, Gamo et al., 2008).

Irradiation

L'exposition aux rayonnements ionisants a été faite sur un faisceau de 6MV de photons produits par un irradiateur type SL15 Philips au centre Léon Bérard à Lyon, France. La dose délivrée était de 2 Gy avec un débit de 6 Gy.min⁻¹, ce qui élimine toute possibilité de réparation des CDB pendant l'irradiation.

Le traitement ZOPRA

Le traitement qui a été appliqué est l'association du zoledronate et de la pravastatine (ZOPRA) comme précédemment publié (Nanda, Chen et al. 2013). Brièvement, les cellules ont été incubées avec 1 µM de pravastatine (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin-Fallavier, France) dans du PBS pendant 24 h à 37 °C. Par la suite, le zoledronate à 1 µM (Sigma-Aldrich, France) dans du PBS a été ajouté dans le milieu de culture et les cellules ont été incubées pendant 12 h à 37 °C. Le milieu de culture a été renouvelé immédiatement avant l'irradiation.

Immunofluorescence

Le protocole d'immunofluorescence a été décrit par ailleurs (Varela, Pereira et al. 2008). Brièvement, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante et ont été perméabilisées dans 0,5% de Triton X-100 solution pendant 5 minutes à 4°C. Les incubations d'anticorps primaires et secondaires ont été réalisées pour 40 et 20 min à 37°C, respectivement. L'anticorps anti-γ-H2AXser139 (clone JBW301; Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) a été appliqué à 1:800 ; l'Anti-pATMser1981 (clone 10H11.E12; Millipore, Allemagne), l'anti-MRE11 (# 56211; QED Bioscience Inc., San Diego, Etats-Unis) et l'anti-HTT (3H2241, Santa Cruz Biotechnology Inc., de Santa Cruz-, USA) ont été utilisés à 1:100. Les incubations avec IgG anti-souris conjuguées à la fluorescéine (FITC) et IgG anti-lapin conjuguées à la rhodamine (TRITC), anticorps secondaires caprins (Sigma, Saint Louis, USA) ont été réalisées à 1:100 à 37 °C pendant 20 min. Les lames ont été marquées au 4', 6' Diamidino-2-phényl-indole (DAPI) (Vectashield, Eurobio-Abcys, Courtaboeuf, France) et examinées en microscopie à fluorescence. Le DAPI a

aussi permis d'évaluer indirectement la distribution dans le cycle cellulaire : en G1 (noyaux avec coloration homogène DAPI), les cellules en phase G2 (noyaux hétérogènes avec coloration DAPI) et en métaphase (chromosomes visibles) (Foray, Marot et al. 2003). Afin d'éviter toute confusion liée aux artéfacts de co-immunofluorescence, nous avons délibérément choisi d'appliquer l'immunofluorescence avec un seul marqueur (immunofluorescence séparés) (Renier, Joubert et al. 2007).

Analyse mathématique

Les données de réparation des CDB ont été ajustées à la formule dite de Bodgi qui décrit la cinétique d'apparition / disparition des foci nucléaires formés par certaines protéines après un stress génotoxique (Foray, Marot et al. 2003). En bref, le nombre de foci nucléaires $N(t)$, à une dose donnée D et à un temps de post-irradiation (t), est donné par:

$$N(t) = ID \left(1 - \frac{1}{1 + b_{\text{rec}} t} \right)^{a_{\text{rec}}} \left(\frac{1}{1 + b_{\text{rep}} (t - t_0)} \right)^{a_{\text{rep}}} \quad (2)$$

Dans lequel:

- I est le nombre de foyers induits par Gy
- a_{rec} et b_{rec} sont les paramètres de taux de reconnaissance
- a_{rep} et b_{rep} sont les paramètres de taux de réparation
- t_0 représente le délai entre la reconnaissance et le processus de réparation

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA, USA).

Résultats :

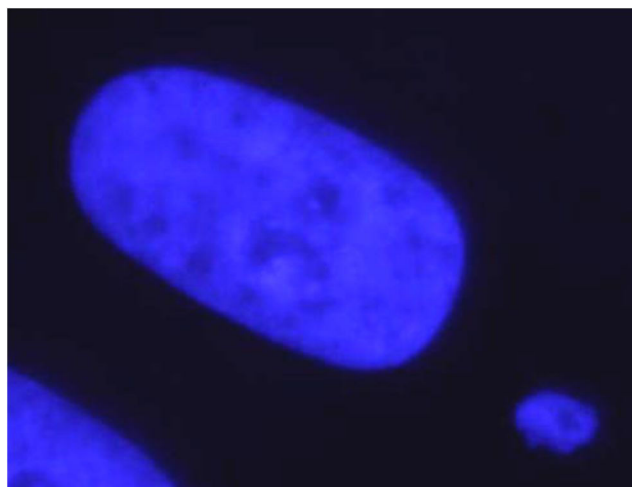


Figure 22 : Exemple de cellule avec un micronoyau.

Les micronoyaux radio-induits sont les conséquences de cassures de l'ADN non réparées qui se propagent tout au long du cycle cellulaire conduisant à des fragments chromosomiques irréversiblement séparés et causant la mort mitotique (Bodgi, Granzotto et al. 2013). Les micronoyaux (**Figure 22**) représentent le critère cytogénétique le mieux corrélé avec la mort cellulaire et la géno-toxicité (Grote, Joshi et al. 1981).

Dans les fibroblastes du rectum, le nombre de micronoyaux spontanés ou résiduels, restants après 24 h post-irradiation, sont de $2,2 \pm 0,4$ et 25 ± 5 , respectivement, ce qui suggère une sensibilité sévère aux rayonnements.

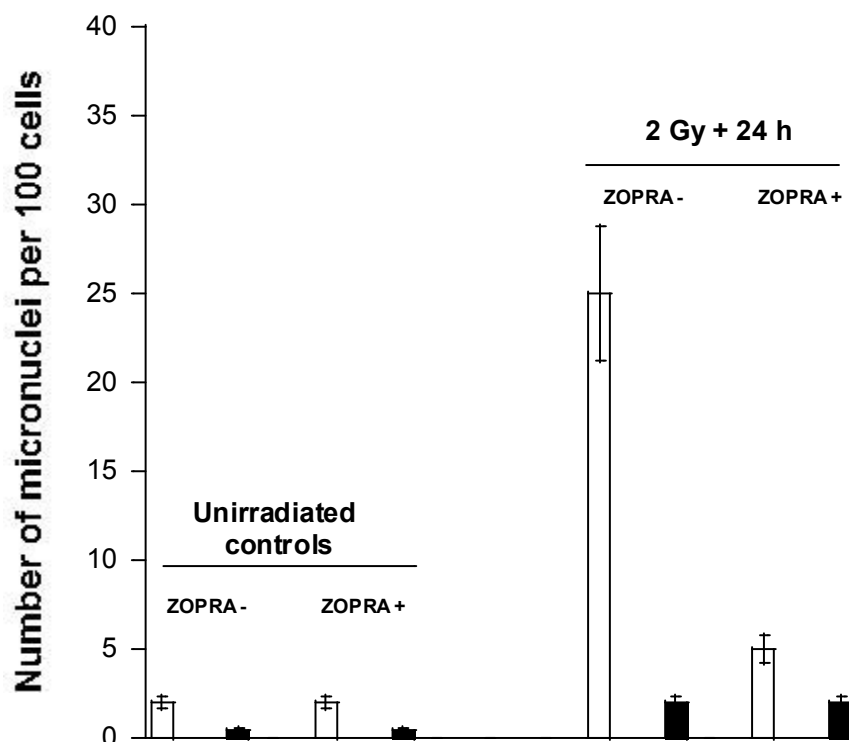


Figure 23 : Effet du traitement ZOPRA sur le nombre des micronoyaux après irradiation (barres vides cellules HIF et barres pleines HF19).

Par comparaison, dans les fibroblastes pulmonaires radiorésistants, les données correspondantes ont été de $0,2 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) et $2,0 \pm 0,4$ ($p < 0,001$), respectivement.

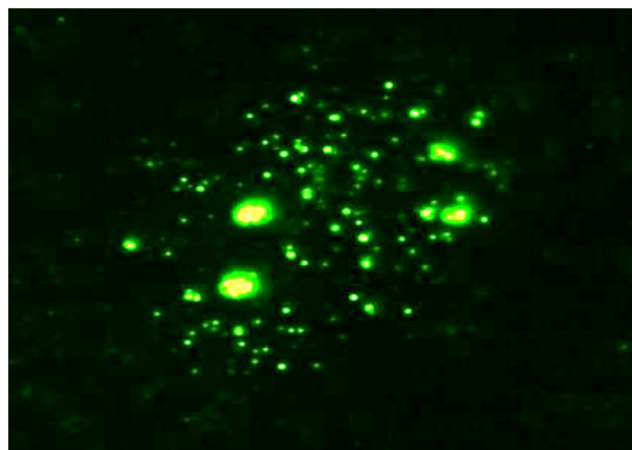
Le traitement ZOPRA n'a pas changé le nombre de micronoyaux spontanés dans les fibroblastes rectaux ($p = 0,7$). En revanche, il diminue considérablement le nombre de micronoyaux résiduels post-irradiation (5 ± 2 ($p < 0,001$)) (**Figure 23**). Le traitement ZOPRA n'a pas d'effet significatif sur le nombre de micronoyaux dans les fibroblastes pulmonaires radiorésistants spontanés ou résiduels ($p > 0,8$).

Les traitements pour les statines et les bisphosphonates accélèrent la reconnaissance et la réparation des CDB gérées par NHEJ dans les fibroblastes rectaux.

Le nombre moyen de foci γ H2AX spontanés observés dans les fibroblastes rectaux étaient de $0,5 \pm 0,4$ γ H2AX foci par cellule (i.e. non significativement différent des fibroblastes

radiorésistants : $0,2 \pm 0,5$ γ H2AX foyers; $p = 0,1$). Le traitement ZOPRA n'a aucun effet significatif sur le nombre de foci γ H2AX spontanés pour les deux types de cellules étudiées (**Figure 24 A**). Les cinétiques de disparition des foci γ H2AX radioinduits sont généralement composées de deux phases: l'augmentation des foci γ H2AX observée dans les premières heures post-irradiation qui reflète la reconnaissance des CDB, puis la diminution des foci γ H2AX qui reflète la phase de réparation des CDB (Grote, Joshi et al. 1981). Dans les fibroblastes radiorésistants, le nombre de foci γ H2AX marqués immédiatement après 2 Gy était de 74 ± 9 par cellule, en très bon accord avec la valeur 37 ± 4 pour 1Gy par cellule publiée précédemment (Bodgi, Granzotto et al. 2013). Le nombre de foci γ H2AX radioinduits marqué immédiatement après 2 Gy dans les fibroblastes du rectum a été systématiquement inférieur (46 ± 3 $p < 0,01$), suggérant une reconnaissance retardée (**Figure 24 B**). Les fibroblastes rectaux ont également montré des quantités significativement plus élevées de foci γ H2AX persistants à 24 h après l'irradiation par rapport aux témoins radiorésistants ($2,8 \pm 0,15$ et $3,3 \pm 0,14$ foci par cellule, respectivement), suggérant ainsi un taux de réparation réduit des CDB ($p < 0,01$) (**Figure 24 B**). Cependant, en comparant ces données avec celles obtenues à partir des lignées hyper-radiosensibles $ATM^{-/-}$ et $LIG4^{-/-}$, une telle déficience de réparation des CDB est intermédiaire, suggérant une radiosensibilité significative mais modérée (**Figure 24 B**). Fait important, le traitement ZOPRA corrige partiellement le retard de reconnaissance des CDB des fibroblastes rectaux, ce qui suggère que les effets du traitement ZOPRA s'exercent sur l'activité de la protéine ATM kinase induite par le rayonnement (**Figure 24 B**).

A



B

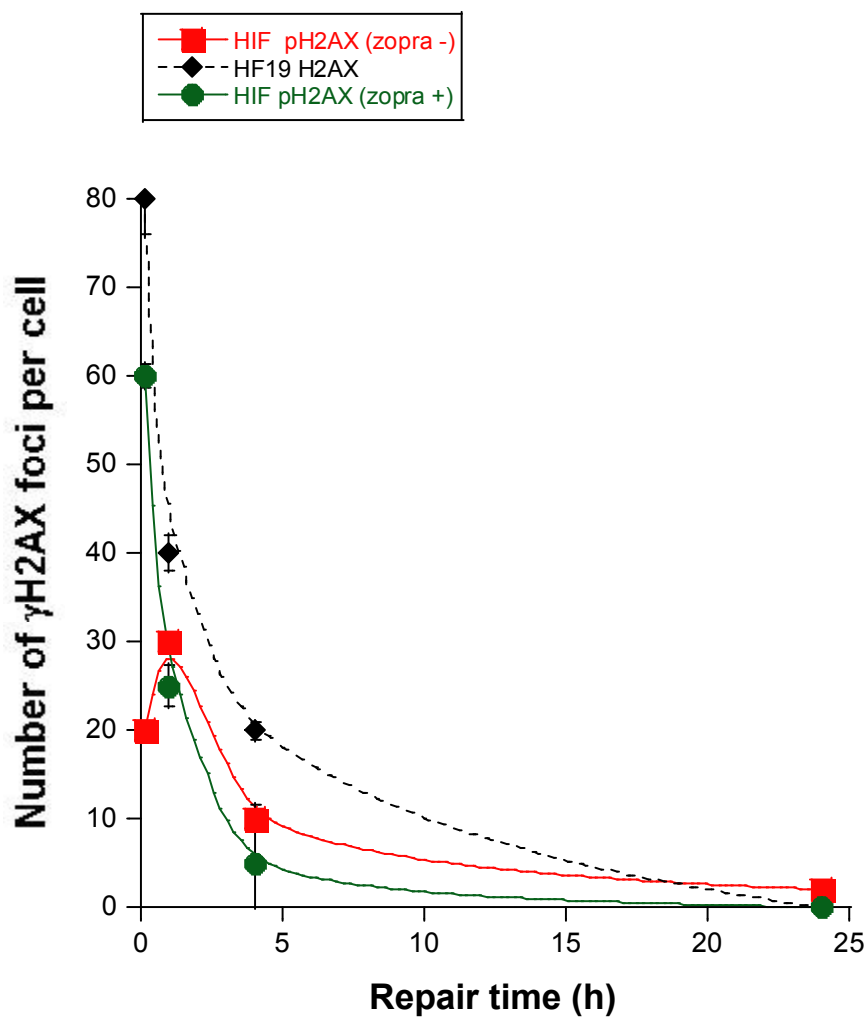


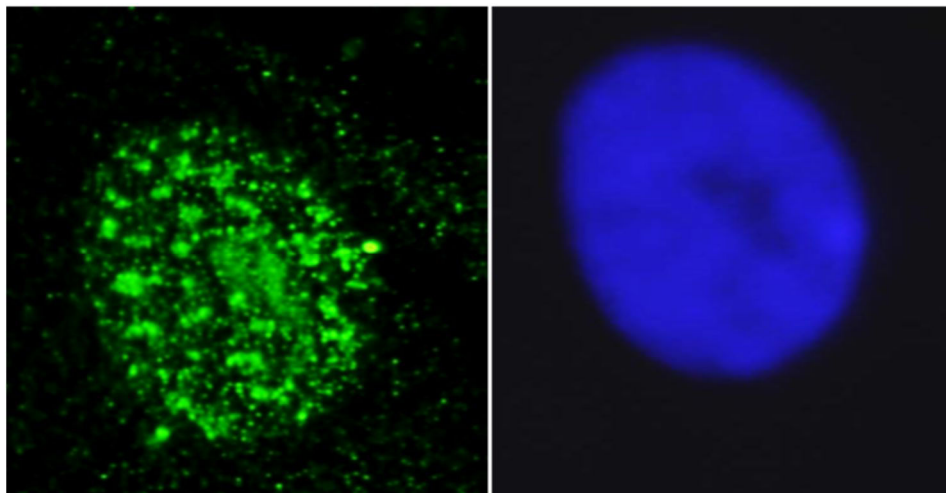
Figure 24 : A. distribution des foci γ H2AX (photos); B. cinétique des foci γ H2AX

Le traitement par des statines et bisphosphonates influe directement le transit radioinduit d'ATM dans les fibroblastes rectaux.

L'activité kinase d'ATM a été examinée par immunofluorescence en utilisant des anticorps contre l'autophosphorylation d'ATM (pATMser1981) (Joubert, Gamo et al. 2008). Dans les fibroblastes radiorésistants non irradiés, les foci pATM furent cytoplasmiques (**Figure 25 A**). Une exposition à 2 Gy a entraîné une formation précoce de foci pATM dans le noyau: plus de 40 foci pATM ont été observés à 10 min après l'irradiation, en accord avec les observations antérieures (Bakkenist and Kastan 2003).

Ce nombre de foci nucléaires diminue progressivement avec le temps de réparation. Dans les fibroblastes du rectum, tandis que la localisation des foci pATM spontanés est apparue similaire à celle des fibroblastes radiorésistants, le nombre de foci pATM par cellule observé 10 minutes après l'irradiation a été trouvé significativement plus faible avec une large et intense coloration nucléaire (23 ± 7 et $43,8 \pm 8$ foci pATM par cellule, respectivement; $p < 0,01$). (**Figure 25 B**). En outre, la cinétique d'apparition / disparition des foci pATM est apparue significativement différente de celle des fibroblastes radiorésistants avec un maximum atteint entre 1 et 4 heures après l'irradiation (**Figure 25 B**). Au total, ces données suggèrent un retard dans le transit radioinduit de ATM qui peut expliquer la baisse de rendement des foci de γ H2AX décrite ci-dessus. Fait intéressant, comme pour les micronoyaux et γ H2AX foyers, le traitement ZOPRA conduit à corriger partiellement le retard du transit d'ATM (**Figure 25 B**).

A



B

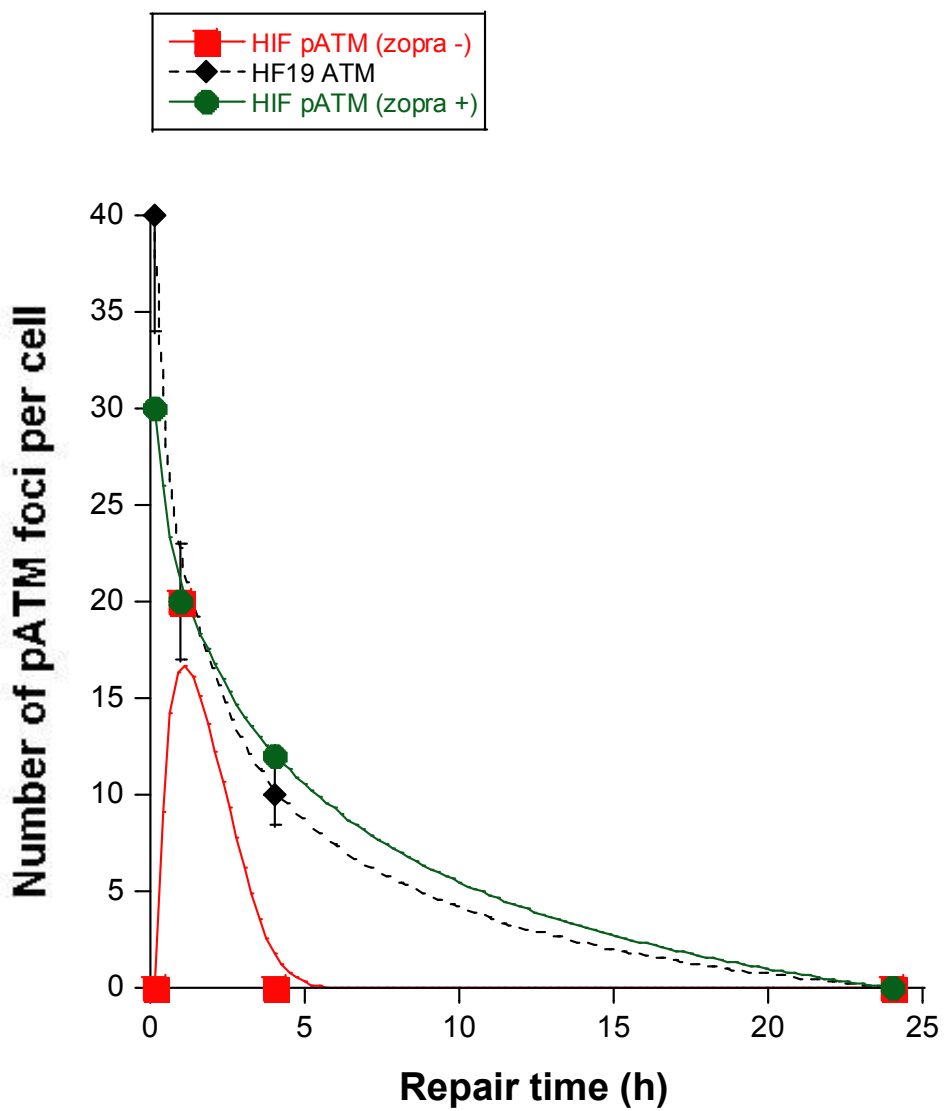


Figure 25 A. aspect en immunofluorescence pATM ; B. cinétique des foci pATM

Les statines contribuent de manière significative à l'effet de radioprotection du traitement ZOPRA

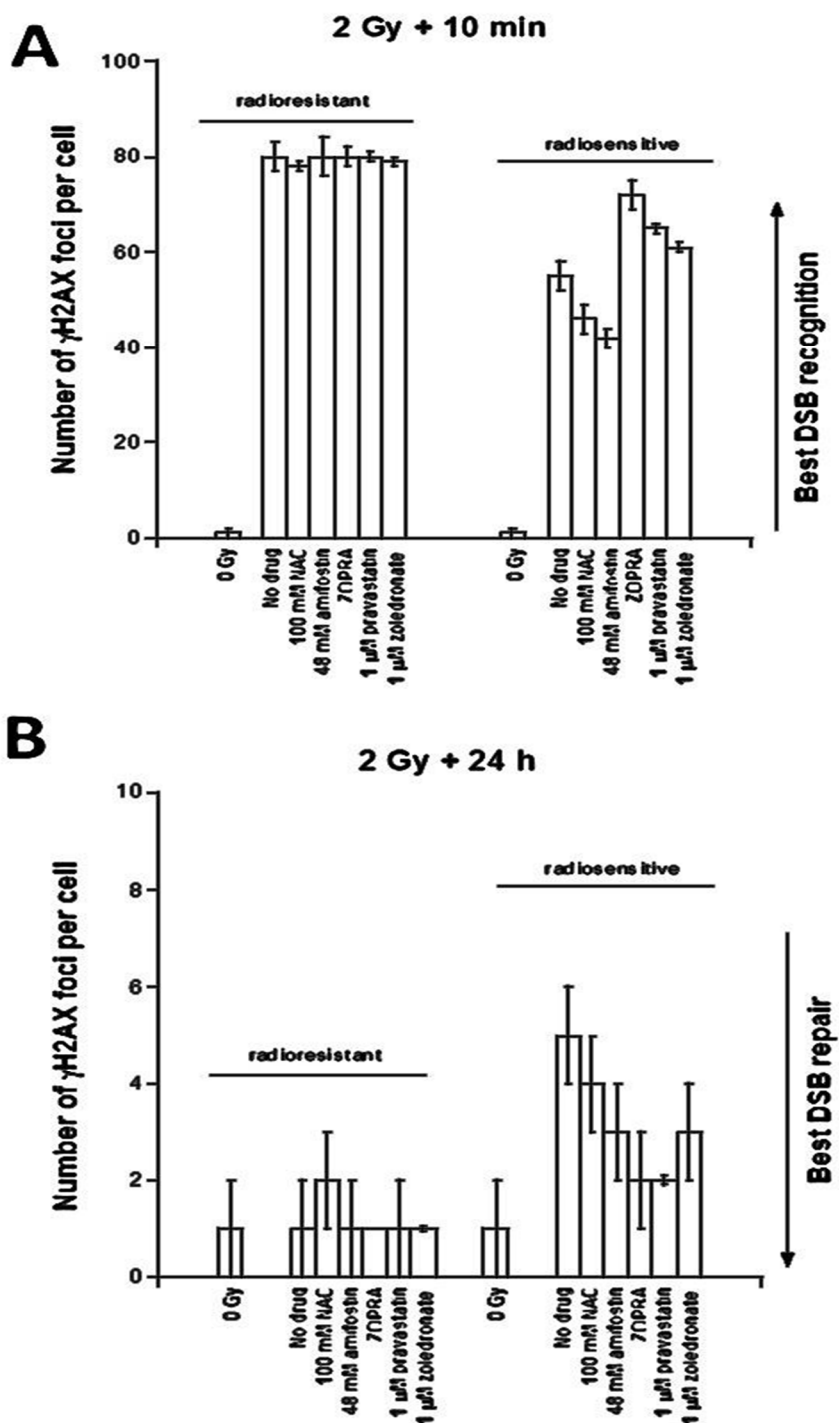


Figure 26 : Effets de substances candidates pour un effet de radio protection comparés au ZOPRA après irradiation de cellules HIF.

L'impact du traitement ZOPRA été observé de la même façon pour pATM et γ H2AX dans les cellules HIF comme dans d'autres tissus (peau, poumon, cerveau), en particulier lorsque les cellules sont radiosensibles (données non présentées). Toutefois, la contribution exacte des statines dans la combinaison ZOPRA restait à étudier. En appliquant à des fibroblastes radiosensibles et radiorésistants représentatifs, des agents anti-oxydants les plus fréquemment utilisés, telles que la N-acétylcystéine (NAC), l'amifostine et une statine (pravastatine) et un bisphosphonate (zolédronate) séparément, nous avons quantifié l'effet radioprotecteur potentiel de ces médicaments. Encore une fois, l'effet des agents anti-oxydants et des composants du ZOPRA est négligeable dans les cellules radiorésistantes. Inversement, le ZOPRA, les statines et les bisphosphonates pris séparément semblent posséder des propriétés de radioprotection importantes, notamment pour une meilleure reconnaissance des CDB. Cependant, bien que la contribution relative des statines soit forte, la combinaison ZOPRA a montré des propriétés de radioprotection accrues (**Figure 26**). Ainsi, alors que nos données radiobiologiques sont encourageantes et puisque les patients subissant une radiothérapie du cancer de la prostate ne sont pas nécessairement traités par la NAC, l'amifostine ou les bisphosphonates, mais plutôt par statine, généralement à cause d'une hypercholestérolémie, nous avons étudié l'effet radioprotecteur des statines in vivo dans la partie suivante.

2.2. Etude clinique : statines et rectite radique dans la radiothérapie des cancers de prostate

Rationnel

Il s'agit de rechercher une corrélation négative entre la prise de statine et la survenue d'une rectite radique après radiothérapie d'un cancer de la prostate. Cette corrélation pourrait appuyer l'hypothèse que les statines pourraient corriger les éventuelles hypersensibilités responsables de la survenue des rectites radiques chez les patients n'ayant pas de caractéristiques anatomiques ou dosimétriques pouvant expliquer cette complication.

Matériel et méthode

Il s'agit d'une cohorte de patients traités par radiothérapie conformationnelle 3D externe (RTE-3D). Le recul était d'au moins 5 ans. Les patients traités par curiethérapie, IMRT, ou avec des critères dosimétriques prédictifs d'un risque élevé de rectite (diamètre rectale supérieure à 6 cm, ou DVH avec un V50% rectale > 50Gy) ont été exclus. Rétrospectivement, les données cliniques, les médicaments pris, notamment statines, les rectites (de grade 0, 1, 2 et 3 selon la classification RTOG / CTCAE) ont été comparés aux données dosimétriques: le volume rectale, le diamètre rectale, les valeurs V25% et V50% des histogrammes dose-volume. Les données ont été traitées de façon descriptive et une analyse statistique a été effectuée en utilisant les tests de corrélation de Pearson et Spearman, de régression multimodale et le test de chi².

Résultats

La période de recrutement s'est étendue de 2003 à 2008, 176 patients traités par RTE-3D ont été recensés, 66 dossiers ayant une dosimétrie informatique complète et accessible (changement de logiciel au cours de la période d'étude) ont pu être exploités et inclus dans cette étude. L'âge moyen est de 69 ans ; le recul de 6 à 60 mois, la médiane 2,5 ans; 35 % des patients ont eu une prostatectomie radicale avant l'irradiation (PR), parmi ceux-ci 22% étaient R1; 5% des patients ont eu une résection transurétrale. Cette population était également répartie entre les stades T1, T2 et T3 et majoritairement N0 (91%). Le score de Gleason à 7 était le plus fréquent, 37% des cas. Les résultats carcinologiques à 5 ans sont caractérisés par une survie globale de 100%, un taux de contrôle local aussi de 100% et une survie sans rechute de 98.5% (une seule rechute, de nature métastatique). Parmi ces patients, 21% présentaient une hypercholestérolémie traitée par statine et 19% étaient sous antiagrégant plaquettaire, un tiers des patients recevant ces traitements avaient les deux médicaments simultanément ; 56% des patients étaient sous hormonothérapie. Dans le groupe sans statine (n=51), une rectite de grade 2 et plus a été observée dans 27.5% des cas (14 cas qui étaient grade 2 : n=6 et grade 3 : n=8), dans le groupe traité par une statine (n=14) 21.4% seulement des patients ont présenté une rectite de grade 2 et plus (3 cas qui étaient grade 2 : n=1 et grade 3 : n=2).

Etude descriptive

Nous avons étudié cette population qui est relativement homogène, par des tests simples d'homogénéité et de stratification dont les conclusions sont les suivantes :

Le Tableau I montre que les V50Gy et V25Gy, valeurs critiques pour la tolérance de la paroi antérieure du rectum à l'irradiation, sont homogènes et se distribuent de manière normale, voir Figure 1c&d, autour de médianes et de moyennes qui sont pratiquement superposables. A noter que cette population a par ailleurs une distribution parfaitement normale pour l'âge autour de la moyenne de 69 ans (données non présentées).

	âge	DoseRT (Gy)	vol_rectum (mL)	Diamètre rectal (cm)	V50Gy rectum (mL)	V25Gy rectum (mL)	Suivi (mois)
n	64	66	64	41	65	64	66
Moyenne	69,13	70,8015	100,7186	6,0390	46,8187	60,0515	35,9242
Médiane	70,00	71,3750	76,0550	6,0000	46,3000	62,9400	36,0000
Mode	72	64,00 ^a	62,50	5,60 ^a	47,00	70,00	36,00
Ecart-type	6,888	5,24692	69,34626	1,12046	27,02519	10,60819	11,05276

Tableau V : Caractéristiques et statistiques dose-volume de la population étudiée. La dispersion des valeurs dosimétriques concernant le rectum est faible et montre que les modalités de traitement de cette population sont très homogènes pour une pathologie pelvienne.

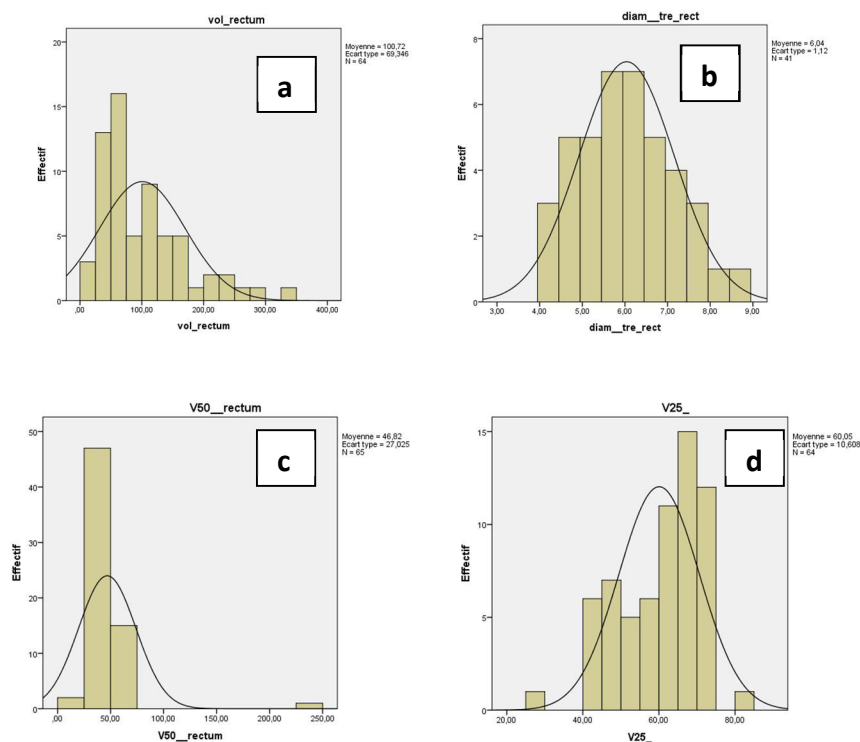


Figure 26 a à d : Distribution gaussienne des valeurs de volume rectal, diamètre rectal, V50Gy et V25Gy

Le Tableau II montre la distribution des effectifs selon la prise ou non d'un traitement par statines et la présence d'une rectite de grade de sévérité variable. On constate que pour chacun des deux sous-groupes définis par le traitement par statines, les taux de complications rectales sont très similaires avec une tendance globale, des patients sous statine, à avoir une toxicité moins fréquente et de gravité plus faible. Cependant cette population étudiée présente dans son ensemble une répartition inhabituelle des fréquences des différents grades de toxicité comme le montre la Figure 2. Les faibles grades étant moins représentés que les grades plus élevés alors que c'est habituellement le contraire qui est observé (Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014). On peut évoquer une possible sous-identification des toxicités les moins graves du fait du recueil rétrospectif et la tendance à ne mentionner dans les dossiers que les plaintes les plus évidentes des patients.

Effectifs n (%)	Traitement par statines		Totaux
	Non	Oui	
Grades de toxicité GI. 0	33 (64.7)	11 (78.6)	44
1	4 (7.8)	0 (0.0)	4
2	6 (11.8)	1 (7.1)	7
3	8 (15.7)	2 (14.3)	10
Total	51 (100)	14 (100)	65

Tableau VI: Effectifs selon les caractéristiques croisées : traitement par statine et rectite de grade variable. Dans chaque sous-groupe défini par le traitement, les taux de complications rectales sont très similaires avec une tendance globale des patients sous statine à avoir une toxicité moins fréquente et de gravité plus faible.

Le Tableau VII reprends les cas de rectites de grade ≥ 2 pour chaque sous-groupe de traitement par statine et montre que la fréquence des cas de rectite grave est un peu supérieure dans le groupe sans statine +6%.

	Rectite de $G \geq 2$	Pas de Rectite	Pourcentages de rectites	IC 95%
Statine	3	11	21.4%	1 to 43%
Pas de Statine	14	37	27.5%	15 to 40%

Tableau VII: Cas de rectites de grade ≥ 2 pour chaque sous-groupe de traitement avec ou sans statine. La fréquence des cas de rectite grave est un peu supérieure dans le groupe sans statine de +6%. Les intervalles de confiances montrent que cette différence n'est pas significative pour ces effectifs.

Etudes de corrélation

Corrélation pour la population générale

		statines	Toxicité_GI
Statines	Corrélation de Pearson	1	-0,076
	Sig. (bilatérale)		0,548
	N	65	65
Toxicité GI	Corrélation de Pearson		1
	Sig. (bilatérale)		
	N		

Tableau VIII: Le test de Pearson pour l'ensemble de la population montre que la corrélation entre le traitement par statines et la toxicité rectale est négative à la hauteur de -7,6% avec une p (ici donné par sigma) non significatif à 0.55.

Corrélation dans le sous-groupe affecté par la toxicité de grade 2 et 3

		statines	Toxicité_GI
Statines	Corrélation de Pearson	1	0,074
	Sig. (bilatérale)		0,778
	N	17	17
Toxicité GI	Corrélation de Pearson	0,074	1
	Sig. (bilatérale)	0,778	
	N	17	17

Tableau IX : Le test de Pearson restreint à la seule population affectée par la toxicité sévère de grade 2 et 3 regroupées montre que la corrélation entre le traitement par statines et la toxicité rectale est non significative p = 0.78.

Corrélation entre les paramètres dosimétriques et la toxicité

	Moyenne Dose RT (Gy)	Vol rectal (mL)	Diamètre rectal (cm)	Vol du V25Gy (mL)	Vol du V50Gy (mL)
R+ G \geq 2	72	92,4235714	6,3125	59,41643	47,08571
R-	70,47	102,9	5,97	59,6	47,608
Ecart moy	0,765	5,23821429	0,17125	0,17125	0,17125
Ecart type	1,0818734	7,40795369	7,407953685	7,407954	0,242184

Tableau X: La distribution des valeurs dosimétriques prévisionnelles en fonction des événements toxiques ne montre aucune différence entre les groupes rectite ou non rectite de G \geq 2. Les paramètres prévisionnels des traitements ne sont pas associés à la présence ou non d'une toxicité, ce qui écarte l'hypothèse d'erreurs techniques de planification

Recherche de corrélations de confusion entre les paramètres dosimétriques

	Total dose	Rectal vol	Rectal diameter	V50 Gy	V25 Gy
Total dose	Pearson Corr. p (bilateral) n	1 - 031 808 66	160 317 41	- 020 875 65	389 0,001 64
Rectal vol	Pearson Corr. p (bilateral) n		1 934 0,000 41	- 185 144 64	- 634 0,000 63
Rectal diameter	Pearson Corr. p (bilateral) n			1 - 0,116 472 41	- 0,489 0,001 40
V50 Gy	Pearson Corr. p (bilateral) n				1 173 170 64
V25 Gy	Pearson Corr.				1

Tableau XI: Corrélations avec les valeurs dosimétriques, contrôle de qualité de la dosimétrie.

On constate dans cette étude complémentaire les corrélations attendues entre les différentes variables dosimétriques prises en compte pour la planification du traitement. En effet sont significativement corrélés la dose totale et le volume anatomique recevant plus de 25Gy (V25Gy) ; le volume rectal et son diamètre ainsi que la V25Gy ; et enfin le diamètre rectal et la V25Gy. L'absence de corrélation entre la dose totale et le V50Gy est rassurante car ce paramètre est contraint dans la planification du traitement et son absence de contrôle aurait pu expliquer la survenue de la toxicité pour des raisons purement anatomo-dosimétriques. Ce résultat peut être considéré comme un critère de qualité des traitements et permet d'écarter une influence de la dosimétrie dans la toxicité constatée.

Confirmation clinique de la relation entre la baisse de la sévérité des rectites et la prise de statine

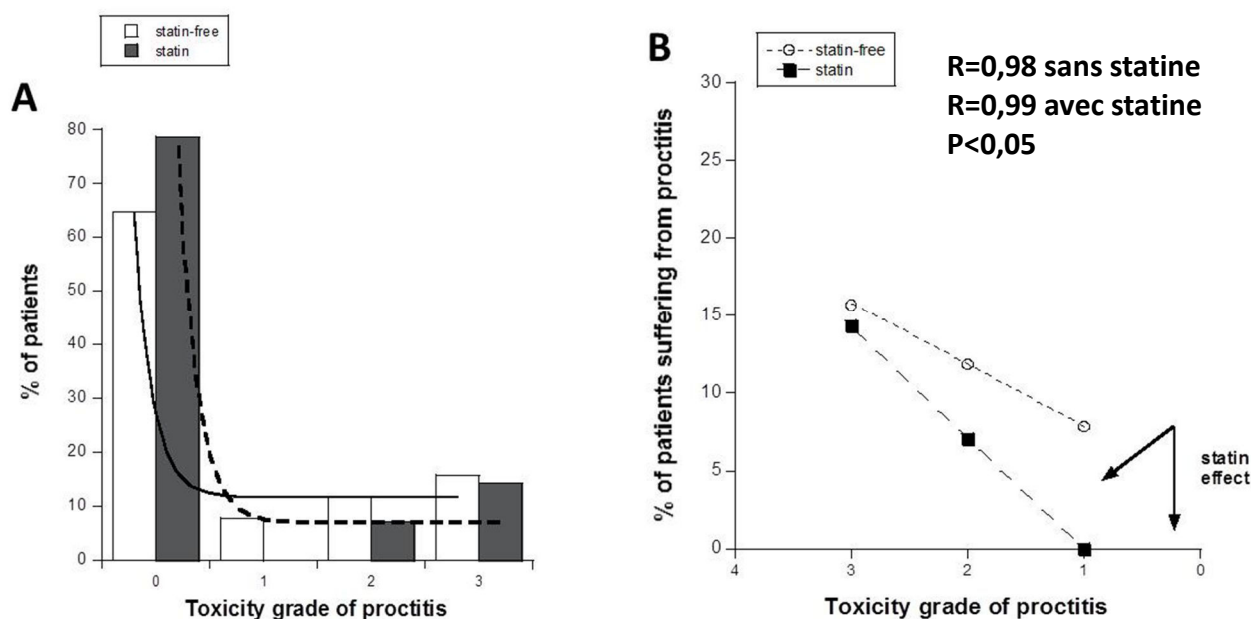


Figure 27 : Distribution des patients selon le grade des rectites (A) et régression de Spearman appliquée aux cas des patients atteints de rectite selon la prise de statines (B) selon les chiffres donnés dans le tableau VI.

A : Distribution des patients traités (en noir) et non traités (en blanc) par une statine en fonction de la sévérité de la rectite post radique. La cohorte indique plus de patients de Grade 0 de rectite sous statine que sans statine. Un phénomène de translation rétrograde de la courbe de sévérité est observé. Les courbes (Figure 27 A) montrent une tendance à la baisse de la sévérité de la rectite, avec une diminution du nombre des cas sévères et corrélativement une augmentation des cas de grade 0, ce qui pourrait être induit par les statines.

B. Régression linéaire des données observées en A : ce graphe montre une baisse du nombre des patients atteints de rectites post radiques de grade 3 lors de la prise de statines (coefficient directeur de 7.1% dans le groupe traité par statines versus 11.7% dans le groupe témoin) ce qui suggère une diminution de la sévérité des rectites dans le groupe traité par les statines. Pour ces deux population (avec ou sans statines) les facteurs de régression sont très élevés vis-à-vis du modèle linéaire (proches de 1 avec 0.99 et 0.98) ce qui signifie que la relation entre la sévérité des toxicités et leur fréquence est effectivement linéaire dans ces populations.

Ceci autorise la comparaison des coefficients directeurs de ces droites de régression par le test de Spearman qui met en évidence une différence significative en ces deux populations, avec un $p \ll 0.05$.

On peut ainsi conclure que la prise de statines est significativement corrélée à la diminution de la sévérité des rectites radiques.

D. Discussions et conclusions

1. Approche Globale

Certains auteurs ont étudié l'association statine et le profil de risque ou la fréquence du cancer de prostate (Josifovski, Tulic et al. 2009, Platz 2009) sans trouver d'influence significative; tandis que d'autres ont suggéré par des analyses rétrospectives de cohortes un impact favorable de l'utilisation des statines sur les résultats thérapeutiques des cancers de prostate (Platz, Tangen et al. 2014). Cependant dans la littérature il n'y a pas d'étude concernant l'éventuelle protection ou sensibilisation des tissus sains par ces médicaments. Notre étude pourrait être une première contribution en ce sens.

2. Cohorte

La différence entre les deux groupes étudiés ici est de 6% en faveur d'un effet modérateur de la sévérité des rectites par les statines.

L'effectif de cette population, 14 patients sous statine pour 52 sans statine, constituant une étude unicentrique dont l'interprétation reste délicate, contrebalancée par une très grande homogénéité des cas traités et des traitements effectués. En effet, tous les éléments de variation habituelle d'une radiothérapie ont été minimisés dans ce travail : même centre, même praticien très expérimenté, même recrutement institutionnel, même technique de traitement (l'étude a été volontairement limitée à une seule technique et arrêtée lors de l'évolution méthodologique du passage de la RT3D à l'IMRT). Cette homogénéité semble confirmée par la très faible dispersion des paramètres dosimétriques et permet *a priori* de considérer que les effets secondaires sont plutôt attribuables à la radiosensibilité des patients plutôt qu'à des variations techniques.

Dans ce contexte, où la qualité des résultats thérapeutiques confirme une approche conforme aux recommandations et aux attentes pour cette population, en revanche, il ne semble pas y avoir d'effets défavorables sur les résultats thérapeutiques qui sont excellents dans cette série comme régulièrement publié par le radiothérapeute responsable de ces traitements (Matzinger, Duclos et al. 2009, Kollmeier, Katz et al. 2011).

Concernant l'analyse statistique de cette cohorte, on constate des résultats différemment interprétables selon le type de test utilisé. D'une part, le test de Pearson, qui ne montre pas de corrélation entre la survenue de la rectite et la prise ou non des statines, alors que l'analyse de la distribution de la rectite dans les deux groupes, traité et non traité par statines, montre deux constats essentiels : au vu du graphe A de la figure 27, les patients sous statines sont plus nombreux à ne pas avoir de rectite (grade 0) et lorsqu'ils en ont une, elle est de grade moins sévère. Ceci suggère un effet protecteur des statines mais le test de Pearson est négatif tendant à écarter une corrélation entre sévérité des rectites et non prise de statines. D'autre part, le test de Spearman qui compare les fonctions qui relient sévérité des rectites avec leur fréquence montre une différence fortement significative en faveur d'un effet protecteur des statines.

A quoi est dû cette discordance ?

Le test de Pearson, dont l'hypothèse porte sur le coefficient de corrélation linéaire ρ de Bravais-Pearson pour n observations (cf formule ci-dessous), permet essentiellement de savoir s'il y a une relation directe entre deux variables, globalement ou valeur par valeur. En particulier, il n'y a pas de relation entre les variables lorsque $\rho=0$.

$$t = \frac{|r|}{\sqrt{\frac{(1-r^2)}{n-2}}}$$

où r est l'estimation empirique de ρ

Cette analyse ne permet pas de tenir compte des conditions de variation individuelle de chaque variable et d'en tenir compte le cas échéant pour les confronter. La conséquence de cela est une prise en compte très partielle de l'information contenue dans les résultats recherchés et une faible puissance d'analyse notamment dans le cas présent.

Ce qu'il faut faire !

Il faut analyser les données par une régression de Spearman qui prend en compte la fonction biomathématique qui relie entre elles les valeurs de chaque classe de variables puis secondairement comparer entre elles les fonctions. Cette comparaison est d'autant plus puissance que la corrélation entre les variations des variables et les modèles

biomathématiques sont fortes. En cas de très bonne corrélation la comparaison devient très sensible et prédictive. **C'est le cas dans notre étude et ceci nous a permis de conclure que les statines sont associées à une modération de la sévérité des rectites,** sans les faire complètement disparaître. Par ailleurs compte tenu des données mécanistiques sous-jacentes et démontrées auparavant, on peut évoquer une relation de causalité avec un effet réellement radioprotecteur des statines.

L'ensemble de ces résultats permet donc pour le clinicien de considérer que la prise de statines durant une radiothérapie pelvienne pour le traitement radical d'un adénocarcinome de prostate n'est pas délétère ni pour les résultats carcinologiques ni pour les risques d'effets secondaires. Au contraire, pour ce dernier point, il ressort de notre étude que les statines exercent un effet modérateur mais significatif de la sévérité des rectites qui pourrait mériter des études à plus grande échelle dans le cadre de la radiothérapie pelvienne et d'autres types de radiothérapies.

3. Médication et radiothérapie du cancer de la prostate

La présente étude, bien que très limitée, ne permet pas d'exclure que ces médications (statines et antiagrégants plaquettaires) puissent avoir un effet sur la tolérance à l'irradiation chez certains patients. Cependant la rareté prévisible du phénomène (probabilité d'avoir un trouble de la radiosensibilité et un traitement par statine et/ou antiagrégant) le rend probablement indétectable à l'échelle de la pratique clinique quotidienne. Néanmoins, dans la même logique radiobiologique, l'hypothèse d'une influence défavorable sur le contrôle tumoral doit inciter à approfondir la connaissance de l'influence de la prise de ces médicaments sur la radiosensibilité des tissus sains avant toute recommandation de pratique courante. Une preuve du concept est donc nécessaire à la suite des présentes recherches sur la prévention des rectites radiques. Alors que la partie clinique de cette hypothèse n'indique pour l'instant qu'une tendance positive à l'effet radio-protecteur des statines, la partie biologique tend cependant à confirmer la capacité des statines à modifier la réparation de l'ADN.

4 Approche radiobiologique (projet HERACLES)

Cette étude radiobiologique a permis un approfondissement de la recherche radiobiologie sur l'effet des statines sur la réparation des CDB. Les fibroblastes étudiés, issus du tissu gastro-intestinal, se comportent selon le modèle du transit nucléo-cytoplasmique d'ATM, ce qui rend

vraisemblable la possibilité d'effets radioprotecteurs des statines et des bisphosphonates. En effet ces molécules pourraient réduire la gravité des rectites radioinduites dans des cas de radiosensibilité liées à des anomalies du transit cyto-nucléaire d'ATM. La compréhension de ce phénomène ouvre l'opportunité d'utiliser des agents pharmaceutiques très répandus qui, certes, ont des effets secondaires, mais qui peuvent trouver ici une nouvelle indication, avec l'avantage de tests toxicologiques déjà validés. Peut-être qu'une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux aidera à proposer des combinaisons de médicaments radioprotectrices plus efficaces et bien tolérées.

Une approche novatrice de radioprotection: jusqu'à présent, toutes les stratégies de radioprotection clinique étaient basées sur la diminution du stress oxydatif par l'usage de thiols (comme l'amifostine), d'antioxydants primaires comme le N-acétylcystéine ou d'agents agissant sur le cycle du glutathion. Le principe général d'une telle approche est de diminuer le nombre de dommages de l'ADN en réduisant l'oxydation causée par l'irradiation mais aussi par l'instabilité endogène de certaines cellules au statut génétique particulier. Pourtant, si la réponse aux radiations est véritablement liée à la reconnaissance des dommages et à leur réparation, la réduction de leur nombre ne fera pas forcément disparaître tous les dommages irréparables qui sont des événements particuliers et assez rares. En effet, il a été démontré qu'il suffit de quelques CDB pour produire un événement létal dans un tissu : à terme, la seule réduction du stress oxydatif pourrait ne pas être efficace. Le principe d'utiliser des statines et des bisphosphonates relève d'une toute autre approche, basée elle sur la stimulation de la reconnaissance des CDB par le mode de réparation par suture et de leur réparation. Si on augmente le nombre de monomères d'ATM capables de diffuser dans le noyau, l'activité kinase sera plus importante, la reconnaissance plus rapide et la réparation plus efficace. C'est donc une nouvelle voie de radioprotection que nous ouvrons ici, dont le but à atteindre pourrait être la réduction de l'incidence des rectites ou de toutes autres formes de réactions tissulaires radiques.

Cette première approche a le mérite d'attirer l'attention des cliniciens sur l'impact de ces médicaments fréquemment prescrits et dont les effets multiples peuvent avoir diverses cibles dans la cellule saine ou néoplasique. Notamment la capacité d'interférer avec la farnésylation (Roy, Kung et al. 2011) des protéines intervient de manière importante dans la transduction des signaux de prolifération, ciblés par ailleurs par des médicaments beaucoup plus spécifiques tels que ceux ciblant les EGF-R.

Le modèle de transit cyto-nucléaire (*nucleoshuttling*) de la protéine ATM est aussi valide pour les fibroblastes digestifs. La protéine ATM est surtout cytoplasmique, or certaines réactions de radiosensibilité, telles que dans la neurofibromatose (Deschavanne, Debieu et al. 1986, Bolla, Fournier et al. 2008) et la maladie de Huntington, sont liées à des mutations de protéines cytoplasmiques. La forme cytoplasmique de l'ATM est décrite depuis plus de 15 ans (Lim, Kirsch et al. 1998, Yang, Halaby et al. 2011, Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014), le modèle de *nucleoshuttling* développé par des travaux récents de notre laboratoire confirme cette forme avec la mise en évidence de certaines interactions protéiques qui peuvent séquestrer la protéine ATM dans le cytoplasme ce qui peut entraver partiellement ou totalement la reconnaissance des CDB dans le noyau et par conséquent leur réparation (Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014).

Description du modèle de promotion et de régulation de la réparation des CDB dans le noyau par la translocation de la protéine ATM du cytoplasme dans le noyau (*nucleoshuttling*). Pour plus de fondements rationnels radiobiologiques, le modèle propose 6 phases traduisant la réponse à la radiothérapie :

- 1) l'irradiation produit un stress oxydatif diffus dans la cellule responsable des CDB, au niveau nucléaire et de la monomérisation de la protéine ATM cytoplasmique.
- 2) les monomères ATM transitent du cytoplasme vers le noyau
- 3) les monomères ATM reconnaissent les CDB par phosphorylation des histones H2AX;
- 4) Les CDB reconnues sont réparées
- 5) Les cassures CDB non reconnues et/ou non réparées conduisent probablement à une létalité cellulaire (Bodgi and Foray, soumis).
- 6) Les cellules exposées à une statine +/- un bisphosphonate (ZOPRA), lorsqu'elles sont irradiées montrent une augmentation précoce de la présence d'ATM dans le noyau et une meilleure cinétique de réparation des CDB. ZOPRA favorise la radiorésistance par l'accélération du transit cyto-nucléaire d'ATM après une irradiation (Bodgi, Granzotto et al. 2013, Ferlazzo, Sonzogni et al. 2014)

Les résultats obtenus avec les fibroblastes intestinaux HIF sont compatibles avec notre modèle de transit cyto-nucléaire d'ATM, comme pour les fibroblastes de la peau ou des poumons. On retrouve aussi les différentes étapes décrites ci-dessus. Dans notre expérience, certains autres tissus fonctionnent aussi selon ce modèle de transit cyto-nucléaire d'ATM:

c'est notamment le cas des cellules du cerveau (cortex cérébelleux et les astrocytes, cellules de Schwann, etc.) ou des cellules épithéliales mammaires. En ce qui concerne les lymphocytes et en tenant compte de la conformation particulière de ce type de cellule, l'immunofluorescence de pATM n'a pas montré clairement de transit cyto-nucléaire d'ATM pour toutes les lignées cellulaires testées (données non présentées). Il est également intéressant de noter que les cellules tumorales fonctionnent aussi selon notre modèle.

Les fibroblastes HIF sont radiosensibles: effets tissulaires ou variabilités intrinsèques?

Dans les travaux du laboratoire d'accueil en 2008, et 2013 nous avons classé les individus en 3 groupes de radiosensibilité intrinsèque différente (voir Figure 16 § A. 2.4.2.1). Les fibroblastes HIF étudiés dans le cadre de cette thèse présentent un retard de reconnaissance de CDB. Ces HIF appartiennent au groupe II (défini sur une grande collection de fibroblastes cutanés) de radiosensibilité intermédiaire avec une grande instabilité génomique (Joubert, Gamo et al. 2008, Bodgi, Granzotto et al. 2013), tandis que les fibroblastes cutanés HF19 (témoins radiorésistants) appartiennent au groupe I des radiorésistants. Pour répondre à cette question il faudrait tester un *panel* de lignées issues d'individus différents et dont on aurait par ailleurs vérifié la radiosensibilité des fibroblastes de la peau qui sert de référence.

L'efficacité du ZOPRA et son mode d'action. Enfin la démonstration de l'effet du ZOPRA qui passe par une amélioration de la reconnaissance des CDB que nous attribuons à une facilitation du passage des monomères d'ATM dans le noyau au profit d'une meilleure réparation de ces CDB est clairement apportée. Ce constat rend hautement vraisemblable l'impact protecteur sur des tissus sains anormalement sensibles de la prise de statine *non ad aliquid*¹ dans le cas de traitement de tumeur pelviennes comme le cancer de prostate.

5. Perspectives d'applications futures en radiothérapie

Les statines sont très utilisées en pratique courante en cardiologie, indication systématique après un infarctus sans avoir recours à des tests biologiques pour confirmer la dyslipidémie (Varela, Pereira et al. 2008). Récemment un rôle antifibrosant confirmé (modèle animal) pour cette famille médicamenteuse a ouvert une indication dans l'hépatite C chronique (Vilahrur, Casani et al. 2014). Une étude plus large de la fibrose musculaire a confirmé sur un modèle animal le rôle important des statines (Simon, King et al. 2014).

¹ *non ad aliquid* : non dans ce but

Cependant peu ou pas d'étude de l'effet des statines sur la radiosensibilité intrinsèque des cellules humaines ont été publiées. En revanche le laboratoire d'accueil possède une longue expérience dans ce type d'étude radiobiologique, notamment concernant la radiosensibilité de lignées cellulaires issues des tissus pulmonaire, cérébral, mammaire et cutané. De plus, la plus large des études de radiosensibilité d'individus traités par radiothérapie et leur classement en catégories de radiosensibilité a été réalisé dans ce laboratoire (voir Figure 16 § A. 2.4.2.1).

Ce large panel de caractérisation radiobiologique des différents tissus (surtout par les fibroblastes) a permis à notre équipe de mieux connaître les mécanismes de la radiosensibilité.

L'une des principales conclusions est que les statines et les bisphosphonates ont un effet radioprotecteur sur des fibroblastes humains en général et en particulier sur les cellules HIF gastro-intestinales étudiées dans cette thèse. Ainsi, nous avons confirmé sur un modèle, certes restreint, de lignées cellulaires humaines la réalité de l'effet des statines comme « radio protecteur » ou « réparateur » des CDB de l'ADN endommagé d'un tissu sain irradié (HIF rectal). Les statines réduisent de moitié le nombre des cassures non réparées car mal reconnues.

Cependant l'effet des statines sur le tissu tumoral irradié reste méconnu à ce jour et il serait souhaitable que leur utilisation ne radio-protège pas les tumeurs. Cet aspect reste donc à étudier.

En revanche un certain nombre de recommandations pour la pratique peuvent déjà être proposées :

- 1) la poursuite de l'usage des statines pendant une radiothérapie n'est pas susceptible de modifier la tolérance au traitement d'un individu de radiosensibilité normale mais peut réduire la sensibilité d'un individu hypersensible du groupe II et réduire ses risques d'effets secondaires à long terme. On n'a donc pas de raison de faire arrêter au patient d'éventuels traitements par statines tant qu'un impact délétère sur la sensibilité tumorale n'aura pas été mis en évidence.
- 2) si une situation de radiosensibilité est suspectée et a fortiori documentée comme étant du groupe II, un teste complémentaire in-vitro par le ZOPRA pourrait être proposé afin d'offrir à ce patient une alternative conservative plutôt que la contre-indication à

la radiothérapie. Cette alternative pourrait être de réaliser la radiothérapie prévue sous couverture d'un traitement type ZOPRA à doses aussi élevées que possible.

Par ailleurs cette possibilité d'intervention sur la radiosensibilité humaine dans le cadre de traitement par rayonnements ionisants ouvre des perspectives particulièrement intéressantes :

- 1) sur le plan pharmacologique il serait intéressant de développer des molécules optimisées pour cet effet sur ATM ;
- 2) sur le plan radioprotection opérationnelle il serait intéressant d'étudier si cette approche pharmacologique pourrait aussi renforcer la radiorésistance « normale » d'un individu et ainsi par exemple limiter l'impact d'expositions accidentelles ou concertée en radioprotection, sans parler d'une radioprotection de complémentaire pour les individus sensibles (le mode d'identification et de caractérisation de cette sensibilité étant évidemment à discuter par ailleurs) travaillant dans un contexte d'exposition aux rayonnements plutôt que de prôner leur éviction, ce qui serait une mesure discriminatoire.
- 3) Enfin cette capacité d'intervention renouvelle et justifie l'intérêt pour le développement de tests simples économiques et rapides de caractérisation de la radiosensibilité individuelle humaine, puisqu'il y aurait maintenant quelque chose à y gagner aussi bien dans le domaine de la radioprotection individuelle ou collective que dans celui de la prévention des effets secondaires des radiothérapies.

BIBLIOGRAPHIES

Agalliu, I., C. A. Salinas, P. D. Hansten, E. A. Ostrander and J. L. Stanford (2008). "Statin use and risk of prostate cancer: results from a population-based epidemiologic study." Am J Epidemiol **168**(3): 250-260.

Ahmed, K. A., B. M. Barney, B. J. Davis, S. S. Park, E. D. Kwon and K. R. Olivier (2012). "Stereotactic body radiation therapy in the treatment of oligometastatic prostate cancer." Front Oncol **2**: 215.

Alexander, A. and C. L. Walker (2010). "Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways." Cell Cycle **9**(18): 3685-3686.

Alizadeh, M., M. P. Sylvestre, T. Zilli, T. Van Nguyen, J. P. Guay, J. P. Bahary and D. Tausky (2012). "Effect of statins and anticoagulants on prostate cancer aggressiveness." Int J Radiat Oncol Biol Phys **83**(4): 1149-1153.

Ash, D. (2007). "Lessons from Epinal." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(8): 614-615.

Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.

Bennett, L. M., H. A. Brownlee, S. Hagavik and R. W. Wiseman (1999). "Sequence analysis of the rat Brca1 homolog and its promoter region." Mamm Genome **10**(1): 19-25.

Bodgi, L., A. Granzotto, C. Devic, G. Vogin, A. Lesne, J. F. Bottollier-Depois, J. M. Victor, M. Maalouf, G. Fares and N. Foray (2013). "A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity." J Theor Biol **333**: 135-145.

Bolla, M., P. Fourneret and J. L. Descotes (2008). "[Interest of the radiotherapy-hormonotherapy association in the treatment of the high-risk prostate cancer]." Bull Cancer **95**(12): 1213-1218.

Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-1077.

Brown, E. J. and D. Baltimore (2003). "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance." Genes Dev **17**(5): 615-628.

Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-42467.

Bursch, W., L. Kleine and M. Tenniswood (1990). "The biochemistry of cell death by apoptosis." Biochem Cell Biol **68**(9): 1071-1074.

Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." Mutat Res **424**(1-2): 9-21.

Caon, J., M. Paquette, J. Hamm and T. Pickles (2014). "Does Statin or ASA Affect Survival When Prostate Cancer Is Treated with External Beam Radiation Therapy?" Prostate Cancer **2014**: 184297.

Cavanna, L., R. Berte, A. Arcari, P. Mordenti, R. Pagani and D. Vallisa (2007). "Osteonecrosis of the jaw. A newly emerging site-specific osseous pathology in patients with cancer treated with bisphosphonates. Report of five cases and review of the literature." Eur J Intern Med **18**(5): 417-422.

Chen, C. I., C. F. Kuan, Y. A. Fang, S. H. Liu, J. C. Liu, L. L. Wu, C. J. Chang, H. C. Yang, J. Hwang, J. S. Miser and S. Y. Wu (2015). "Cancer risk in HBV patients with statin and metformin use: a population-based cohort study." Medicine (Baltimore) **94**(6): e462.

Chetioui, A., I. Despiney, L. Guiraud, L. Adoui, L. Sabatier and B. Dutrillaux (1994). "Possible role of inner-shell ionization phenomena in cell inactivation by heavy ions." Int J Radiat Biol **65**(5): 511-522.

Choi, S. H., Z. Y. Hong, J. K. Nam, J. Jang, H. J. Lee, R. J. Yoo, Y. J. Lee, S. Park, Y. H. Ji, Y. S. Lee, J. Cho, Y. J. Lee, C. Y. Lee and K. H. Kim (2015). "A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis." Clin Cancer Res.

Chotenimitkhun, R., R. D'Agostino, Jr., J. A. Lawrence, C. A. Hamilton, J. H. Jordan, S. Vasu, T. L. Lash, J. Yeboah, D. M. Herrington and W. G. Hundley (2014). "Chronic Statin Administration May Attenuate Early Anthracycline-Associated Declines in Left Ventricular Ejection Function." Can J Cardiol.

Clezardin, P., J. Gligorov and P. Delmas (2000). "Mechanisms of action of bisphosphonates on tumor cells and prospects for use in the treatment of malignant osteolysis." Joint Bone Spine **67**(1): 22-29.

Cohen, L. H., R. E. van Leeuwen, G. C. van Thiel, J. F. van Pelt and S. H. Yap (2000). "Equally potent inhibitors of cholesterol synthesis in human hepatocytes have distinguishable effects on different cytochrome P450 enzymes." Biopharm Drug Dispos **21**(9): 353-364.

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.

Dai, Y., B. Kysela, L. A. Hanakahi, K. Manolis, E. Riballo, M. Stumm, T. O. Harville, S. C. West, M. A. Oettinger and P. A. Jeggo (2003). "Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2462-2467.

Davidson, M. H. (2000). "Does differing metabolism by cytochrome p450 have clinical importance?" Curr Atheroscler Rep **2**(1): 14-19.

Deschavanne, P. J., D. Debieu, B. Fertil and E. P. Malaise (1986). "Re-evaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **50**(2): 279-293.

Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-2551.

Efuet, E. T. and K. Keyomarsi (2006). "Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome." Cancer Res **66**(2): 1040-1051.

Ehrlich, S. D., H. Bierne, E. d'Alencon, D. Vilette, M. Petranovic, P. Noirot and B. Michel (1993). "Mechanisms of illegitimate recombination." Gene **135**(1-2): 161-166.

Evans, R. D. (1985). The atomic nucleus. USA, Malabar, FL: Krieger Publishing.

Favaudon, V., L. Caplier, V. Monceau, F. Pouzoulet, M. Sayarath, C. Fouillade, M. F. Poupon, I. Brito, P. Hupe, J. Bourhis, J. Hall, J. J. Fontaine and M. C. Vozenin (2014). "Ultrahigh dose-rate FLASH

irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice." Sci Transl Med **6**(245): 245ra293.

Ferlazzo, M. L., L. Sonzogni, A. Granzotto, L. Bodgi, O. Lartin, C. Devic, G. Vogin, S. Pereira and N. Foray (2014). "Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates." Mol Neurobiol **49**: 1200-1211.

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): 621-629.

Fliedner, S. M., T. Engel, N. K. Lendvai, U. Shankavaram, S. Nolting, R. Wesley, A. G. Elkahloun, H. Ungefroren, A. Oldoerp, G. Lampert, H. Lehnert, H. Timmers and K. Pacak (2014). "Anti-cancer potential of MAPK pathway inhibition in paragangliomas-effect of different statins on mouse pheochromocytoma cells." PLoS One **9**(5): e97712.

Floyd, R. A. (1990). "The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis." Carcinogenesis **11**(9): 1447-1450.

Foray, N., D. Marot, A. Gabriel, V. Randrianarison, A. M. Carr, M. Perricaudet, A. Ashworth and P. Jeggo (2003). "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein." Embo J **22**(11): 2860-2871.

Foray, N., C. Monroco, B. Marples, J. H. Hendry, B. Fertil, D. T. Goodhead, C. F. Arlett and E. P. Malaise (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): 551-560.

Foray, N. and P. Verrelle (2011). "[DNA repair and repair diseases: between molecular models and clinical reality]." Bull Cancer **98**(3): 257-275.

Fowke, J. H., S. S. Motley, D. A. Barocas, M. S. Cookson, R. Concepcion, S. Byerly and J. A. Smith, Jr. (2011). "The associations between statin use and prostate cancer screening, prostate size, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), and prostate cancer." Cancer Causes Control **22**(3): 417-426.

Fowler, J. F., I. Toma-Dasu and A. Dasu (2013). "Is the alpha/beta ratio for prostate tumours really low and does it vary with the level of risk at diagnosis?" Anticancer Res **33**(3): 1009-1011.

Frankenberg-Schwager, M. (1989). "Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation." Radiother Oncol **14**(4): 307-320.

Garcia Saenz, J. A., S. Lopez Tarruella, B. Garcia Paredes, L. Rodriguez Lajusticia, L. Villalobos and E. Diaz Rubio (2007). "Osteonecrosis of the jaw as an adverse bisphosphonate event: three cases of bone metastatic prostate cancer patients treated with zoledronic acid." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **12**(5): E351-356.

Goodhead, D. T. (1988). "Spatial and temporal distribution of energy." Health Phys **55**(2): 231-240.

Goodhead, D. T. (1989). "The initial physical damage produced by ionizing radiations." Int J Radiat Biol **56**(5): 623-634.

Gordon, L. B., J. Massaro, R. B. D'Agostino, Sr., S. E. Campbell, J. Brazier, W. T. Brown, M. E. Kleinman, M. W. Kieran and C. Progeria Clinical Trials (2014). "Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome." Circulation **130**(1): 27-34.

Granzotto, A., A. Joubert, M. Viau, C. Devic, M. Maalouf, C. Thomas, G. Vogin, K. Malek, C. Colin, J. Balosso and N. Foray (2011). "Individual response to ionising radiation : what predictive assay(s) to choose?" Comptes Rendus de l'Académie des Sciences **334**: 140-157.

Granzotto, A., A. Joubert, M. Viau, C. Devic, M. Maalouf, C. Thomas, G. Vogin, K. Malek, C. Colin, J. Balosso and N. Foray (2011). "[Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose?]." C R Biol **334**(2): 140-157.

Grote, S. J., G. P. Joshi, S. H. Revell and C. A. Shaw (1981). "Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **39**(4): 395-408.

Haegele, A. D., P. Wolfe and H. J. Thompson (1998). "X-radiation induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in vivo in rat mammary gland DNA." Carcinogenesis **19**(7): 1319-1321.

Hasan, M., G. Schumacher, A. Seekamp, T. Taedken, W. Siegmund and S. Oswald (2014). "LC-MS/MS method for the determination of clodronate in human plasma." J Pharm Biomed Anal **100C**: 341-347.

Haukka, J., R. Sankila, T. Klaukka, J. Lonnqvist, L. Niskanen, A. Tanskanen, K. Wahlbeck and J. Tiihonen (2010). "Incidence of cancer and statin usage--record linkage study." Int J Cancer **126**(1): 279-284.

Haydont, V., O. Gilliot, S. Rivera, C. Bourgier, A. Francois, J. Aigueperse, J. Bourhis and M. C. Vozenin-Brotans (2007). "Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection." Int J Radiat Oncol Biol Phys **68**(5): 1471-1482.

He, Z., L. S. Mangala, C. A. Theriot, L. H. Rohde, H. Wu and Y. Zhang (2012). "Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells." J Radiat Res **53**(2): 225-233.

Hennequin, C., L. Quero and V. Favaudon (2008). "[Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]." Cancer Radiother **12**(1): 3-13.

Hennequin, C., L. Quero and V. Favaudon (2011). "[DNA repair and tumour radiosensitivity: focus on ATM gene]." Bull Cancer **98**(3): 239-246.

Hindler, K., C. S. Cleeland, E. Rivera and C. D. Collard (2006). "The role of statins in cancer therapy." Oncologist **11**(3): 306-315.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.

Holler, V., V. Buard, M. H. Gaugler, O. Guipaud, C. Baudelin, A. Sache, R. Perez Mdel, C. Squiban, R. Tamarat, F. Milliat and M. Benderitter (2009). "Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin." J Invest Dermatol **129**(5): 1280-1291.

Holmberg, A. R., U. H. Lerner, A. A. Alayia, M. Al-Mohanna, C. Adra, M. Marquez, L. Meurling and S. Nilsson (2010). "Development of a novel poly bisphosphonate conjugate for treatment of skeletal metastasis and osteoporosis." Int J Oncol **37**(3): 563-567.

Jeggo, P. A. and M. Lobrich (2007). "DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?" Oncogene **26**(56): 7717-7719.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jorcano, S., M. Molla, L. Escude, S. Sanz, A. Hidalgo, J. I. Toscas, D. Linero and R. Miralbell (2010). "Hypofractionated extracranial stereotactic radiotherapy boost for gynecologic tumors: a promising alternative to high-dose rate brachytherapy." Technol Cancer Res Treat **9**(5): 509-514.

Josifovski, T., C. Tulic, A. Milosevic and L. Radosevic-Jelic (2009). "[Acute and late toxicity in radical radiotherapy of prostate cancer]." Srp Arh Celok Lek **137**(1-2): 38-42.

Joubert, A. and N. Foray (2006). Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies. New Research on DNA Repair. B. R. Landseer. Hauppauge N. Y., Nova Science Publishers, Inc.: Chapter 10.

Joubert, A. and N. Foray (2006). Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, Progress and Controversies. In: New Research on DNA Repair. B. R. Landseer, Nova Science Publishers, Inc.

Joubert, A. and N. Foray (2007). "[Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]." Cancer Radiother **11**(3): 129-142.

Joubert, A., K. Gamo, Z. Bencokova, J. Gastaldo, W. Rénier, N. Chavaudra, V. Favaudon, C. Arlett and N. Foray (2008). "DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?" International Journal of Radiation Biology **84**(2): 1-19.

Joubert, A., G. Vogin, C. Devic, A. Granzotto, M. Viau, M. Maalouf, C. Thomas, C. Colin and N. Foray (2011). "[Radiation biology: major advances and perspectives for radiotherapy]." Cancer Radiother **15**(5): 348-354.

Joubert, A., K. M. Zimmerman, Z. Bencokova, J. Gastaldo, N. Chavaudra, V. Favaudon, C. F. Arlett and N. Foray (2008). "DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute

radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?" Int J Radiat Biol **84**(2): 107-125.

Katz, M. S., P. R. Carroll, J. E. Cowan, J. M. Chan and A. V. D'Amico (2010). "Association of statin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with prostate cancer outcomes: results from CaPSURE." BJU Int **106**(5): 627-632.

Khadige, M., D. Peiffert and S. Supiot (2014). "[What is the level of evidence of new techniques in prostate cancer radiotherapy?]." Cancer Radiother.

Khadige, M., D. Peiffert and S. Supiot (2014). "[What is the level of evidence of new techniques in prostate cancer radiotherapy?]." Cancer Radiother **18**(5-6): 501-508.

Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." Nat Genet **27**(3): 247-254.

Kollmeier, M. A., M. S. Katz, K. Mak, Y. Yamada, D. J. Feder, Z. Zhang, X. Jia, W. Shi and M. J. Zelefsky (2011). "Improved biochemical outcomes with statin use in patients with high-risk localized prostate cancer treated with radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **79**(3): 713-718.

Kumar, S. K., M. Meru and P. P. Sedghizadeh (2008). "Osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy: a case series." J Contemp Dent Pract **9**(1): 63-69.

Lawrence, T. S., R. K. Ten Haken, M. L. Kessler, J. M. Robertson, J. T. Lyman, M. L. Lavigne, M. B. Brown, D. J. DuRoss, J. C. Andrews, W. D. Ensminger and et al. (1992). "The use of 3-D dose volume analysis to predict radiation hepatitis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **23**(4): 781-788.

Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-649.

Li, C. Y., H. Nagasawa, W. K. Dahlberg and J. B. Little (1995). "Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced G1 arrest in established human tumor cell lines." Oncogene **11**(9): 1885-1892.

Lim, D. S., D. G. Kirsch, C. E. Canman, J. H. Ahn, Y. Ziv, L. S. Newman, R. B. Darnell, Y. Shiloh and M. B. Kastan (1998). "ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10146-10151.

Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." Science **286**(5446): 1897-1905.

Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne and T. Jacks (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-849.

Mancini, M. L. and S. T. Sonis (2014). "Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities." Front Pharmacol **5**: 51.

Marchesi, V., D. Aigle, D. Peiffert, A. Noel and J. M. Simon (2009). "[Securitization of the bi-site radiotherapy activity as part of the resumption of treatments in the Hospital of Epinal by the team of Alexis Vautrin Nancy Cancer Center]." Cancer Radiother **13**(8): 740-743.

Matzinger, O., F. Duclos, A. van den Bergh, C. Carrie, S. Villa, P. Kitsios, P. Poortmans, S. Sundar, E. M. van der Steen-Banasik, A. Gulyban, L. Collette, M. Bolla and E. R. O. Group (2009). "Acute toxicity of curative radiotherapy for intermediate- and high-risk localised prostate cancer in the EORTC trial 22991." Eur J Cancer **45**(16): 2825-2834.

Millat, T., S. N. Sreenath, R. P. Soebiyanto, J. Avva, K. H. Cho and O. Wolkenhauer (2008). "The role of dynamic stimulation pattern in the analysis of bistable intracellular networks." Biosystems **92**(3): 270-281.

Miyakoshi, N. (2014). "[Intermittent long-term administration of intravenous bisphosphonates for treatment of osteoporosis]." Clin Calcium **24**(1): 93-99.

Morrison, C., G. C. Smith, L. Stingl, S. P. Jackson, E. F. Wagner and Z. Q. Wang (1997). "Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis." Nat Genet **17**(4): 479-482.

Moustacchi, E. (2000). "DNA damage and repair: consequences on dose-responses." Mutat Res **464**(1): 35-40.

Nanda, A., M. H. Chen, B. J. Moran, M. H. Braccioforte and A. V. D'Amico (2013). "Cardiovascular comorbidity and mortality in men with prostate cancer treated with brachytherapy-based radiation with or without hormonal therapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **85**(5): e209-215.

Nubel, T., J. Damrot, W. P. Roos, B. Kaina and G. Fritz (2006). "Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 933-939.

Ostrau, C., J. Hulsenbeck, M. Herzog, A. Schad, M. Torzewski, K. J. Lackner and G. Fritz (2009). "Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo." Radiother Oncol **92**(3): 492-499.

Parmentier, G. (2008). "[Quality & Safety in radiotherapy: advocacy for a professional strategy]." Cancer Radiother **12**(6-7): 584-600.

Peiffert, D., J. M. Simon and F. Eschwege (2007). "[Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]." Cancer Radiother **11**(6-7): 309-312.

Platz, E. A. (2009). "Does statin use affect the risk of developing prostate cancer?" Nat Clin Pract Urol **6**(2): 70-71.

Platz, E. A., C. M. Tangen, P. J. Goodman, C. Till, H. L. Parnes, W. D. Figg, D. Albanes, M. L. Neuhaus, E. A. Klein, M. S. Lucia, I. M. Thompson, Jr. and A. R. Kristal (2014). "Statin drug use is not associated with prostate cancer risk in men who are regularly screened." J Urol **192**(2): 379-384.

Puck, T. T. and P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." J Exp Med **103**(5): 653-666.

Rao, S., D. C. Porter, X. Chen, T. Herliczek, M. Lowe and K. Keyomarsi (1999). "Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7797-7802.

Rattin, C., A. Vanoli and I. Latombe (2008). "[Extensive osteonecrosis of the jaws associated with biphosphonates therapy]." Ann Otolaryngol Chir Cervicofac **125**(1): 24-29.

Renier, W., A. Joubert, Z. Bencokova, J. Gastaldo, C. Massart and N. Foray (2007). "Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci." Int J Radiat Biol **83**(8): 543-549.

Ripamonti, C. I., M. Maniezzo, T. Campa, E. Fagnoni, C. Brunelli, G. Saibene, C. Bareggi, L. Ascani and E. Cislighi (2009). "Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan." Ann Oncol **20**(1): 137-145.

Ritch, C. R., G. Hruby, K. K. Badani, M. C. Benson and J. M. McKiernan (2011). "Effect of statin use on biochemical outcome following radical prostatectomy." BJU Int **108**(8 Pt 2): E211-216.

Roelofs, A. J., K. Thompson, S. Gordon and M. J. Rogers (2006). "Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 2): 6222s-6230s.

Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J Cell Biol **146**(5): 905-916.

Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-5868.

Rosser, C. J., L. B. Levy, D. A. Kuban, R. Chichakli, A. Pollack, A. Lee and L. L. Pisters (2003). "Hazard rates of disease progression after external beam radiotherapy for clinically localized carcinoma of the prostate." J Urol **169**(6): 2160-2165.

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): 5057-5062.

Russell, R. G. (2006). "Bisphosphonates: from bench to bedside." Ann N Y Acad Sci **1068**: 367-401.

Saad, F. (2014). "Role of bisphosphonates in non-metastatic prostate cancer." Lancet Oncol **15**(10): 1041-1042.

Sarkaria, J. N., C. Bush, J. J. Eady, J. H. Peacock, G. G. Steel and J. R. Yarnold (1998). "Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts." Radiat Res **150**(1): 17-22.

Simon, T. G., L. Y. King, H. Zheng and R. T. Chung (2014). "Statin Use is Associated with a Reduced Risk of Fibrosis Progression in Chronic Hepatitis C." J Hepatol.

Smith, G. C. and S. P. Jackson (1999). "The DNA-dependent protein kinase." Genes Dev **13**(8): 916-934.

Steel, G. (1993). Basic Clinical Radiobiology, Arnold Publishers.

Suzuki, H., N. Kamiya, M. Yano, T. Endo, M. Takano, K. Kawamura, T. Imamoto and T. Ichikawa (2010). "[Bone and Men's Health. Bisphosphonate therapy for prostate cancer]." Clin Calcium **20**(2): 258-266.

Teh, B. S., L. Dong, J. E. McGary, W. Y. Mai, W. Grant, 3rd and E. B. Butler (2005). "Rectal wall sparing by dosimetric effect of rectal balloon used during intensity-modulated radiation therapy (IMRT) for prostate cancer." Med Dosim **30**(1): 25-30.

Thames, H. D., K. K. Ang, F. A. Stewart and E. van der Schueren (1988). "Does incomplete repair explain the apparent failure of the basic LQ model to predict spinal cord and kidney responses to low doses per fraction?" Int J Radiat Biol **54**(1): 13-19.

Thyagarajan, B., M. McCormick-Graham, D. P. Romero and C. Campbell (1996). "Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells." Nucleic Acids Res **24**(20): 4084-4091.

Tubiana, M., J. Dutreix and A. Wambersie (1986). Radiobiologie. Paris, Hermann.

Valicenti, R. K., K. Bae, J. Michalski, H. Sandler, W. Shipley, A. Lin and J. Cox (2011). "Does hormone therapy reduce disease recurrence in prostate cancer patients receiving dose-escalated radiation therapy? An analysis of Radiation Therapy Oncology Group 94-06." Int J Radiat Oncol Biol Phys **79**(5): 1323-1329.

Varela, I., S. Pereira, A. P. Ugalde, C. L. Navarro, M. F. Suarez, P. Cau, J. Cadinanos, F. G. Osorio, N. Foray, J. Cobo, F. de Carlos, N. Levy, J. M. Freije and C. Lopez-Otin (2008). "Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging." Nat Med **14**(7): 767-772.

Vilahur, G., L. Casani, E. Pena, O. Juan-Babot, G. Mendieta, J. Crespo and L. Badimon (2014). "HMG-CoA reductase inhibition prior reperfusion improves reparative fibrosis post-myocardial infarction in a preclinical experimental model." Int J Cardiol **175**(3): 528-538.

Walker, E. J., A. H. Ko, E. A. Holly and P. M. Bracci (2015). "Statin use and risk of pancreatic cancer: Results from a large, clinic-based case-control study." Cancer.

Walker, J. R., R. A. Corpina and J. Goldberg (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." Nature **412**(6847): 607-614.

Walker, P. R., L. Kokileva, J. LeBlanc and M. Sikorska (1993). "Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis." Biotechniques **15**(6): 1032-1040.

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.

Weber, D. C., F. Caparrotti, M. Laouiti and K. Malek (2011). "Simultaneous in-field boost for patients with 1 to 4 brain metastasis/es treated with volumetric modulated arc therapy: a prospective study on quality-of-life." Radiat Oncol **6**: 79.

Withers, H. R. (1985). "Biologic basis for altered fractionation schemes." Cancer **55**(9 Suppl): 2086-2095.

Wu, L., S. L. Davies, N. C. Levitt and I. D. Hickson (2001). "Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51." J Biol Chem **276**(22): 19375-19381.

Yang, D. Q., M. J. Halaby, Y. Li, J. C. Hibma and P. Burn (2011). "Cytoplasmic ATM protein kinase: an emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration." Drug Discov Today **16**(7-8): 332-338.

- Yang, H., D. A. Chew, W. Wu, Z. Zhou and Q. Li (2012). "Design and implementation of an identification system in construction site safety for proactive accident prevention." Accid Anal Prev **48**: 193-203.
- Zackrisson, B., L. Franzen, R. Henriksson and B. Littbrand (1994). "Tolerance to accelerated fractionation in the head and neck region." Acta Oncol **33**(4): 391-396.
- Zaider, M., M. J. Zelefsky, G. N. Cohen, C. S. Chui, E. D. Yorke, L. Ben-Porat and L. Happersett (2005). "Methodology for biologically-based treatment planning for combined low-dose-rate (permanent implant) and high-dose-rate (fractionated) treatment of prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **61**(3): 702-713.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.
- Zhou, Z. H., E. Akgun and M. Jasin (2001). "Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8326-8333.
- Zietman, A. L., K. Bae, J. D. Slater, W. U. Shipley, J. A. Efstathiou, J. J. Coen, D. A. Bush, M. Lunt, D. Y. Spiegel, R. Skowronski, B. R. Jabola and C. J. Rossi (2010). "Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09." J Clin Oncol **28**(7): 1106-1111.
- Zilli, T., S. Jorcano, M. Rouzaud, G. Dipasquale, P. Nouet, J. I. Toscas, N. Casanova, H. Wang, L. Escude, M. Molla, D. Linero, D. C. Weber and R. Miralbell (2011). "Twice-weekly hypofractionated intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer with low-risk nodal involvement: toxicity and outcome from a dose escalation pilot study." Int J Radiat Oncol Biol Phys **81**(2): 382-389.
- Zilli, T., M. Rouzaud, S. Jorcano, G. Dipasquale, P. Nouet, J. I. Toscas, N. Casanova, H. Wang, L. Escude, M. Molla, D. Linero, D. C. Weber and R. Miralbell (2010). "Dose escalation study with two different hypofractionated intensity modulated radiotherapy techniques for localized prostate cancer: acute toxicity." Technol Cancer Res Treat **9**(3): 263-270.

Annexes

1. Correlation of dosimetric parameters with subclinical liver function test alterations after radiotherapy for upper gastrointestinal tract tumors;
2. Simultaneous in-field boost for patients with 1 to 4 brain metastasis/es treated with volumetric modulated arc therapy: a prospective study on quality-of-life.
3. Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif (s) choisir ?
4. Impact of the nucleo-shuttling of the ATM protein in the response to radiotherapy: towards a molecular classification of human radiosensitivity
5. Prenylation inhibitors partially rescue normal ATM-dependent DNA repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
6. Radioprotective putative effect of statins and prostate cancer: a biological and clinical approach
7. Procédure de prélèvement biopsique pour étude de la radiosensibilité

Correlation of Dosimetric Parameters With Subclinical Liver Function Test Alterations After Radiotherapy for Upper Gastrointestinal Tract Tumors

K. Malek¹, H. Zhang¹, Y. Boudam¹, M. Colonna², R. Sihanath¹, C. Rebischung¹ & J. Balosso^{1,3}

¹ Pôle de Cancérologie-Hématologie, Hôpital A.Michallon, CHU de Grenoble, BP 217, GRENOBLE cedex9, France

² Registre du Cancer de l'Isère, Meylan, France

³ Université Joseph Fourier, BP 53, GRENOBLE cedex 9, France

Correspondence: K. Malek, Pôle de Cancérologie-Hématologie, Hôpital A.Michallon, CHU de Grenoble, BP 217, F-38043 GRENOBLE cedex9, France. Tel: 33-4-7676-5435. Fax: 33-4-7676-5629. E-mail: JBalosso@chu-grenoble.fr

Received: September 4, 2014 Accepted: October 8, 2014 Online Published: October 31, 2014

doi:10.5539/cco.v3n2p70

URL: <http://dx.doi.org/10.5539/cco.v3n2p70>

Abstract

Purpose: To characterize conditions of radiation induced liver diseases (RILD) after radiation therapy administered for upper gastrointestinal tract tumours, not involving the liver.

Method & Materials: this is a retrospective study of 169 patients treated by three dimensional conformal radiations for upper gastrointestinal tract tumours between 2002 and 2008 at the Michallon hospital. Cumulative and differential DVHs (Dose Volume Histogram) were extracted from TPS generated files and liver function tests (ALAT, ASAT, GGT and AP) and tumour markers (CA 19.9 and CEA) from patient records at four different time points (before treatment, and one, three, and six months after the end of treatment). Liver function alteration was defined as an increase in one parameter over 1.5 times the upper normal limit. All these data have been stored and statistically worked out using Lyman model parameters.

Results: 34 patient records were studied. Twelve patients had RILD but none at six months. Results are consistent with the Burman description. Dosimetric profiles are different and a correlation appears between RILD and the level of doses given to liver. V40Gy is the most predictive dosimetric parameter for subclinical liver function changes.

Conclusion: While dosimetric parameters are predictive of liver biological disorder, the Lyman model is not predictive of these mild disorders.

Keywords: liver biologic alteration, Radiation-Induced Liver Disease (RiLD), NTCP, normal liver irradiated tolerance, predictive factors.

1. Introduction

The liver is a rather radiosensitive organ which could be either the target of radiotherapy or, most of the time, an organ at risk for a radiotherapy devoted to a nearby tumor. This is the case for most of the abdominal or lower thoracic irradiations. After exclusive or adjuvant radiotherapy for cancers of the upper gastrointestinal tract such as gastric, bile-duct and pancreatic adenocarcinomas, the interpretation of changes in liver function tests (LFT) during follow-up can be problematic. Although in some patients such changes are a sign of liver metastases, others present persistent and durable LFT abnormalities in the absence of any sign of liver dissemination. Some observers have associated such alterations with visible vascular or density temporary modifications in irradiated liver regions (Sheng et al., 2010), suggesting a possible alternative origin for LFT abnormalities in patients with no sign of metastasis. While radiation-induced liver disease (RILD) is a well-known complication of radiotherapy (Dawson et al., 2002; Lawrence, Robertson et al. 1995; Lawrence, Ten Haken et al. 1992), adherence to published and widely accepted dosimetric guidelines can in general prevent its occurrence (Kutcher, Burman et al., 1991), (Lawrence, Robertson et al., 1995). Elaborating a dose-effect relationship between dose distributions to normal liver and less serious subclinical LFT alterations could help clinicians in interpreting such

alterations detected during the follow-up of patients having undergone upper abdominal radiation therapy.

We attempt herein to establish such a dose-effect relationship and associated radiobiological parameters for normal liver in a series of patients treated for upper gastrointestinal tract cancers, with no disease involvement of the liver. We assumed, as working hypothesis, that the liver dose volume histogram (DVH) should be predictive of RILD.

2. Materials and Methods

2.1 Type of Study

This is a retrospective study of patients receiving radiotherapy for upper GI tract tumors between 2002 and 2008 at Grenoble University Hospital, France. Some of these patients were included in previous prospective studies designed for other purposes (GERCOR D98-1 and GERCOR D03-1). Data were retrospectively extracted from the medical and the technical records of all patients.

2.2 Patients' Inclusion and Exclusion Criteria

Eligible patients were any receiving radical or adjuvant radiotherapy for upper GI tract cancers, with no history of liver metastasis or other liver disease (e.g. hepatitis, cirrhosis or any liver tumor). Patients for whom no liver function tests were on file for the first year of post-irradiation follow-up were excluded, as were patients with radiological evidence of liver progression, and patients with increasing pre- or post-irradiation tumor markers (CA 19-9 or CEA), for whom possible liver cancer dissemination was considered to be a confounding factor in the liver function test analysis.

2.3 Principle of Treatment

All patients received either radical chemo-radiotherapy for inoperable locally advanced non metastatic adenocarcinoma of pancreas (target dose 55 Gy), or adjuvant chemo-radiotherapy for completely resected pancreatic carcinomas (target dose 55 Gy) or adjuvant chemo-radiotherapy for gastric adenocarcinoma or extra hepatic cholangiocarcinoma (target dose 54 Gy). Irradiations were 3D conformational radiotherapy based on a simulation CT and calculated with the same TPS (DOSIGRAY[®] 2002 version, Dosisoft, F-94230 Cachan, France), and managed by the same radiation oncologist (JB). Treatments were carried out with two linacs, either a Siemens Mevatron[®] KD2 or an Elekta SLi[®] producing X-ray beams of 6 or 18 MV. Typically 4 photon beams were used (AP-PA and lateral fields) delivering 45 to 54 Gy, with a 10 Gy boost above 45 Gy, only in case of pancreatic targets. The boost was delivered by 2 or most often 4 beams. Fractionation was 1.8 or 2.25 Gy per session delivered once daily for respectively 5 or 4 days a week. Typically irradiated volumes were very similar and encompassed: i) for gastric cancer, the retro gastric lymph nodes area from the celiac region down to the upper mesenteric artery, the stomach resection bed, the spleen and the liver hila; ii) for bilio-pancreatic tumors, the retro gastric lymph nodes area from the celiac region down to the upper mesenteric vessels, the tumor or the tumor bed, the whole duodenum and the liver hilum, the boost was limited to the CT visible pancreatic tumor with a 2 cm margin.

Concomitant chemotherapy was administered to all patients either as continuous 5FU infusion (250-300 mg/m²/d for adjuvant gastric adenocarcinomas, extra hepatic cholangiocarcinoma and adjuvant pancreatic carcinoma - GERCOR D98-1) or as a combination of weekly administrations of oxaliplatin (60 mg/m²) with a continuous 5FU infusion (250 mg/m²/d) for locally advanced pancreatic adenocarcinomas.

2.4 Dosimetric Parameters and Calculations Means

Dosimetric parameters were extracted from the treatment planning system (TPS) software DOSIGRAY[®] 2002 version (Dosisoft, F-94230 Cachan, France). The dose calculation algorithm was the Clarkson-Cunningham one, based on the principle of primary and scattered dose separation. For each patient the volume of whole liver, the cumulative DVH (cDVH), the differential DVH (dDVH), and the maximal dose given to the liver were extracted from the TPS. The differential and cumulative DVH for the liver dose distributions were recalculated to have homogeneous data throughout the different cases and uniform dose interval (cDVH) or dose bin of 5 Gy (dDVH) along the dose range. This interval has been chosen consistently with the usual accuracy of routine dosimetry and a sustainable amount of data that could be thoroughly communicated as in Table 1.

2.5 Biological Parameters Definition

LFT perturbation was determined by the study of five parameters: aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT), gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), and bilirubin. These parameters were included on most routine laboratory tests. The combined elevation of these enzymes indicates the presence of liver disease. While AP is mainly produced in the bones and the liver, it is also produced in many

other organs, such as the intestines, kidneys, and placenta; GGT is produced predominantly in the liver. Therefore, elevated levels of AP are more specific for liver lesions in the presence of concomitant GGT elevations. Conversely, GGT elevations are specific for liver disease regardless of AP levels.

Data on the clinical evolution and LFT profiles were collected for each patient at different times: before treatment, and at one, three, and six months after the treatment.

We considered as abnormal any parameter above 1.5 times the upper physiological limit (quoted as N) of the laboratory having done the test. A full set of LFTs was thus considered normal if each parameter was equal or inferior to its N, and as abnormal if at least one of the parameters was above ($1.5 \times N$). We also took into account the evolution of LFT profiles during the follow-up period: patients whose tests remained abnormal until 6 months were designated (P+), and patients whose LFTs normalized during the study period were designated (P-). Thus the biological data throughout the study period have been transformed in a discrete parameter P- vs P+ or respectively 0 and 1 in the different charts.

2.6 Radiobiological Model and Statistics

For each patient the differential DVH was computed using the initial treatment plan. From these differential DVHs were calculated the effective volume (Veff) related to the maximal dose (Dmax) (Lyman 1985), (Lyman 1992) and partial volumes for a series of lower doses segmented as bin of 5 Gy width. These dosimetric data were then correlated with binary LFT values P+ or P- as defined above.

To test the consistency of our data with previously published liver tolerance guidelines, we used the Lyman model, as published by Burman and Emami (Burman, Kutcher et al. 1991, Emami, Lyman et al., 1991) with the liver parameters suggested by Burman ($n = 0.32$; $m = 0.15$; $TD50/5 = 40$ Gy), to generate multiple series of curves showing on one hand the hyperbolic relationship between Veff and dose, and on the other hand the sigmoid relationship between NTCP and dose (Brenner, 1993; Kutcher, 1996; Kutcher & Burman, 1989). We then superposed our own data on these curves.

3. Results

3.1 Description of the Population

Between 2002 and 2008, 169 patients have been treated by three dimensional conformal radiation therapy for upper gastrointestinal tract tumors in our department, among them, 38 patient records were retained for this study. Twelve patients had blood test alteration compatible with a RILD. Patient age ranged from 26 to 82 years at the time of treatment. In all cases, the applied dose-volume constraint for the liver was $V25Gy < 60\%$, according to our departmental guidelines. Maximal doses delivered to PTVs ranged from 45 to 61.25 Gy. All patients were free of metastasis at the time of treatment.

3.2 Evolution of the Biological Alteration Along the Study Follow-Up

Among the studied population, 27% of the patients had some alteration of their LFTs. These alterations appeared progressively during treatment or within 3 months of the end of the treatment. Thereafter, all patients normalized their tests within 6 months. The Figure 1 shows the time related evolution of cytolysis (ASAT and ALAT) which is a part of these alterations.

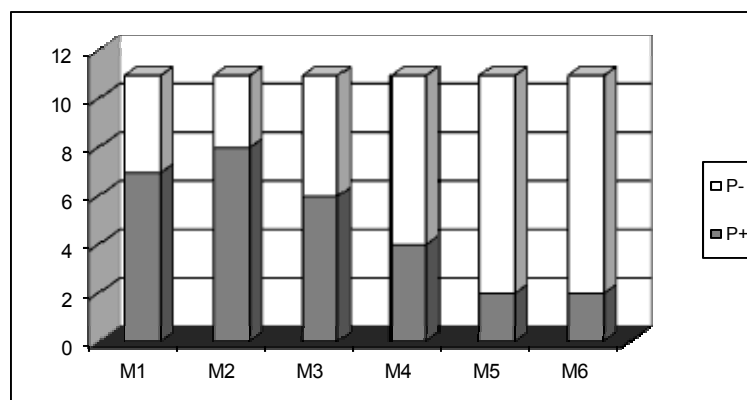


Figure 1. Represents as an example the time related evolution of cytolysis (ASAT and ALAT) quoted as P+ when cytolysis and P- when none at the different time points in months (M1 to M6) versus the number of cases

3.3 Biological Data and Effective Volumes for the Maximum Dose

In Table 1 are listed all of the dose / volume data for the studied population, as calculated and extracted from the cDVH's and the dDVH's. Given the homogeneity of treatment techniques and target doses within the patient group, Veff data were all based on similar Dmax values of 54 Gy, and are therefore possibly strongly correlated to the toxicity of the liver irradiation. The variation in Veff is in fact very low (range 11.13 mL to 42.02 mL; mean = 26.89, SD = 6.66), and the relation between Veff and LFT alterations is clear.

Table 1. Complete set of the dose/volume data for the studied population as calculated and extracted from the cumulative and the differential DVHs. LFT are quoted as 0 if no biological change and 1 if biological changes, VxxGy are the successive volumes of liver (mL) receiving more than xxGy, LVol is the liver volume in mL, Dmax in Gy and Veff in %

LFT	V20 _{Gy} (mL)	V25 _{Gy}	V30 _{Gy}	V35 _{Gy}	V40 _{Gy}	V45 _{Gy}	V50 _{Gy}	V55 _{Gy}	LVol (mL)	Dmax (Gy)	Veff (%)
0	426.49	377.75	316.82	194.97	146.23	121.85	97.48	24.37	1218.5	55	24.51
0	212.01	87.30	62.36	49.89	37.41	24.94	12.47	0	1247.1	55	15.45
0	1018.09	962.30	669.43	557.86	516.02	488.12	446.28	111.57	1394.6	55	42.02
1	1073.01	940.72	440.96	382.17	338.07	235.18	117.59	102.89	1469.8	55	29.36
0	300.47	240.38	168.26	108.17	72.11	60.09	48.07	12.02	1201.8	56	19.23
0	439.51	402.89	366.26	329.63	207.55	183.13	158.71	48.83	1220.8	55	27.01
0	706.44	694.46	431.05	251.44	239.47	215.52	203.54	83.81	1197.3	55	29.44
0	1168.02	1150.05	1132.08	1096.14	1078.17	1042.23	1006.2	826.60	1796.9	56	18.75
1	867.93	810.07	659.63	428.18	358.74	266.17	243.02	92.58	1157.2	57	37.99
1	1338.11	1240.79	851.53	656.89	608.23	583.90	510.91	48.66	2432.9	57	36.58
1	1631.25	1540.62	1178.12	906.25	815.62	725.00	498.43	271.87	2265.6	56	35.82
1	467.70	442.42	290.73	164.33	139.05	113.76	88.48	37.92	1264.0	54	22.81
0	701.28	539.45	364.13	229.27	188.81	148.35	80.91	13.49	1348.6	57	27.81
0	1118.42	1070.49	399.43	319.55	239.66	191.73	159.7	31.95	1597.7	57	31.68
0	576.12	535.92	495.73	482.33	415.34	254.56	227.76	13.40	1339.8	57	25.42
0	560.80	498.49	327.13	249.24	233.67	186.93	46.73	15.58	1557.78	58	24.97
0	749.01	726.65	458.35	413.63	391.27	357.73	301.84	223.58	1117.9	56	26.42
0	753.51	384.77	368.74	352.71	320.64	176.35	160.32	48.10	1603.2	56	25.84
1	787.98	722.31	630.38	433.39	393.99	354.59	315.19	105.06	1313.3	55	35.20
1	490.29	408.57	277.83	245.14	212.46	114.40	32.69	0	1634.2	56	23.08
1	621.42	514.28	171.43	150.00	117.86	85.71	53.57	21.43	1071.4	56	25.29
0	745.63	697.53	324.71	276.60	252.55	216.47	113.05	57.73	1202.6	56	26.38
1	669.11	610.42	563.46	539.98	493.03	422.60	363.90	140.86	1173.8	57	36.89
1	1010.98	520.36	446.02	401.42	327.08	267.61	223.01	178.40	1486.7	57	22.86
0	701.47	643.86	331.29	250.63	213.18	161.32	72.02	27.37	1440.4	57	20.56
0	504.11	562.73	502.94	378.67	310.68	248.54	157.10	84.41	1172.3	58	28.56
1	663.02	421.92	337.54	301.37	277.26	216.99	168.76	96.44	1205.4	57	25.61
1	407.17	308.13	154.07	132.06	121.05	88.04	66.03	22.01	1100.4	57	21.75
0	802.31	744.79	499.55	313.36	274.00	207.394	68.12	18.17	1513.8	56	27.62
0	1297.84	1261.48	785.25	523.50	478.06	438.07	341.73	229.03	1817.7	59	11.13
0	1045.32	975.63	783.99	484.33	442.52	350.18	325.79	130.66	1742.2	57	27.53
0	840.77	562.32	427.14	389.30	364.962	324.41	183.83	8.11	1351.7	56	31.91
0	1096.24	687.78	381.43	355.90	249.282	217.75	192.22	138.15	1501.7	56	26.02
0	728.06	575.64	173.14	143.54	122.822	76.95	29.60	0	1479.7	46	21.39

3.4 Correlation Between the Effective Volumes or Dose-Volumes Parameters and the Risk of Biological Alterations

The Figure 2 shows the variation of the multiple regression coefficients of the eight Vdose independent values versus the risk of biological alteration. The V40Gy was the most predictive volume for LFT elevation in this specific population treated with the described protocols. This characteristic probably cannot be generalized.

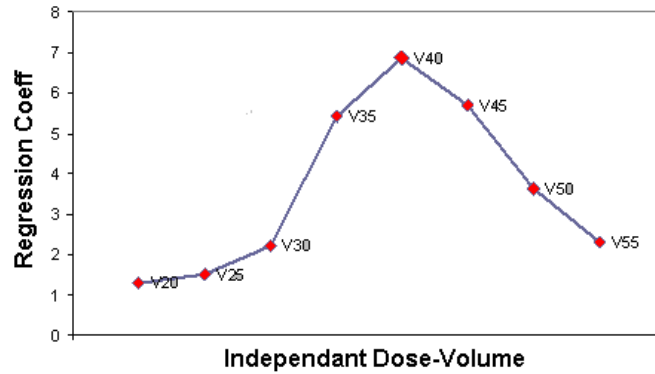


Figure 2. Display of the variation of the multiple regression coefficients of the eight Vdose independent values versus the discrete risk of biological alteration. The V40Gy is the most predictive volume for LFT elevation in this specific population

The distribution of LFT elevation according to V40Gy or Veff (calculated for a Dmax of 54Gy) is shown in Figure 3. While no elevations appeared for V40Gy values lower than 10% (area A), any irradiation producing a V40Gy higher than 38% is expected to produce alterations (area C). Between these upper and lower limits (area B), the interpretation of the origin of LFT alterations is difficult, since a clear correlation with radiation dose is unclear. Similarly, for Veff lower than 21% (area A) we found no LFT elevations, whereas with a Veff above 32.5% (area C) changes were almost certain, with an indefinite area (B) between 21 and 32.5%.

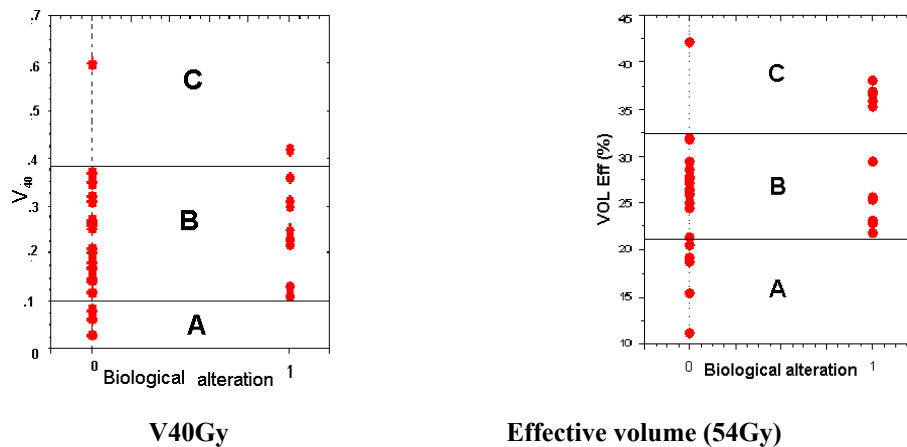


Figure 3. Distributions of LFT elevation according to V40Gy or Veff (for Dmax = 54Gy). While no elevations appeared for V40Gy values lower than 10% (area A), any irradiation producing a V40Gy higher than 38% is expected to produce alterations (area C). Between these upper and lower limits (area B), the interpretation of the origin of LFT alterations is ambiguous. Similarly, for Veff lower than 21% (area A) there are no LFT elevations, whereas with a Veff above 32.5% (area C) changes were almost certain, with an indefinite area (B) between 21 and 32.5%

Given the above, we propose that LFT changes appearing in area A ($V40Gy < 10\%$ or $Veff_{54Gy} < 21\%$) should be attributed to some liver disease or disorder independent of the irradiation and deserve specific hepato-biliary investigations; conversely, biological disorders appearing in area C after an irradiation producing a $V40Gy > 38\%$ or a $Veff_{54Gy} > 32.5\%$ can almost certainly be, at least partially, attributed to the irradiation and may at first

be simply followed, with a spontaneous decrease expected in case of RILD.

3.5 Row Comparison of the Risk of Biological Alteration and the Lyman's NTCP Prediction

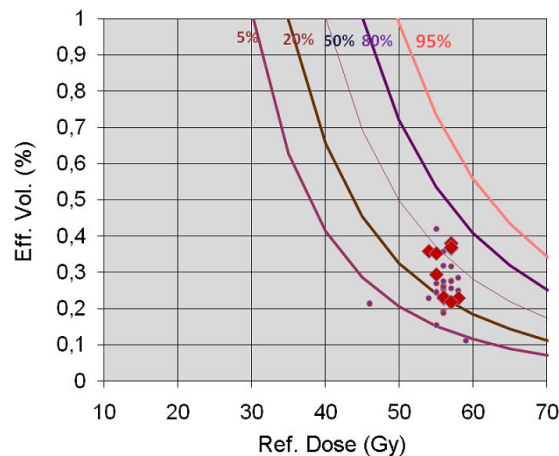


Figure 4. Iso-NTCP chart of the liver according to Emami, Burman and Kutcher, correlating the Eff.Vol to the reference dose with the superposition of the data of the present study which are clustered in the area between 20% and 50% risk at 5 years. On this chart the cases with LFT toxicity are represented as red diamonds

As it can be seen on Figure 4, our data set can be represented on an iso-NTCP chart of the liver and are clustered in the area between 20% and 50% risk at 5 years. On this chart the cases with LFT toxicity represented as red diamonds are not obviously differently located than the other cases. Although this chart is parameterized to represent neither the low biological risk (and not serious late effects) nor the earlier timeframe of our study (effects observed in the 6 first month of follow-up), the predicted high risk for most of our patients for late RILD is worth noting, but does not correlate at all with our clinical experience which is a complete lack of symptomatic late effects in this population (data not shown).

4. Discussion

While previous works on the subject of liver toxicity of radiation have largely used thresholds for serious RILD seen in series of patients treated with older radiation techniques in order to establish the tolerance model for this organ (Austin-Seymour et al., 1986; Lawrence, Robertson et al. 1995), our work is based on current 3-D conformal practice and thus with potentially very different criteria for acceptable liver toxicity in upper abdominal radiotherapy treatments. However, recent comparison between dose-volume results for upper abdominal malignancies between 3DCRT and IMRT have not shown any favourable differences concerning healthy liver irradiation (Nour et al., 2013). Thus we can expect that our data could have some interest even for more advanced irradiation technics than those used in this study.

It is foreseeable that increasingly numerous liver pathologies will be treated by some radiation therapy approaches, necessitating a finer biological semiology, and raising new questions about liver tolerance, including potential long-term consequences of subclinical liver-function changes, the expected time course and evolution of such alterations, and situations in which we can safely observe them without fearing liver cancer relapse.

In this work we have tried to answer some of these questions. Although the small number of cases ($n = 34$) and the homogeneity of the treatment protocols made it impossible to elaborate a model covering a large range of dose-volume conditions, we can nonetheless draw from this work the information that the V40Gy is the most predictive parameter for biological reactions of the liver in our patient population, and that the effective volume, which is a straightforward parameter obtained from any modern TPS, is also quite predictive of the biological risk. An Eff.Vol for 54 Gy above 21% is compatible with radiation-induced biological alteration of the liver and an Eff.Vol for 54 Gy above 32% is almost always associated with biological changes. The Eff.Vol correlation is possibly more independent from our population than the V40Gy correlation which is a kind of characteristic of our treatment protocols and related dose distributions into the liver. A similar study has been carried out in Japan (Tanaka et al., 2013) for primary gastric lymphoma treated by chemotherapy followed by radiotherapy. The level of LFT change for RILD definition was higher than in our study ($2 \times N$ versus $1.5 \times N$) and the probability of

RILD has been studied regarding the VxxGy above which the RILD appeared. The sensitivity of liver appeared higher in this study than in ours, for instance a V20Gy > 30% was a condition of RILD. The role of chemotherapy could be discussed. In our study the chemotherapy had a lower toxicity level (5FU ± oxaliplatin vs rituximab + cyclophosphamide + doxorubicin + vincristine) and, regarding the literature and our results, the chemotherapy administered to our patients seemed not alter the liver radio-sensitivity.

The fact that these results have been obtained with a population having no liver disease at all makes a deep difference with the results obtained by other authors with patients treated for liver disease, namely unresectable hepatocellular carcinoma. Actually radiobiological data obtained for such patients are showing a very higher sensitivity of the remaining liver that preclude any possibility to pool such data with ours. Son et al. found, based on the increased cirrhosis score, that the toxicity after helical irradiation appeared with a cutoff value of 43.2% for the V15Gy 25Gy (Son, Kay et al., 2013) which is substantially lower than the recommendation of keeping the V25Gy < 60%, in other words having at least 40% of the liver below 25Gy. Consequently, the radiobiologic parameters as $\alpha/\beta=8$ (Son, Jang et al., 2013) or n (1), m (0.36 or 0.41) and f (0.156 or 0.0) as long as TD_{50/5} (40.3 or 24Gy) with $\alpha/\beta=2$ for the Lyman model (Tai et al., 2009) obtained with hepatocellular carcinoma cases with altered hepatic functions are not applicable to healthy liver.

5. Conclusion

The present results can help in the interpretation of biological liver disturbances detected during the follow-up of cancer patients with initially healthy liver but at risk of other liver disorders. Our data also shows that the time course of benign post-irradiation biological alterations should be limited to 6 months, which is consistent with the course of imaging alterations of the liver observed after irradiation (Sheng et al., 2010).

Beyond these practical considerations, our study raises the question of the relevance of these biological alterations to long-term risk of more severe liver dysfunction, since the data are “located” in a high-risk NTCP area for later organic RILD (Figure 4). Accordingly, it could be suggested that the observation of biological alterations could be an early indicator of more serious organic risk at a later time, beyond 5 years of follow-up, which is however rarely observed in such diseases, and certainly not at the level of probability foreseen by Emami model.

To go forward in this domain, a new model should be established, adapted to biological assessment (Buffa et al., 2001) incorporating more numerous data from different irradiation protocols with varying target doses and taking carefully account of the functional status of the liver and the administration of chemotherapy. In order to contribute to such future studies, we include in full all of our data in Table 1.

Disclosure

All authors confirm their co-authorship and declare that have no conflict of interest with any part of contain of this paper and approve the submission.

References

- Austin-Seymour, M. M., Chen, G. T., Castro, J. R., Saunders, W. M., Pitluck, S., Woodruff, K. H., & Kessler, M. (1986). Dose volume histogram analysis of liver radiation tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12(1), 31-35. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(86\)90412-8](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(86)90412-8)
- Brenner, D. J. (1993). Dose, volume, and tumor-control predictions in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26(1), 171-179. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(93\)90189-3](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(93)90189-3)
- Buffa, F. M., Davidson, S. E., Hunter, R. D., Nahum, A. E., & West, C. M. (2001). Incorporating biologic measurements (SF(2), CFE) into a tumor control probability model increases their prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(5), 1113-1122.
- Burman, C., Kutcher, G. J., Emami, B., & Goitein, M. (1991). Fitting of normal tissue tolerance data to an analytic function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21(1), 123-135. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90172-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(91)90172-Z)
- Dawson, L. A., Normolle, D., Balter, J. M., McGinn, C. J., Lawrence, T. S., & Ten Haken, R. K. (2002). Analysis of radiation-induced liver disease using the Lyman NTCP model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 53(4), 810-821. [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)02846-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016(02)02846-8)
- Emami, B., Lyman, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J. E., Shank, B., Solin, L. J., & Wesson, M. (1991). Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21(1), 109-122. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90171-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(91)90171-Y)

- Kutcher, G. J. (1996). Quantitative plan evaluation: TCP/NTCP models. *Front Radiat Ther Oncol*, 29, 67-80.
- Kutcher, G. J., & Burman, C. (1989). Calculation of complication probability factors for non-uniform normal tissue irradiation: the effective volume method. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 16(6), 1623-1630. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(89\)90972-3](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(89)90972-3)
- Kutcher, G. J., Burman, C., Brewster, L., Goitein, M., & Mohan, R. (1991). Histogram reduction method for calculating complication probabilities for three-dimensional treatment planning evaluations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21(1), 137-146. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90173-2](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(91)90173-2)
- Lawrence, T. S., Robertson, J. M., Anscher, M. S., Jirtle, R. L., Ensminger, W. D., & Fajardo, L. F. (1995). Hepatic toxicity resulting from cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 31(5), 1237-1248. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(94\)00418-K](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(94)00418-K)
- Lawrence, T. S., Ten Haken, R. K., Kessler, M. L., Robertson, J. M., Lyman, J. T., Lavigne, M. L., ... Lichter, A. S. (1992). The use of 3-D dose volume analysis to predict radiation hepatitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23(4), 781-788. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90651-W](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(92)90651-W)
- Lyman, J. T. (1985). Complication probability as assessed from dose-volume histograms. *Radiat Res Suppl*, 8, S13-19.
- Lyman, J. T. (1992). Normal tissue complication probabilities: variable dose per fraction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22(2), 247-250. [http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90040-O](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(92)90040-O)
- Nour, A. A., Alaradi, A., Mohamed, A., Altuwaijri, S., & Rudat, V. (2013). Intensity modulated radiotherapy of upper abdominal malignancies: dosimetric comparison with 3D conformal radiotherapy and acute toxicity. *Radiat Oncol*, 8(1), 207. <http://dx.doi.org/10.1186/1748-717X-8-207>
- Sheng, Y., Wang, Q., Li, Z., Zheng, N., Pei, Y., Chen, L., & Hu, D. (2010). Time-dependent changes in CT of radiation-induced liver injury: a preliminary study in gastric cancer patients. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 30(5), 683-686. <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-010-0565-7>
- Son, S. H., Jang, H. S., Lee, H., Choi, B. O., Kang, Y. N., Jang, J. W., ... Kay, C. S. (2013). Determination of the alpha/beta ratio for the normal liver on the basis of radiation-induced hepatic toxicities in patients with hepatocellular carcinoma. *Radiat Oncol*, 8, 61. <http://dx.doi.org/10.1186/1748-717X-8-61>
- Tai, A., Erickson, B., & Li, X. A. (2009). Extrapolation of normal tissue complication probability for different fractionations in liver irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 74(1), 283-289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.11.029>
- Tanaka, H., Hayashi, S., Ohtakara, K., and Hoshi, H. (2013). Hepatic dysfunction after radiotherapy for primary gastric lymphoma. *J Radiat Res*, 54(1), 92-97. <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rrs062>

Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

RESEARCH

Open Access

Simultaneous in-field boost for patients with 1 to 4 brain metastasis/es treated with volumetric modulated arc therapy: a prospective study on quality-of-life

Damien C Weber^{1,2*}, Francesca Caparrotti¹, Mohamed Laouiti¹ and Karim Malek¹

Abstract

Purpose: To assess treatment toxicity and patients' survival/quality of life (QoL) after volumetric modulated arc therapy (VMAT) with simultaneous in-field boost (SIB) for cancer patients with 1 - 4 brain metastases (BM) treated with or without surgery.

Methods and Materials: Between March and December 2010, 29 BM patients (total volume BM, < 40 cm³) aged < 80 years, KPS ≥ 70, RPA < III were included in this prospective trial. Whole brain VMAT (30 Gy) and a SIB to the BM (40 Gy) was delivered in 10 fraction. Mean age was 62.1 ± 8.5 years. Fifteen (51.7%) underwent surgery. KPS and MMSE were prospectively assessed. A self-assessed questionnaire was used to assess the QoL (EORTC QLQ-C30 with -BN20 module).

Results: As of April 2011 and after a mean FU of 5.4 ± 2.8 months, 14 (48.3%) patients died. The 6-month overall survival was 55.1%. Alopecia was only observed in 9 (31%) patients. In 3-month survivors, KPS was significantly ($p = 0.01$) decreased. MMSE score remained however stable ($p = 0.33$). Overall, QoL did decrease after VMAT. The mean QLQ-C30 global health status ($p = 0.72$) and emotional functional ($p = 0.91$) scores were decreased (low QoL). Physical ($p = 0.05$) and role functioning score ($p = 0.01$) were significantly worse and rapidly decreased during treatment. The majority of BN20 domains and single items worsened 3 months after VMAT except headaches ($p = 0.046$) and bladder control ($p = 0.26$) which improved.

Conclusions: The delivery of 40 Gy in 10 fractions to 1 - 4 BM using VMAT was achieved with no significant toxicity. QoL, performance status, but not MMSE, was however compromised 3 months after treatment in this selected cohort of BM patients.

Introduction

Brain metastases (BMs) occur in 25 to 45% of all cancer patients and represent thus a significant clinical problem in cancer management [1]. Whole brain radiation therapy (WBRT) with steroids is usually the primary treatment option for patients with multiple BMs. Patients with 1 - 4 BMs are routinely treated with surgery and/or radiosurgery, with or without WBRT. After these treatments, local and distant brain failure is however a clinical issue

and occurs in a substantial number of patients. Two prospective phase III trial have shown a 1-year local and/or brain failure rate of 30% - 100% [2,3].

Improvement of local control of BM may not necessarily lead to improved survival but is of paramount importance to maintain neurological function and may be a worthwhile objective, especially in subsets of patients with a better prognosis. Treatment failure has been shown to have an impact on patient's neurocognitive function [4] and possibly quality of life (QoL) [5]. As such, selected subgroups of patients (i.e. younger age, good performance status, controlled primary tumor, absence of extracranial disease and/or limited number of

* Correspondence: damien.weber@hcuge.ch

¹Radiation Oncology Department, Département de l'Imagerie Médical et Science de l'Information (DIMSI), Geneva University Hospital/University of Geneva, CH-1211 Geneva 14, Switzerland

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

BM) might benefit from dose escalation [2,6] although this strategy is historically controversial [7,8]. Any dose escalation paradigm may translate however in increased radiation-induced toxicity and may have a deleterious effect on neurocognitive function and/or QoL. Two studies assessed the QoL in patients with primary brain tumors and BMs [9,10], but no study has studied prospectively this end-point specifically for BM's patients treated with a dose-escalation paradigm. Consequently, we embarked in a prospective study assessing the toxicity, neurocognitive function and QoL of good prognostic patients with 1 - 4 BM treated with a dose escalation strategy using a volumetric modulated arc therapy technique (VMAT).

Patients and methods

Patients and Treatment characteristics

From March 2010 to December 2010, 29 patients with previously untreated brain metastasis were included into an institutional prospective protocol of WBRT with SIB to single or multiple BMs. Patient eligibility for this trial was as follows: histologically proven cancer; brain MRI consistent with BM(s); 1 to 4 BMs; age < 80 years; Karnofsky performance status (KPS) \geq 70; RPA < III; total volume of BM \leq 40 ml and no previous cranial RT. The presence of extracranial disease was allowed. Patients were allowed to undergo craniotomy. Quality-of-life (QoL) was evaluated prospectively using the QLQ-C30 and -BN20 instruments developed by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). The primary end-point of this study was QoL. The secondary endpoints were toxicity, overall survival (OS) and brain progression-free survival (PFS). The characteristics of the patients are detailed in Table 1.

The gross tumor volume (GTV) was defined as the BM and/or the surgical resection cavity. The planning target volume (PTV) was obtained by adding a 3 mm margin to the GTV. In association with WBRT, a SIB was administered to all brain lesions. A composite VMAT plan was generated for all patients, consisting of WBRT (30 Gy in 10 fractions) with a SIB of 10 Gy in 10 fractions to the PTVs. The cumulative dose delivered to the BM(s) was thus 40 Gy in 10 fractions. The treatment plans were generated using a volumetric modulated arc therapy (VMAT) technique, all computed on the Varian Eclipse treatment planning system with 6 MV photon beams from a Varian Clinac equipped with a Millennium Multileaf Collimator (MLC; Novalis Tx, BrainLab, Feldkirchen, Germany) with 120 leaves. Plans were optimized selecting a maximum dose rate of 600 MU/min. Two modulated arcs were used for all patients. Mean UM delivered was 671 ± 142 .

Patients were treated using a thermoplastic immobilization mask used during simulation, with positioning

Table 1 Patient's characteristics (n = 29)

	n	%
Gender		
Male	16	55.2
Female	13	44.8
Age (Years)		
Median	62.3 (range, 42-78.3)	
Mean	62.1 \pm 8.5	
RPA		
I	6	20.7
II	23	79.3
GPA		
0 - 1	3	10.3
1.5 - 2.5	21	72.5
3	3	10.3
3.5 - 4	2	6.9
Primary Tumor		
Lung	22	76.0
Breast	3	10.3
Melanoma	1	3.4
Other	3	10.3
Number of BM		
1	13	44.8
2 - 3	9	30.1
4	7	24.1
Surgery	15	51.7
Concomitant chemotherapy	10	34.5

Abbreviations : RPA, Recursive Partitioning Analysis; GPA, Graded Prognosis Assessment; BM, Brain Metastasis.

determined by co-registration of the simulation kV CT scan with a MVCT scan acquired on the treatment unit.

Quality-of-life questionnaires and administration

QoL in this study was assessed with the EORTC QLQ-C30 (version 3.0) and-QLQ-BN20. The self-administered QLQ-C30 is the EORTC core QoL questionnaire that addresses a range of functional outcomes and symptoms relevant to a wide range of cancer populations [11]. This 30-item questionnaire is composed of both multi-item scales and single-item measures. It is composed of a global health status (GHS) scale (2 items), functional scales (15 items) and symptom scales/items (13 items). Functional scales consist of physical (PF), role (RF), emotional (EF), cognitive and social functioning scales. Each item is scored from 1 to 4 ("not at all": 1; "a little": 2; "quite a

bit”: 3; “very much”: 4). As an exception, GHS is scored from 1 (“very poor”) to 7 (“excellent”). Raw scores (RS) were obtained by calculating the average of all item components. Item range is the difference between the maximum and minimum response to an individual item. The core calculation is detailed in the Appendix. A higher score for the GHS and functional scales represent thus a higher QoL and high level of functioning, respectively. Conversely, a high score for a symptom scale represents a high level of symptomatology.

The self-administered QoL questionnaire BN20 consists of 4 multi-items scale that assesses: future uncertainty (4 items), visual disorder (3 items), motor dysfunction (3 items) and communication deficit (3 items) [12]. Additionally, symptoms are addressed by single items: headaches, hair loss, weakness of legs and bladder control. The scoring algorithm for the scales is similar to the scoring of the EORTC-C30 questionnaire. RS are computed and linearly transformed to a 0 - 100 scale. For the scales and items, a higher score represents *worse* QoL. Details of the in-field testing of the BN20 in a multi-national and multi-lingual setting have been published previously [13].

The QoL assessment took place during the first consultation in the radiation oncology department, during VMAT (week 1 & 2) and every 3 months after the end of VMAT until tumor progression. All QLQ-C30 and -BN20 scores were prospectively collected into an institutional electronic database.

Performance status and neurocognitive function

Performance status was assessed using the standard KPS scale [14]. Neurocognitive function was assessed using the MMSE dementia-scale [15], which has been shown to be a survival prognosticator in BM patients [16]. The baseline and follow-up evaluation of the KPS and MMSE was performed by the same attending radiation oncologist before the start of treatment, during and after VMAT.

Radiation-induced toxicity

Alopecia was classified according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0 grading system http://ctep.cancer.gov/search/search.asp?zoom_query=CTCAE&Action=Go%3E, except for skin toxicity which was scored using the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) scoring system <http://www.rtog.org/ResearchAssociates/AdverseEventReporting/CooperativeGroupCommonToxicityCriteria.aspx>. Toxicity assessment was made during VMAT (week 1 & 2) and every 3 months after the end of VMAT.

Statistical analysis

OS and PFS were calculated using the Kaplan Meier method [17]. Recorded events were death (all causes of

death included) and local and distant brain failure for OS and PFS, respectively. Survival differences between subgroups were evaluated using the log-rank test (p value < 0.05 was considered statistically significant). QoL results are presented as mean scores with standard deviations and were compared between time points using the Wilcoxon rank sum test and a p value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using the SPSS statistical package (SPSS 17.0, Chicago, IL).

Results

Patients' outcome and prognostic factors

After a mean FU of 5.4 ± 2.8 months, 14 (48.3%) patients died. The 6-month OS was 55.1%. Patient undergoing surgery survived significantly longer than those not undergoing surgery: the estimated 6-month OS was 72.0% vs. 33.5%, respectively ($p = 0.035$). Likewise, patients with good performance status lived significantly longer. The estimated 6-month OS was 66.9% and 37.5% for patients with a KPS of 90-100 and 70-80, respectively ($p = 0.025$). Motor dysfunction ($p = 0.11$), emotional functioning (EF; $p = 0.25$), role functioning (RF; $p = 0.27$), future uncertainty ($p = 0.35$), global health status (GHS; $p = 0.38$), MMSE ($p = 0.40$), visual deficit ($p = 0.59$), number of BM ($p = 0.64$), age ($p = 0.66$), communication deficit ($p = 0.79$), gender ($p = 0.80$) and physical functioning (PF; $p = 0.85$) were however not prognostic for OS in this study.

Overall, 6 treatment failures were observed. Three (13.0%) patients presented with local failure but distant brain control and another 3 (13.0%) presented with local control but distant brain failure. The estimated 6-months brain PFS was 77.9%. Overall, 23 (79.4%) patients were controlled locally and distantly in the brain. The majority ($n = 17$ out of 23 tumour progression; 74.0%) presented with progressive extra-cranial systemic disease. Toxicity was minimal. No radiation-induced erythema was observed. Grade CTCAE 1 and 2 alopecia was only observed in 9 (31.0%) patients.

QoL and neurocognitive function

MMSE, KPS and self-assessed QoL were compared during VMAT. Nineteen (65.5%) patients completed all questionnaires before and during VMAT (week 1 and 2). The reasons for not completing the questionnaires in the other 10 (34.5%) patients were as follow: accidental destruction of the QoL questionnaires by the administrative team in 5 patients, deterioration of cognitive function or performance status preventing completing of the questionnaires in 2 patients, non compliance in questionnaire administration by physicians in 2 patients and patient refusal in 1 patients. During VMAT, the performance status decreased although not significantly

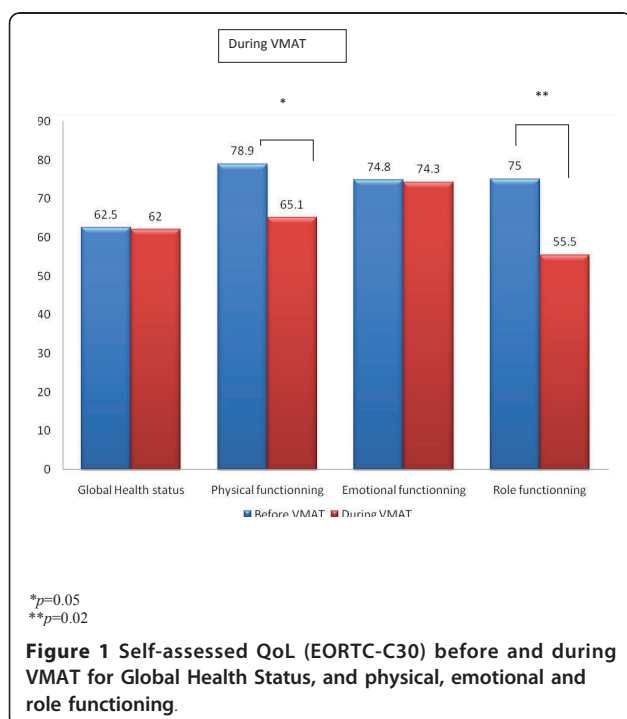
so. Mean KPS before and during VMAT was 89.4 ± 11.6 and 85.3 ± 18.1 , respectively ($p > 0.1$). MMSE significantly improved however during VMAT. Mean MMSE scores were 27.1 ± 2.7 and 28.1 ± 2.5 ($p = 0.04$). During VMAT, GHS remained stable (Figure 1; Table 2). For the C30 functional scale, a statistical trend was observed for decreasing PF during VMAT (Figure 1; Table 2). EF remained fairly stable during VMAT (Figure 1; Table 2). RF was however significantly decreased during VMAT (Figure 1; Table 2). Table 2 details the domain's and single item's scores of the BN20 questionnaire during VMAT. Headaches were significantly decreased during VMAT. Mean headache-BN20 observed scores were 37.0 ± 41.0 and 18.5 ± 23.5 before and during VMAT, respectively ($p = 0.048$; Table 2). A statistical trend was observed for future uncertainty, which decreased during VMAT (Table 2; $p = 0.07$). Communication deficit also decreased during VMAT, although no statistical trend was observed (Table 2; $p = 0.13$). Interestingly, hair loss issues was reported less often during VMAT (Table 2; $p = 0.11$).

MMSE, KPS and self-assessed QoL were also compared for the time points before and 3 months after the start of VMAT. Fourteen (77.8%) patients completed questionnaires at both time points. The reason for not completing the questionnaires in the other 4 (22.2%) patients was death within 3 months after VMAT in all patients. Among the patients completing the questionnaire, 4 (28.6%) presented with systemic progressive disease. Three brain failures (21.4%) were observed. At

3-months follow-up, patients had a significantly worse performance status. Mean KPS scores were 92.1 ± 8.0 and 82.1 ± 15.8 before and after VMAT, respectively ($p = 0.01$). MMSE score were however stable. Mean MMSE scores were 27.3 ± 2.4 and 27.4 ± 4.2 before and 3 months after VMAT, respectively ($p = 0.33$). GHS remained fairly stable (Figure 2; Table 3). For PF, a statistical trend was observed for decreasing values after VMAT (Figure 2; Table 3). EF remained also stable after VMAT (Figure 2; Table 3). RF was however significantly decreased (Figure 2; Table 3).

Table 3 details the domain's and single item's scores of the BN20 questionnaire. Except for headache and bladder control scores, all other scores worsened 3 months after VMAT. As mentioned, headaches were significantly decreased after VMAT. Mean headache-BN20 observed scores were 33.3 ± 37.0 and 7.1 ± 14.2 before and 3 months after VMAT, respectively ($p = 0.046$; Table 3). Interestingly, hair loss was reported more often 3 months after VMAT, although not significantly so. Mean hair loss-BN20 observed scores were 14.3 ± 31.2 and 23.8 ± 30.5 before and 3 months after VMAT, respectively ($p = 0.48$; Table 3).

MMSE, KPS and self-assessed QoL were also compared for the time points before and 6 months after the start of VMAT. Five (17.2%) patients completed questionnaires at both time points. All other patients with complete C30 and BN20 data did not reach this time point. In these patients, no local or distant brain failure was observed. One patient presented with progressive extra-cranial systemic disease. Mean KPS scores were 94.0 ± 5.5 and 90 ± 14.1 before and 6 months after VMAT, respectively ($p = 0.41$). Mean MMSE scores were 27.0 ± 2.4 and 27.8 ± 2.9 before and 6 months after VMAT, respectively ($p = 0.18$). EORTC-C30 scores remained stable (Table 4). Table 4 also details the domain's and single item's scores of the BN20 questionnaire. All but communication deficit domains were non-significantly worse at 6 months (Table 4).



Discussion

To the best of our knowledge, the present study is the first series ever published on a prospective evaluation of QoL in patients with BM, not including primary brain tumors, treated with VMAT and dose escalation. The efforts at developing new therapeutic strategies in BM should not only focus on increasing survivorship but should also assess their relative impact on QoL. Dose escalation may be potentially neurotoxic and thus negatively affect health-related QoL in these BM patients. As such, we embarked in a careful prospective evaluation of QoL in a pilot VMAT dose escalation protocol. Our data suggests several comments. First, QoL assessment was indeed difficult in this patient cohort, even though

Table 2 EORTC-C30 and -BN20 domain and single item's scores before and during VMAT

QoL	Pre-VMAT score \pm SD	Score during VMAT \pm SD	p value
C30			
Global Health Status	62.5 \pm 26.4	62.0 \pm 21.4	0.92
Physical functioning	78.9 \pm 22.9	65.1 \pm 31.2	0.05
Emotional functioning	74.8 \pm 20.1	74.3 \pm 27.0	0.86
Role functioning	75.0 \pm 21.6	55.5 \pm 37.1	0.02
BN20 domains/items			
<i>Domains</i>			
Future uncertainty	30.8 \pm 20.9	18.8 \pm 23.5	0.07
Visual disorder	13.6 \pm 20.7	13.3 \pm 17.4	0.92
Motor dysfunction	22.5 \pm 24.1	22.2 \pm 26.9	0.64
Communication deficit	19.7 \pm 28.1	13.6 \pm 16.8	0.13
<i>Single items</i>			
Headache	37.0 \pm 41.0	18.5 \pm 23.5	< 0.05
Hair loss	14.8 \pm 30.7	3.7 \pm 15.7	0.11
Weakness of legs	24.1 \pm 29.8	25.9 \pm 31.4	0.58
Bladder control	16.7 \pm 30.8	14.8 \pm 28.5	0.79

Abbreviations: QoL: Quality of life; SD, standard deviation.

a dedicated physician was assigned to do the QoL assessment. The difficulty in assessing QoL or neurocognitive function in patients with BM has been reported by other investigators [5,14]. Only one patient out of two could be assessed at the 3 months post-VMAT time point, as a result of decreasing performance status and/or cognitive function, administrative issues or patient refusal. Second, the overall QoL of these patients did indeed decrease 3 months after VMAT as reported by other authors [18](Table 3). In order to avoid any

potential bias originating from the death of patients with poor-QoL, the comparison of QoL at the two time points (i.e. baseline and at 3 months) was performed using only data from patients completing questionnaires at both time points [19]. Additionally, performance status did also significantly decrease, but the neurocognitive function, assessed with the MMSE, appeared to be stable in this small cohort. Interestingly, the levels of three EORTC-BN20 domains, namely visual disorder, motor dysfunction and communication deficit, remained stable at this time point, suggesting a possible association between MMSE and these scores, as reported by other authors [13]. Third, except for physical and role functioning (Figure 1), the observed QoL did not substantially decrease during treatment. MMSE significantly increased during treatment, possibly as a result of the therapeutic effect of radiation. Although one third of patients experienced alopecia, the EORTC-BN20 mean score for this item was decreased (Table 2), suggesting that there is not necessarily agreement between patient and physician reports of symptoms or toxicity [20,21]. Some EORTC-BN20 domains were even improved during VMAT (Table 2), with an observed statistical trend for future uncertainty levels, which may reflect the effectiveness of coping strategies. Finally, lower functional and GHS scores in the EORTC-C30 questionnaire and higher EORTC-BN20 domain's scores were associated with decreased survival suggesting that these scores may be relevant prognosticators for BMs [18]. Although no statistical trend was observed, possibly as a result of small numbers, all Kaplan-Meier curves were parallel to

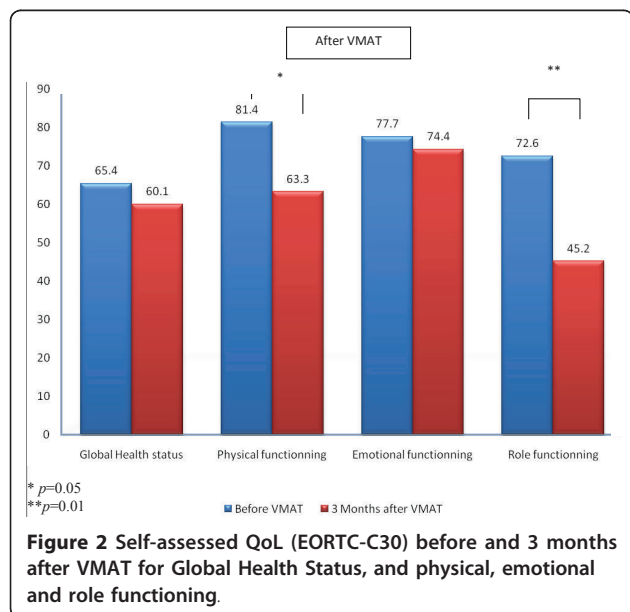


Table 3 EORTC-C30 and -BN20 domain and single item's scores before and 3 months after VMAT

QoL	Pre-VMAT score \pm SD	Score during VMAT \pm SD	p value
C30			
Global Health Status	65.4 \pm 22.8	60.1 \pm 26.6	0.72
Physical functioning	81.4 \pm 17.6	63.3 \pm 29.8	0.05
Emotional functioning	77.7 \pm 21.2	74.4 \pm 26.2	0.91
Role functioning	72.6 \pm 22.3	45.2 \pm 37.8	0.01
BN20 domains/items			
<i>Domains</i>			
Future uncertainty	27.1 \pm 20.7	27.4 \pm 31.6	0.66
Visual disorder	12.7 \pm 21.3	15.1 \pm 21.2	0.25
Motor dysfunction	21.4 \pm 24.8	22.2 \pm 33.5	0.96
Communication deficit	23.0 \pm 30.3	27.8 \pm 29.5	0.55
<i>Single items</i>			
Headache	33.3 \pm 37.0	7.1 \pm 14.2	< 0.05
Hair loss	14.3 \pm 31.2	23.8 \pm 30.5	0.48
Weakness of legs	21.4 \pm 24.8	28.6 \pm 34.2	0.39
Bladder control	21.4 \pm 33.6	11.9 \pm 24.8	0.26

Abbreviations: QoL: Quality of life; SD, standard deviation.

what was expected, i.e. worse QoL was related to decreased survivorship (data not shown). Using traditional method of statistical analysis (i.e. Cox multivariate model) controlled for major clinical prognostic factors, some EORTC-C30 or -BN20 items, such as cognitive function or GHS, have been significantly associated with survival in two prospective trials [22,23], although these results are controversial [9,24,25]. The mechanisms underlying these potential associations are however

unclear. QoL scores may reflect the patient's physical and psychological state that may have a positive effect on the overall disease process (i.e. higher QoL score are a proxy for the patient's health status that may have a positive effect on the underlying disease). Alternatively to this true causative relationship, these scores may reveal the early perception and severity of the disease more accurately than conventional prognostic indices (i.e. lower QoL score reflect a worse underlying disease).

Table 4 EORTC-C30 and -BN20 domain and single item's scores before and 6 months after VMAT

QoL	Pre-VMAT score \pm SD	Score during VMAT \pm SD	p value
C30			
Global Health Status	62.5 \pm 26.4	68.8 \pm 20.8	0.47
Physical functioning	78.9 \pm 22.9.6	71.9 \pm 26.0	0.72
Emotional functioning	74.8 \pm 20.1	70.0 \pm 41.5	0.89
Role functioning	75.0 \pm 21.6	73.3 \pm 41.8	0.72
BN20 domains/items			
<i>Domains</i>			
Future uncertainty	26.0 \pm 23.5	30.0 \pm 41.5	0.72
Visual disorder	15.5 \pm 12.7	28.9 \pm 36.5	0.41
Motor dysfunction	15.5 \pm 16.8	24.4 \pm 30.8	0.59
Communication deficit	22.2 \pm 28.3	6.6 \pm 6.1	0.29
<i>Single items</i>			
Headache	26.7 \pm 43.5	20.0 \pm 29.8	0.99
Hair loss	13.3 \pm 29.8	0.0 \pm 0.0	0.32
Weakness of legs	20.0 \pm 18.2	26.6 \pm 27.9	0.66
Bladder control	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.00

Abbreviations: QoL: Quality of life; SD, standard deviation.

Of note, several issues, such as the intercorrelation of the QoL parameters or the high variability in survival in patients with identical QoL scores to name a few, have been raised by the use of classical methods of statistical computation [23]. Further research regarding the prognostic value of health-related QoL is justified in the framework of future prospective trials.

We sought to investigate whether a hypofractionated SIB approach for the treatment of patients with 1 - 4 BMs would be a safe alternative to WBRT with or without radiosurgery. The observed toxicity was minimal. Less than one third of patients had alopecia at the end of treatment. These results may be in keeping with recent phase I dose escalation studies reporting the toxicity in patients treated with WBRT and an SIB technique [26,27]. In the US study, alopecia and skin reaction were reported in 16% and 6% of patients, respectively [26]. The reduction of the observed alopecia rates, when compared to those observed with WBRT, may have an impact on the patient's QoL, as assessed by the EORTC-BN20 questionnaire (Table 4).

The treatment of patients with BM can consist of best supportive care, surgery or radiosurgery with or without WBRT. We have included patients with one BM in our treatment protocol as the modulation of the WBRT by a VMAT approach may produce steeper radiation-dose gradients than plans with conventional WBRT summed with radiosurgery dose deposition [28]. For patients with good- to intermediate-prognosis (i.e. RPA I - II), such as those treated in our protocol, a multi-modality treatment strategy is usually proposed with the aim of preventing intracranial progression, preserving the neurologic function and possibly the overall QoL. In our study, local and distant brain tumor control was achieved in a majority of patients. Unfortunately, systemic extracranial progression was observed in a majority (74.0%) of patients with a consequential impact on survivorship. Interestingly, the estimated 6-months OS was significantly increased (72% vs. 33.5%) when surgery was performed to patients with 1 - 4 BM. These results should be interpreted cautiously, as they may be subject to uncontrolled patient selection into different treatment groups (i.e. better KPS and RPA/GPA scores for patients undergoing surgery). They are however in line with several prospective studies confirming the importance of surgery in selected patients [29,30]. Although we did not perform a multivariate analysis as the number of events relative to the potential parameters was inappropriate, these data suggest that dose escalation only with a SIB technique may not be the optimal treatment for these good- to intermediate-prognosis patients.

There were several limitations of our study. First, the small sample size of 29 patients limited the statistical power to assess fully the QoL of BM patients treated with VMAT and to detect associations between survival

and the EORTC-C30 and -BN20 parameters. Second, the rate of completion of the questionnaires in these severely ill patients, although identical to the compliance rate reported in the literature, was suboptimal. High compliance in questionnaire completion is difficult to achieve in severely ill patients as their condition deteriorates over time. Third, as the number of brain progressions was low, the impact of this event on patient's QoL at the 3 months time point was not assessable. This being said, this study was a prospective study with specific QoL endpoints and the BM patient cohort studied was homogeneous and represented a good- to intermediate-prognosis population for whom the QoL is of paramount importance.

In summary, the delivery of 40 Gy in 10 fractions using a VMAT technique was achieved with no significant toxicity. The majority of patients presented with extracranial progressive disease. Surgery and performance status were significant prognostic factors for survival. Although the QoL did not decrease significantly during treatment, a decrease of several EORTC-C30 and -BN20 parameters was observed at 3 months after VMAT.

Additional material

Additional file 1: Appendix. Equations for functional scale, GHS and symptom scales/items scores.

Abbreviations

GPA: Graded Prognostic Assessment; BM: brain metastasis; KPS: Karnofsky performance status; RPA: recursive partitioning analysis; RTOG: Radiation Therapy Oncology Group; CTCAE: National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events; VMAT: volumetric modulated arc therapy; QoL: Quality of Life; WBRT: Whole brain radiotherapy; EORTC: European Organization for research and Treatment of Cancer; MMSE: Mini Mental State Examination; GHS: Global Health Status; PF: Physical functioning; EF: Emotional functioning; RF: Role functioning.

Author details

¹Radiation Oncology Department, Département de l'Imagerie Médical et Science de l'Information (DIMSI), Geneva University Hospital/University of Geneva, CH-1211 Geneva 14, Switzerland. ²University of Geneva, CH-1211 Geneva, Switzerland.

Authors' contributions

DCW was responsible for the primary concept and the design of the study; FC, ML, KM and DCW, performed the data capture and analysis. FC and DCW drafted the manuscript; DCW performed the statistical analysis; FC and DCW reviewed patient data; all authors revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 May 2011 Accepted: 30 June 2011 Published: 30 June 2011

References

1. Nussbaum ES, Djalilian HR, Cho KH, Hall WA: **Brain metastases. Histology, multiplicity, surgery, and survival.** *Cancer* 1996, **78**(8):1781-8.

2. Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, Flanders AE, Gaspar LE, Schell MC, *et al*: Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet* 2004, **363**(9422):1665-72.
3. Kondziolka D, Patel A, Lunsford LD, Kassam A, Flickinger JC: Stereotactic radiosurgery plus whole brain radiotherapy versus radiotherapy alone for patients with multiple brain metastases. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1999, **45**(2):427-34.
4. Meyers CA, Smith JA, Bezjak A, Mehta MP, Liebmann J, Illidge T, *et al*: Neurocognitive function and progression in patients with brain metastases treated with whole-brain radiation and motexafin gadolinium: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2004, **22**(1):157-65.
5. Li J, Bentzen SM, Li J, Renschler M, Mehta MP: Relationship between neurocognitive function and quality of life after whole-brain radiotherapy in patients with brain metastasis. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2008, **71**(1):64-70.
6. Casanova N, Mazouni Z, Bieri S, Combesure C, Pica A, Weber DC: Whole brain radiotherapy with a conformational external beam radiation boost for lung cancer patients with 1-3 brain metastasis: a multi institutional study. *Radiat Oncol* 2010, **5**:13.
7. Harwood AR, Simson WJ: Radiation therapy of cerebral metastases: a randomized prospective clinical trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1977, **2**(11-12):1091-4.
8. Borgelt B, Gelber R, Kramer S, Brady LW, Chang CH, Davis LW, *et al*: The palliation of brain metastases: final results of the first two studies by the Radiation Therapy Oncology Group. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 6(1):1-9.
9. Sehlen S, Lenk M, Hollenhorst H, Schymura B, Aydemir U, Herschbach P, *et al*: Quality of life (QoL) as predictive mediator variable for survival in patients with intracerebral neoplasma during radiotherapy. *Onkologie* 2003, **26**(1):38-43.
10. Regine WF, Schmitt FA, Scott CB, Dearth C, Patchell RA, Nichols RC Jr, *et al*: Feasibility of neurocognitive outcome evaluations in patients with brain metastases in a multi-institutional cooperative group setting: results of Radiation Therapy Oncology Group trial BR-0018. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004, **58**(5):1346-52.
11. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, *et al*: The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**(5):365-76.
12. Osoba D, Aaronson NK, Muller M, Sneeuw K, Hsu MA, Yung WK, *et al*: The development and psychometric validation of a brain cancer quality-of-life questionnaire for use in combination with general cancer-specific questionnaires. *Qual Life Res* 1996, **5**(1):139-50.
13. Taphoorn MJ, Claassens L, Aaronson NK, Coens C, Mauer M, Osoba D, *et al*: An international validation study of the EORTC brain cancer module (EORTC QLQ-BN20) for assessing health-related quality of life and symptoms in brain cancer patients. *Eur J Cancer* 2010, **46**(6):1033-40.
14. Komosinska K, Kepka L, Niwinska A, Pietrzak L, Wierchowski M, Tyc-Szczepaniak D, *et al*: Prospective evaluation of the palliative effect of whole-brain radiotherapy in patients with brain metastases and poor performance status. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 2010, **49**(3):382-8.
15. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR: "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975, **12**(3):189-98.
16. Murray KJ, Scott C, Zachariah B, Michalski JM, Demas W, Vora NL, *et al*: Importance of the mini-mental status examination in the treatment of patients with brain metastases: a report from the Radiation Therapy Oncology Group protocol 91-04. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2000, **48**(1):59-64.
17. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:458-481.
18. Steinmann D, Schafer C, van Oorschot B, Wypior HJ, Bruns F, Bolling T, *et al*: Effects of radiotherapy for brain metastases on quality of life (QoL). Prospective pilot study of the DEGRO QoL working party. *Strahlenther Onkol* 2009, **185**(3):190-7.
19. Vordermark D: Avoiding bias in the prospective evaluation of patients with brain metastases. *J Clin Oncol* 2007, **25**(25):4023, author reply 4024-5.
20. Fromme EK, Eilers KM, Mori M, Hsieh YC, Beer TM: How accurate is clinician reporting of chemotherapy adverse effects? A comparison with patient-reported symptoms from the Quality-of-Life Questionnaire C30. *J Clin Oncol* 22(17):3485-90.
21. Basch E, Iasonos A, McDonough T, Barz A, Culin A, Kris MG, *et al*: Patient versus clinician symptom reporting using the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events: results of a questionnaire-based study. *Lancet Oncol* 2006, **7**(11):903-9.
22. Mauer M, Stupp R, Taphoorn MJ, Coens C, Osoba D, Marosi C, *et al*: The prognostic value of health-related quality-of-life data in predicting survival in glioblastoma cancer patients: results from an international randomised phase III EORTC Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, and NCIC Clinical Trials Group study. *British journal of cancer* 2007, **97**(3):302-7.
23. Mauer ME, Taphoorn MJ, Bottomley A, Coens C, Efficace F, Sanson M, *et al*: Prognostic value of health-related quality-of-life data in predicting survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas, from a phase III EORTC brain cancer group study. *J Clin Oncol* 2007, **25**(36):5731-7.
24. Meyers CA, Hess KR, Yung WK, Levin VA: Cognitive function as a predictor of survival in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 18(3):646-50.
25. Klein M, Postma TJ, Taphoorn MJ, Aaronson NK, Vandertop WP, Muller M, *et al*: The prognostic value of cognitive functioning in the survival of patients with high-grade glioma. *Neurology* 2003, **61**(12):1796-8.
26. Rodrigues G, Yartsev S, Yaremko B, Perera F, Dar AR, Hammond A, *et al*: Phase I Trial of Simultaneous In-Field Boost With Helical Tomotherapy for Patients With One to Three Brain Metastases. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2010.
27. Bauman G, Yartsev S, Fisher B, Kron T, Laperriere N, Heydarian M, *et al*: Simultaneous infield boost with helical tomotherapy for patients with 1 to 3 brain metastases. *American journal of clinical oncology* 2007, **30**(1):38-44.
28. Lagerwaard FJ, van der Hoorn EA, Verbakel WF, Haasbeek CJ, Slotman BJ, Senan S: Whole-brain radiotherapy with simultaneous integrated boost to multiple brain metastases using volumetric modulated arc therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009, **75**(1):253-9.
29. Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, Dempsey RJ, Maruyama Y, Kryscio RJ, *et al*: A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *The New England journal of medicine* 1990, **322**(8):494-500.
30. Noordijk EM, Vecht CJ, Haaxma-Reiche H, Padberg GW, Voormolen JH, Hoekstra FH, *et al*: The choice of treatment of single brain metastasis should be based on extracranial tumor activity and age. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1994, **29**(4):711-7.

doi:10.1186/1748-717X-6-79

Cite this article as: Weber *et al*: Simultaneous in-field boost for patients with 1 to 4 brain metastasis/es treated with volumetric modulated arc therapy: a prospective study on quality-of-life. *Radiation Oncology* 2011 6:79.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Sciences médicales / Medical sciences

Réponse individuelle aux radiations ionisantes : quel(s) test(s) prédictif(s) choisir ?

Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose?

Adeline Granzotto^{a,b,1}, Aurélie Joubert^{c,1}, Muriel Viau^a, Clément Devic^a,
Mira Maalouf^{a,d}, Charles Thomas^a, Guillaume Vogin^{a,b,e}, Karim Malek^f,
Catherine Colin^{e,g}, Jacques Balosso^{b,f}, Nicolas Foray^{a,*}

^a Inserm, U836, groupe de radiobiologie, institut des neurosciences, chemin Fortuné-Ferrini, 38042 Grenoble, France

^b Centre de hadronthérapie Étoile, 69008 Lyon, France

^c Société Magelis, 84160 Cadenet, France

^d Centre national d'études spatiales, 75001 Paris, France

^e EA 3738, faculté de médecine, Lyon-Sud, 69921 Oullins, France

^f Service de radiothérapie, CHU A.-Michallon, 38042 Grenoble, France

^g Service de radiologie, CHU Lyon-Sud, 69490 Pierre-Bénite, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 25 octobre 2010

Accepté après révision le 29 décembre 2010

Mots clés :

Radiosensibilité

Radiations

Radiothérapie

Tests prédictifs

Expression

Mutations

Réparation de l'ADN

Keywords:

Radiosensitivity

Radiations

Predictive assays

Gene expression

Mutations

Gene functions

DNA repair

RÉSUMÉ

La réponse individuelle aux radiations ionisantes est une donnée indispensable pour fournir un traitement radiothérapeutique efficace contre la tumeur tout en évitant les complications sur les tissus sains. En 1981, Fertil et Malaise démontrèrent que l'évaluation de la survie clonogénique de cellules irradiées issues d'une biopsie pouvait prédire la radiocurabilité des tumeurs. De plus, ces auteurs ont rappelé le bien-fondé du concept de radiosensibilité intrinsèque spécifique à chaque individu, organe ou tissu (Fertil et Malaise, 1981) [1]. Plusieurs groupes de recherche ont tenté de déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité pour proposer des tests prédictifs fiables et plus rapides que les protocoles de survie clonogénique. La récente révolution de la génomique a fourni de nombreuses données mais leur lien avec la radiosensibilité reste à définir. Le dépistage de certaines mutations de gènes ne suffit pas à décrire toute la radiosensibilité humaine. Les approches consistant à examiner certaines fonctions biologiques comme la réparation de l'ADN paraissent plus prometteuses pour prédire les réactions suraiguës survenant après une radiothérapie. Dans cette revue, ont été analysées les contributions des approches majeures de la prédiction de la radiosensibilité humaine.

© 2011 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Individual response to ionizing radiation is an important information required to apply an efficient radiotherapy treatment against tumour and to avoid any adverse effects in normal tissues. In 1981, Fertil and Malaise have demonstrated that the post-irradiation local tumor control determined *in vivo* is correlated with clonogenic cell survival assessed *in vitro*. Furthermore, these authors have reminded the relevance of the concept of intrinsic radiosensitivity that is specific to each individual organ (Fertil and Malaise, 1981) [1]. To date, since clonogenicity assays are too time-consuming and do not provide any other molecular information, a plethora of research groups have attempted to determine the

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : nicolas.foray@inserm.fr (N. Foray).

¹ Ces deux auteurs ont contribué de façon égale à cette revue.

molecular bases of intrinsic radiosensitivity in order to propose reliable and faster predictive assays. To this aim, several approaches have been developed. Notably, the recent revolution in genomic and proteomic technologies is providing a considerable number of data but their link with radiosensitivity still remains to be elucidated. On another hand, the systematic screening of some candidate genes potentially involved in the radiation response is highlighting the complexity of the molecular and cellular mechanisms of DNA damage sensing and signalling and shows that an abnormal radiation response is not necessarily due to the impairment of one single protein. Finally, more modest approaches consisting in focusing some specific functions of DNA repair seem to provide more reliable clues to predict over-acute reactions caused by radiotherapy. In this review, we endeavoured to analyse the contributions of these major approaches to predict human radiosensitivity.

© 2011 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Les réactions suraiguës post-traitement : une définition encore subjective

1.1. Une limitation pour les traitements

On compte chaque année en France environ 320 000 nouveaux cas de cancers. Une grande majorité d'entre eux sont traités par radiothérapie. Toutefois, certains patients, dont la proportion est généralement estimée entre 1 et 10 %, peuvent présenter des réactions tissulaires suraiguës dont la gravité et la date d'apparition dépendent de la nature du traitement, de la localisation tumorale et vraisemblablement du statut génétique. Les réactions tissulaires les plus fréquentes ne concernent pas systématiquement la peau avec les érythèmes et les dermites bien décrits et souvent subis par les pionniers des radiations. En effet, les praticiens peuvent faire face à des recitites pour les cancers de la prostate, des fibroses pour les cancers de l'œsophage, etc. Toutes ces réactions limitent le bon déroulement du traitement et peuvent même l'arrêter dans certains cas extrêmes [2,3].

1.2. Réactions précoces et tardives ou un continuum de réactions étalées dans le temps ?

Depuis des décennies, les réactions suraiguës post-irradiation ont été le plus souvent divisées en réactions *précoces* et réactions *tardives* [2,3]. En fait, les inflammations, infections, ulcères, fibroses, nécroses, arrêts fonctionnels, etc., sont rencontrés dans des périodes de temps très variables pendant ou après la fin du traitement. Des corrélations entre les réactions précoces et les réactions tardives ont été signalées pour certains tissus [4]. Dörr et Hendry ont introduit en 2001 la notion de réactions tardives dites « aggravées » (*consequential late effects* ou *CLE*) qui concernent essentiellement un organe, généralement associé aux réactions radio-induites précoces, qui peut subir un stress mécanique ou chimique causant un traumatisme supplémentaire pour les tissus sous-jacents. C'est le cas notamment du système urinaire et intestinal et, dans une certaine mesure, de la peau [3]. On peut parler ici de réponse clinique des systèmes biologiques intégrés. Toutefois, avec le développement de thérapies innovantes basées sur un dépôt d'énergie de plus en plus massif dans la tumeur, l'incidence de certaines réactions considérées comme tardives avec les modalités courantes sont devenues de plus en plus précoces : un véritable continuum dans la

survenue et la gravité des réactions suraiguës post-irradiation est apparu progressivement, remettant en cause la distinction entre ces deux types de réactions [3].

1.3. Une multitude d'échelles de gravité

Au vu de la complexité des phénomènes, il paraît clair qu'à ce jour, les actions concernant les réactions suraiguës dues au traitement anti-cancéreux se font toujours sur la seule base de l'expérience du clinicien et non sur des critères quantifiables de biologie moléculaire, cellulaire ou tissulaire, faute de paramètres fiables et identifiés. Le terme-même de réactions « suraiguës », adopté arbitrairement tout au long de cette revue fait encore débat. En dépit d'un certain nombre de tentatives, la définition et la classification des réactions suraiguës post-irradiation n'est pas consensuelle. En effet, ces réactions suraiguës sont justement définies sur des observations macroscopiques difficilement quantifiables et des bases temporelles qui sont peut-être aujourd'hui à moduler pour les raisons évoquées plus haut. Citons toutefois les échelles WHO (1979), CTC (1983), RTOG/EORTC (1984), LENT (1995), CTC (1998), CTCAE (2003) qui sont représentatives des efforts de la communauté pour une classification universelle [2]. L'insuffisance de prédiction et de définition biologique et clinique des réactions suraiguës post-traitement explique pourquoi leur nombre exact reste encore méconnu dans les centres anti-cancer et les centres hospitaliers.

1.4. Réactions tissulaires post-irradiation et erreurs de dosimétrie

À la suite des accidents de surirradiation d'Epinal et de Toulouse, une échelle a été mise en place pour informer le public sur les événements de radioprotection affectant des patients dans le cadre d'une procédure de radiothérapie. Résultat des efforts de l'Autorité de sûreté nucléaire (ASN), de la Société française de radiothérapie oncologique (SFRO) et de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), cette échelle prend en compte des effets inattendus ou imprévisibles dus à des doses ou à des volumes irradiés inappropriés mais ne concerne pas les éventuels effets secondaires, quel que soit leur grade, résultant de la stratégie de traitement retenue par le praticien en concertation avec le patient (voir les sites <http://www.asn.fr>, <http://www.sfro.org> et <http://www.irsn.fr>). Les réactions suraiguës post-irradiation ont été d'ailleurs

intuitivement et souvent associées à des erreurs de dosimétrie [5]. Évoquons au moins deux explications possibles :

- la formation : par obligation réglementaire, les praticiens sont tenus de suivre des formations en radioprotection qui n'incluent pas forcément les développements les plus récents de radiobiologie. Les radiothérapeutes travaillent chaque jour en collaboration étroite avec les radiophysiciens alors que les radiobiologistes, peu nombreux, ne sont généralement pas intégrés à l'hôpital ni ne participent aux réunions régulières de travail et de concertation. Ainsi, il est donc naturel que les cliniciens se tournent préférentiellement vers leurs collègues radiophysiciens quand un patient montre des réactions suraiguës, d'autant plus que les mêmes manifestations cliniques seraient attendues si la dose de radiation était effectivement plus élevée ;
- les connaissances : le lien causal entre les réactions suraiguës tissulaires et les altérations moléculaires n'est pas encore clairement établi. Ce constat pose le problème de la définition de la dose biologique, bien distincte de celle de la dose physique, tant en termes spatiaux que temporels. Comme on le verra plus loin, la complexité des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse aux radiations explique qu'aucun test prédictif de la radiosensibilité n'ait été encore accrédité et pourquoi de très nombreuses directions ont été suivies par les radiobiologistes, jetant alors le trouble dans la démarche à suivre pour les praticiens.

Alors que la démarche du praticien vers le radiobiologiste reste encore rare, la littérature scientifique suggère pourtant que la susceptibilité individuelle joue un rôle important dans la réponse finale au traitement anti-cancer. En particulier, lors des accidents de surirradiation d'Epinal et de Toulouse, les mêmes erreurs dosimétriques ont été commises sur tous les patients alors qu'un large gradient de sévérité dans les réactions tissulaires a été observé [5]. Cette dernière remarque suggère l'impact possible de la susceptibilité individuelle dans la réponse au traitement anti-cancer. La prise en compte du statut génétique des tissus sains du patient apparaît donc de plus en plus indispensable tant dans le choix du traitement que dans la prévention des réactions suraiguës [6,7].

2. La radiosensibilité intrinsèque : une évidence centenaire

2.1. La susceptibilité individuelle aux radiations : l'évidence d'un continuum

À ce stade de la revue, citons une communication écrite par M. Bouchacourt en 1911. Ce Chef du service de radiologie de l'hôpital Dubois décrit l'arrivée dans son service d'un jeune couple de personnes de 27 et 23 ans qui souhaitaient se faire épiler par irradiation [8]. Au départ réticent à ce genre de traitement, Bouchacourt s'y plie finalement et décrit en détails les différentes évolutions des érythèmes et dermites sur les différentes parties du

corps du patient et de la patiente dans un article au titre évocateur : « *Sur la différence de sensibilité aux rayons de Röntgen des différents sujets, et sur le même sujet, des différentes régions du corps* ». Il déduit de ses observations l'évidence d'une spécificité de la réponse entre individus mais également entre organes, premiers jalons de la notion de radiosensibilité intrinsèque [8]. Dans ce texte aux apparences anecdotiques, le lecteur appréciera la précision du radiologue qui décrit des phénomènes de voisinage (effets abscopiques ou *bystander*) quand les réactions cutanées sont observées sur des territoires non irradiés. Quelques années plus tard, à partir de données in vitro cette fois, Claudius Regaud insistera sur le continuum des effets des radiations [9]. Ainsi, alors que les variations individuelles d'incidence des réactions suraiguës représentaient une évidence pour la majorité des praticiens au début du xx^e siècle et suggéraient logiquement l'établissement d'une individualisation des soins, les contraintes pratiques et économiques firent disparaître la notion de susceptibilité individuelle à travers la mise au point de traitements anti-cancer standard. En parallèle, de nombreux travaux sur des modèles sophistiqués de levures ou de rongeurs ont contribué à accroître nos connaissances dans le rôle de chaque protéine impliquée dans la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN mais ont fait oublier les notions de continuum des réponses aux radiations [10]. En effet, à la fois in vitro et in vivo, des études très moléculaires ont contribué à considérer la réponse aux radiations comme un phénomène de tout ou rien avec des couples d'échantillons très radiorésistants et très radiosensibles [6]. D'ailleurs, les radiosensibilités extrêmes des modèles animaux sont généralement associées à des mutations de protéines qui n'existent pas chez l'homme [6,11]. Les premiers essais prédictifs basés sur des concepts de biologie moléculaire furent ainsi éprouvés, non sur une large gamme de radiosensibilité mais avec des couples radiosensibles-radiorésistants non représentatifs des cas cliniques : l'évidente nécessité de disposer de paramètres biologiques quantifiables et de prédire chaque niveau de gravité des réponses aux radiations disparut au profit des projets de recherche monogéniques qui représentent encore aujourd'hui la quasi-totalité des communications traitant de radiobiologie des tissus sains [6,11]. Concernant la radiobiologie des tumeurs, une approche plus cellulaire et plus proche de la clinique fut menée en se basant sur l'impact de l'oxygénation et des phénomènes d'hypoxie.

2.2. La radiosensibilité définie par convention

Comment définir la notion de radiosensibilité afin qu'elle soit quantifiable et valable tant in vivo qu'in vitro ? Cette question résume les efforts fournis pendant les 60 premières années de la radiobiologie (Fig. 1). En 1896, le médecin lyonnais Victor Despeignes soumit un de ses patients souffrant d'un cancer de l'estomac à l'un des tout premiers traitements radiothérapeutiques : « *...je pus soumettre le malade chaque jour à 2 séances d'une heure ... Au bout de 8 jours d'un tel traitement, je constatais ... une diminution considérable du volume de la tumeur...* » [12]. En 1901, Pierre Curie voulant reproduire une première

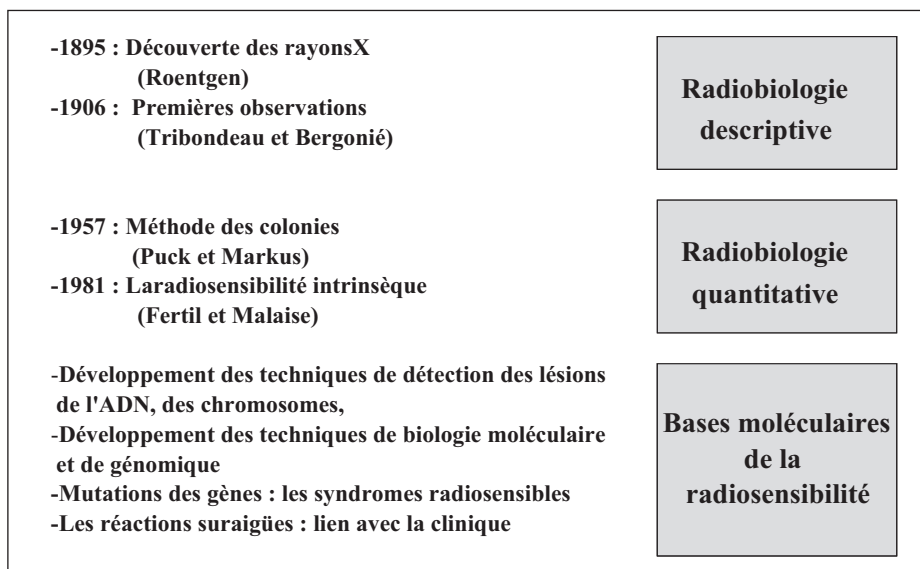


Fig. 1. Illustration schématique des différentes démarches de la radiobiologie depuis la découverte des rayons X par Röntgen : après une période descriptive des effets des radiations au niveau tissulaire puis cellulaire, où figurent en pionniers les travaux de Pierre Curie et de Victor Despeignes, suit une période de quantification initiée par les travaux de Puck et Markus [14] sur les techniques de mesure de la survie clonogénique. Jusque dans les années 1980, une somme considérable de données sur la survie clonogénique a permis la mise en évidence de la radiosensibilité intrinsèque [1]. Cette étape coïncide avec la mise au point d'un nombre croissant de techniques de détections des dommages de l'ADN puis d'outils de biologie moléculaire et de génomique afin de déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité.

expérience réalisée par l'allemand Giesel, appliqua sur son bras une ampoule contenant du radium : « ...*M. Curie a reproduit sur lui-même l'expérience ... en faisant agir sur son bras ... pendant 10 h du chlorure de baryum radifère...* ...*52 jours après...*, il reste encore une plaie grisâtre indiquant une mortification profonde... » [13]. Ces deux exemples historiques montrent, avec celui de Bouchacourt, que la biologie des radiations resta descriptive dans ses premières années, faute de paramètres quantifiables (Fig. 1). Deux conclusions s'imposent :

- avec Despeignes, la réduction du volume tumoral (ou contrôle local) apparaît comme le meilleur paramètre pour décrire l'effet stérilisant des radiations ;
- avec Curie, le processus de mort cellulaire et tissulaire s'avère complexe et étalé dans le temps. De plus, la plupart des cellules restent physiquement présentes, suggérant que la mort cellulaire n'est pas nécessairement associée à une disparition physique de la cellule. Les connaissances biologiques n'étaient pas suffisantes à l'époque pour définir un paramètre quantifiable précis.

Ainsi, la mort radiobiologique fut définie comme la perte définitive de la capacité de division des cellules irradiées, puisque une telle définition restait commune à l'approche radiothérapeutique des cancers consistant à stériliser les tumeurs et aux observations expérimentales sur les morts tissulaires. Il fallut cependant attendre une soixantaine d'années afin qu'un test correspondant à une telle définition s'impose pour mesurer in vitro l'effet léthal causé par les radiations. En effet, Puck et Marcus proposèrent les premiers le test des colonies mesurant la survie clonogénique. Ce test devint le *standard* pour

mesurer la radiosensibilité in vitro [14]. Ce test consiste à ensemercer un nombre connu de cellules, à les irradier à une dose donnée et à en quantifier les clones ou colonies qui résulteraient des divisions cellulaires après irradiation [14]. Grâce à cette technique, la relation dose-effet fut décrite dans de très nombreuses conditions suivant la nature des cellules, le type de rayonnement ou les protocoles d'irradiation [1,14].

2.3. La radiosensibilité et ses pièges

La définition de la radiosensibilité évoquée plus haut ne doit pas faire oublier son champ de validité : la biologie cellulaire. Ainsi, rappelons que même morte « radiobiologiquement », une cellule peut continuer à métaboliser et notamment à réparer son ADN (notion de biologie moléculaire). Ainsi, alors qu'après des centaines de Gy la cellule ne prolifère plus, son noyau reste encore le lieu d'une réparation qui obéit aux règles de la biochimie [6]. Une autre vue biaisée de la radiosensibilité fut causée par la popularité de la loi introduite par Tribondeau et Bergonié en 1906 sur la radiosensibilité et son lien avec le pouvoir karyocinétique des cellules. En effet, ces deux pionniers montrèrent que « *les rayons X agissent avec d'autant plus d'intensité sur les cellules que l'activité reproductrice de ces cellules est plus grande, que leur devenir karyocinétique est plus long, que leur morphologie et leurs fonctions sont moins définitivement fixées* » [15]. Cette loi véhicula l'idée (fausse) que les tissus les plus aptes à proliférer, notamment ceux montrant une absence d'arrêt du cycle, sont systématiquement plus radiosensibles. C'était la base idéale pour justifier une radiothérapie. Toutefois, des fibroblastes quiescents montrant des réponses très différentes aux radiations suivant leur statut

génétiq ue ou des tumeurs très radiorésistantes en sont des contre-exemples.

2.4. La radiosensibilité quantifiée

Une fois la radiosensibilité définie, les radiobiologistes se mobilisèrent pour mieux décrire, quantifier et comprendre ses bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité (Fig. 1). En 1981, une corrélation entre la réponse clinique (contrôle local) et la radiosensibilité (évaluée *in vitro* par les tests de survie clonogénique) fut établie par Fertil et Malaise, non seulement pour les cellules tumorales, mais aussi pour les tissus sains [1]. D'autre part, le continuum des réponses clonogéniques observé entre les lignées les plus radiorésistantes et les plus radiosensibles fut confirmé [1,16]. En plus de cette corrélation, Fertil et Malaise confirmèrent à partir d'une centaine de lignées cellulaires le bien-fondé de la notion de radiosensibilité intrinsèque illustrée notamment par le fait que les courbes de survie clonogénique se croisent très rarement (Fig. 2). La valeur de la fraction survivante à 2 Gy apparut rapidement comme le paramètre de survie le plus pratique car le fractionnement de la dose en sessions de 2 Gy était déjà et reste encore le traitement

radiothérapeutique le plus courant [17]. La surface sous la courbe de survie (\bar{D}), représentant la dose correspondant à 37 % de survie fut également utilisée en tant que paramètre de survie [17] (Fig. 2). En parallèle, de nombreuses études biostatistiques furent consacrées à la description mathématique de la relation dose-effet. De nombreux modèles furent proposés alliant un bon ajustement des courbes de survie avec des théories biophysiques, biomoléculaires ou cellulaires. L'un des enjeux majeurs de ces efforts était de comprendre si, à travers l'analyse de la pente initiale de la courbe de survie, un seuil pouvait exister à des doses faibles. Malgré la popularité du modèle (n, D_0) qui proposait une pente initiale nulle, le modèle linéaire-quadratique (α, β) s'imposa pour la fidélité de ces ajustements avec toutes les courbes de survie. Malheureusement, ce modèle est empirique et la signification biologique de ces paramètres restent encore à démontrer [18] (Fig. 2).

Progressivement, les tests clonogéniques apparurent pour certains groupes de recherche comme des protocoles trop lourds et trop longs : l'usage des tests clonogéniques, qui nécessitaient efforts et patience liés à la culture de tissus, se réduisit rapidement au profit de recherches sur les bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité

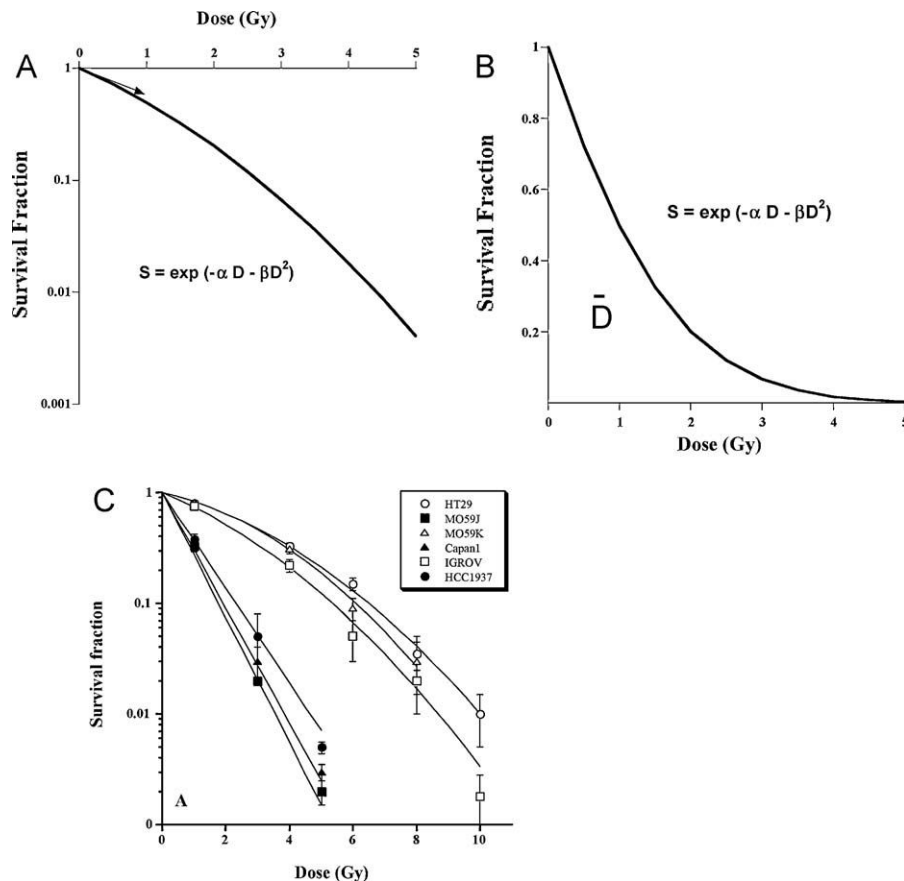


Fig. 2. Illustration schématique de la relation dose-effet décrite par les courbes de survie clonogénique issues des tests clonogéniques [14]. A. L'ajustement des courbes de survie est mieux assuré par le modèle linéaire-quadratique que par tout autre modèle biostatistique. B. La radiosensibilité qui est reflétée par la courbe de survie peut être quantifiée par la donnée de la SF2 ou par la dose d'inactivation moyenne (ou \bar{D}) qui correspond à la surface sous la courbe de survie en échelle linéaire ou à la dose correspondant à une survie de 1/e (environ 37 %). C. L'analyse de plusieurs courbes de survie montre qu'elles se croisent très rarement, suggérant graphiquement la notion de radiosensibilité intrinsèque (tiré de [69]).

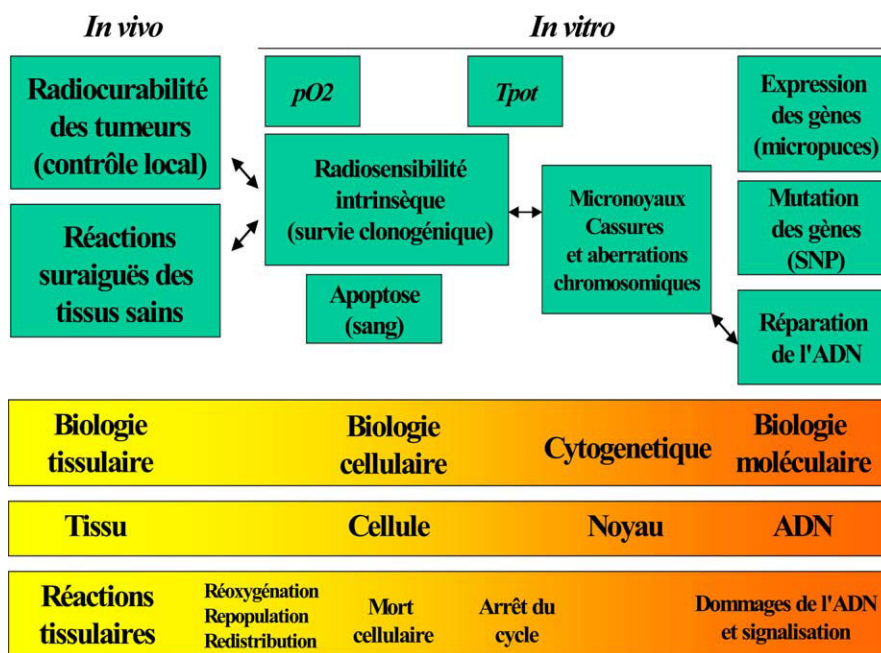


Fig. 3. Synopsis des différentes échelles et démarches qui ont donné les tests prédictifs de la radiosensibilité. Les développements ont suivi le progrès technologique et les connaissances fondamentales en rendant possibles des investigations aux niveaux moléculaires (ADN). Toutefois, le lien entre les différents paramètres sur lesquels se base chaque test prédictif n'est pas forcément corrélatif ni linéairement lié avec la dose de radiation.

dans l'espoir d'un test idéal, c'est-à-dire fiable, plus rapide et plus facile à mettre en place. Dans ce but, de nombreux événements moléculaires (lésions de l'ADN, réparation et signalisation), cellulaires (effets du cycle et différents types de morts) et tissulaires (réoxygénation, repopulation, etc.) furent explorés. Alors que les tests clonogéniques étaient basés sur le même protocole expérimental que les lignées soient tumorales ou non, on vit apparaître deux approches pourtant complémentaires mais qui se distinguèrent au gré des besoins et des contraintes technologiques :

- la prédiction de la radiosensibilité des tissus sains qui concentra des approches plus moléculaires dans l'identification du rôle biologique des protéines de réparation de l'ADN ;
- la prédiction de la radiosensibilité des tumeurs qui mobilisa plutôt les efforts sur l'importance de la réoxygénation et de la prolifération cellulaire. C'est l'objet du chapitre suivant (Fig. 3).

3. Les premiers essais prédictifs sur les tumeurs

3.1. Tests basés sur la mesure de la prolifération cellulaire : *Tpot*

Comme le contrôle local de la tumeur était considéré comme le paramètre reflétant le mieux la radiocurabilité in vivo, il était logique d'analyser son équivalent in vitro, c'est-à-dire tous les indices de prolifération cellulaire qui pouvaient expliquer l'augmentation du volume tumoral. Ce fut le cas du temps de doublement potentiel (*Tpot*). En règle générale, le *Tpot* fut mesuré à partir de biopsies

tumorales à travers la définition suivante : $Tpot = Ts/LI$ où *Ts* est la durée de la phase de synthèse de l'ADN et *LI* désigne l'index de marquage (*label index* ou *LI*) c'est-à-dire la proportion de cellules synthétisant leur ADN. Une quantité considérable de données a été accumulée sur le *Tpot* pendant une vingtaine d'années et on estime à environ 2000 patients dans le monde le nombre de cas soumis à ce test [19–21]. Toutefois, le *Tpot* ne peut être considéré aujourd'hui comme un indicateur pronostique tant il existe de limites dans les applications de ce test. En particulier, le nombre de patients où la tumeur fut bien caractérisée était trop faible. De plus, comme ces tests nécessitaient une biopsie et un établissement de lignée in vitro, l'hétérogénéité intrinsèque de la tumeur pouvait conduire à fausser les données, voire à favoriser les sous-populations cellulaires les plus proliférantes. Enfin, la corrélation qui pouvait exister entre les rythmes de croissance observés in vitro en conditions (favorables) de culture et son rythme d'évolution in vivo était loin d'être vérifiée [19].

3.2. Tests basés sur la mesure de l'hypoxie : *pO2*

Entre 1950 et 1970, l'impact de l'oxygène dans la réponse aux radiations, d'abord symbolisé par les travaux de Gray, a influencé un certain nombre de projets de recherche en radiobiologie. En particulier, l'hypothèse que la pression partielle d'oxygène (*pO2*) inférieure à 10 mm de mercure peut générer une situation favorisant la radio-résistance a été à la base de la mesure systématique de la pression en oxygène dans des biopsies de tumeurs [22]. Toutefois, la nécessité de faire appel à des technologies avancées pour mesurer un tel paramètre a limité

considérablement les études. Même si certaines entreprises comme Eppendorf ont développé des techniques basées sur la polarographie, les radiobiologistes et les radiothérapeutes ont de nouveau été confrontés à l'hétérogénéité des tumeurs et à certains phénomènes antagonistes d'intermittence hypoxie-réoxygénation qui rendaient difficile l'obtention de données fiables. De plus, l'utilisation de plus en plus fréquente du fractionnement de la dose dans les modalités radiothérapeutiques favorise la réoxygénation, limite les zones hypoxiques et donc l'application d'un tel test [22]. Notons enfin que le taux d'oxygénation dans les cultures cellulaires in vitro de routine (5 % de CO₂) reste très éloigné de l'hypoxie relative (10 à 20 % de CO₂) qui règne dans nos tissus.

4. Les différentes morts cellulaires

4.1. Quelles morts pour la mort radiobiologique ?

La mort radio-induite, telle qu'elle a été définie plus haut (perte définitive de la capacité de division) constitue l'une des fonctions biologiques essentielles. Il était donc naturel de baser des tests prédictifs de la radiosensibilité sur les mécanismes moléculaires directement liés à la fonction de mort cellulaire. Cependant, la mort radio-induite est le résultat final de diverses contributions pouvant prendre des aspects très différents ; à chaque type de mort correspond un ou plusieurs tests moléculaires spécifiques. Lequel choisir ? Bien que la littérature scientifique soit très riche en termes décrivant les différentes étapes des voies de mort cellulaire, retenons-en seulement trois dont l'impact dans la perte de prolifération, la description anatomopathologique et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont bien connus : la mort mitotique, la sénescence et l'apoptose (Fig. 3 et 4).

La mort mitotique est la voie de mort radio-induite la plus importante pour tous les tissus à l'exception des lymphocytes. Dans les années 1930, ce fait apparaissait comme acquis [9]. La mort mitotique se caractérise par la formation de micronoyaux, contenant des fragments chromosomiques irréparables directement issus de cassures de l'ADN qui se propagent tout au long du cycle cellulaire jusqu'en mitose. La formation des micronoyaux suit plusieurs étapes dont l'exonucléose qui décrit la sortie du micronoyau du noyau cellulaire principal et l'exocytose qui décrit la sortie du micronoyau de la cellule. Entre l'exonucléose et l'exocytose peuvent s'écouler plusieurs dizaines d'heures suivant l'état de prolifération des cellules (Fig. 4). Le taux de micronoyaux radio-induits a été quantitativement corrélé à la radiosensibilité depuis les années 1960 grâce à un protocole simple et robuste consistant à bloquer le processus d'exonucléose par des drogues comme la cytochalasine B [23]. Cependant, les tests de micronoyaux ont paru pour certains groupes de recherche comme des protocoles expérimentaux aussi longs et lourds que la méthode des colonies : le test des micronoyaux reste encore peu appliqué systématiquement alors que la littérature suggère dans son ensemble qu'il constituait le premier test cytogénétique prédictif de la radiosensibilité [23].

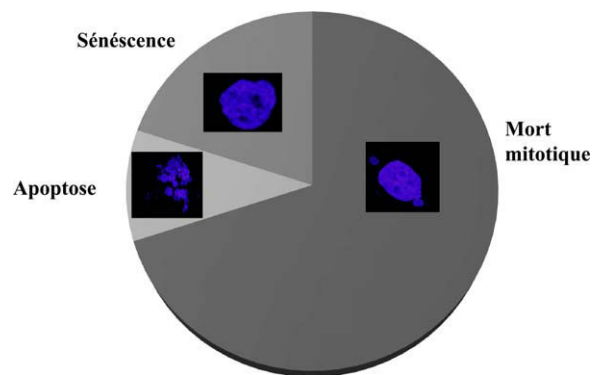


Fig. 4. Les trois principales morts radio-induites définies fonctionnellement. L'importance relative de la mort mitotique, de la sénescence et de l'apoptose représentée ici est celle que l'on rencontre habituellement pour les fibroblastes humains non-transformés. Les différentes proportions peuvent changer drastiquement suivant la nature du tissu, de l'irradiation et du statut génétique. Les photos désignent respectivement des exemples de noyaux et micronoyaux et de corps apoptotiques colorés au 4',6' diamidino-2-phényl-indole (DAPI) et observés en immunofluorescence.

Bien que l'impact de la mort mitotique sur l'effet létal des radiations ionisantes soit majeur pour des cellules qui peuvent se multiplier, la sénescence (c'est-à-dire l'arrêt irréversible des cellules en phase G1) est très souvent rencontrée dans les tissus irradiés en phase de quiescence. D'ailleurs, la part relative de la mort mitotique et de la sénescence dans la mort clonogénique dépend du niveau de dose de radiation qui interdira ou non toute prolifération après l'irradiation (Fig. 4). Par exemple, pour les fibroblastes de peau, la mort mitotique est prépondérante en-deçà de 4 Gy alors que la sénescence s'observe pour des doses supérieures. Bien que l'expression de p21 est généralement liée à la sénescence, le test idéal permettant de mesurer le taux de sénescence reste à développer. D'ailleurs, il n'y a toujours pas de corrélation quantitative publiée entre la sénescence et la radiosensibilité [24]. Il est à noter ici que les tests d'exclusion de colorants (*exclusion dye assays*) comme le diméthylthiazole diphenyltetrazolium bromide (MTT), rapides et très commercialisés, sont souvent substitués aux tests clonogéniques alors qu'ils ne tiennent pas compte des cellules arrêtées irréversiblement dans le cycle. En effet, le colorant d'exclusion peut rentrer dans la cellule sénescence et être métabolisé alors que celle-ci est condamnée : la mort cellulaire radio-induite globale mesurée par ces tests est donc sous-estimée.

L'apoptose est une voie de mort cellulaire très spectaculaire et facilement détectable par microscopie (Fig. 4). Ce terme est devenu si populaire que certains auteurs considèrent l'apoptose comme un synonyme de mort radio-induite et de radiosensibilité. Toutefois, il faut rappeler qu'il n'existe toujours pas de corrélation quantitative entre la radiosensibilité (survie clonogénique) et l'apoptose, pour les tissus sains comme pour les tumeurs [6,25,26]. En guise d'exemple représentatif, rappelons que les fibroblastes de peau de patients atteints de l'ataxie télangiectasique, le syndrome associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme, ne montrent pas d'apoptose [6]. En outre, les corps apoptotiques, issus du

hâchage de l'ADN par des nucléases sont encore trop souvent confondus avec les micronoyaux de la mort mitotique (Fig. 4). Cette erreur d'interprétation est amplifiée par le développement de tests cytométriques basés sur la détection de fragments d'ADN. En effet, comme les micronoyaux sont des fragments d'ADN non réparés, de nombreux faux-positifs peuvent signaler la présence de corps apoptotiques alors que ce sont en fait de simples micronoyaux [6].

À partir de 63 volontaires sains, Schmitz et al. ont constaté que, pour un même donneur, les taux d'apoptose radio-induite dans des lymphocytes T positifs pour les marqueurs CD4 et CD8 ne sont corrélés ni entre eux, ni avec ceux mesurés dans les lymphocytes B. En outre, le même groupe de recherche a montré que l'apoptose spontanée et radio-induite augmente significativement avec l'âge pour les lymphocytes T positifs pour CD8 mais non pour ceux positifs pour CD4 ni pour les lymphocytes B [27,28]. Enfin, l'apoptose radio-induite est plus prononcée chez les hommes pour les lymphocytes B et T positifs pour CD8 et chez les femmes pour les lymphocytes T positifs pour CD4 [27,28]. De tels résultats sont en désaccord avec les travaux de Ozsahin et al. qui concluent à une corrélation entre l'apoptose radio-induite des lymphocytes positifs pour CD4 et CD8 d'un même donneur, indépendamment de l'âge et du sexe [29,30]. Dans ce contexte particulier, un certain nombre d'auteurs ont tenté d'établir un lien entre l'apoptose et les réactions suraiguës post-traitement [31]. C'est notamment le cas des études sur l'apoptose radio-induite après 8 Gy mesurée sur des lymphocytes T positifs pour CD4 et CD8 issus de 399 patients irradiés. Aucune association n'a été trouvée entre l'apoptose spontanée et l'apoptose radio-induite. Les réactions tardives de grade 2 et de grade 3 ont été prédites par l'apoptose radio-induite avec les lymphocytes T positifs pour CD8 mieux qu'avec les lymphocytes T positifs pour CD4. Aucune prédiction des réactions précoces n'a pu être effectuée [29,30]. Conscients de la fiabilité des tests clonogéniques, des tests des micronoyaux et des avantages des autres tissus tels que les fibroblastes, Ozsahin et al. ont admis dans leur étude que c'est plutôt la rapidité d'obtention des résultats qui constitue le premier avantage de leur test d'apoptose radio-induite [29]. Du point de vue statistique, la prédiction de ces tests ne concerne pas toute la gamme de radiosensibilité mais une petite fenêtre de réactions tardives [29,30]. D'autre part, la sévérité des réactions de grade 2 ou 3 n'est pas corrélée quantitativement à l'apoptose radio-induite : en d'autres termes, ce ne sont pas les patients qui font les réactions les plus sévères qui montrent les taux d'apoptose les plus élevés [29]. Ces résultats suggèrent donc que l'apoptose pourrait prédire une certaine gamme de radiosensibilité uniquement associée à des réactions tardives et seulement limitée à certains niveaux de gravité : l'apoptose radio-induite des lymphocytes ne peut donc servir de test prédictif universel. À l'évidence, de nouvelles investigations sont nécessaires pour mieux évaluer la contribution de l'âge, du traitement et de localisation tumorale pour affiner la zone de confiance statistique de la mesure de l'apoptose radio-induite dans la prédiction des réactions suraiguës post-traitement.

5. Les paramètres moléculaires : expression de gènes, mutations ou fonctions ?

5.1. Quel paramètre moléculaire prédictif faut-il choisir ?

Comme évoqué plus haut, parallèlement à l'approche cellulaire sur la radiosensibilité des tumeurs, une approche plus moléculaire se concentra sur la réponse des tissus sains. Toutefois, vu la difficulté de rassembler un grand nombre de lignées cellulaires provenant de patients souffrant de réactions diverses après radiothérapie, les radiobiologistes se focalisèrent sur la réponse aux radiations des lymphocytes et des fibroblastes de peau provenant de maladies génétiques associées à une radiosensibilité. Ce fut notamment le cas de l'ataxie télangiectasique (mutations d'ATM), le syndrome de Nimègue (mutations de NBS1), du syndrome ATLD (*ataxia telangiectasia-like disorder*) (mutations de MRE11), de l'anémie de Fanconi (mutations des gènes FANC), du syndrome de Bloom (mutations de BLM), de xeroderma pigmentosum (mutations des gènes XP), du syndrome de Cockayne (mutations des gènes CS), des mutations de la ligase I (agammaglobulinémie) et de la ligase IV (LIG4) [11]. Notons cependant que la fréquence de ces syndromes est de l'ordre de 1/100 000. De telles fréquences ne peuvent donc pas expliquer la totalité des réactions suraiguës d'autant plus que les symptômes qui leur sont associés sont généralement détectables dès les premières années de la vie et non représentatifs des cas observés dans les services de radiothérapie. Ainsi, il faut considérer ces recherches simplement comme les premières investigations des réponses les plus anormales aux radiations : comme on l'a dit plus haut, les approches monogéniques favorisèrent surtout l'étude des gènes dont les mutations causaient les plus fortes radiosensibilités. Parallèlement, des questions d'importance se posèrent sur l'approche à adopter pour mieux prédire la radiosensibilité. Doit-on mesurer l'expression radio-induite des gènes ? Doit-on examiner la nature des mutations des gènes ? Doit-on quantifier une dysfonction moléculaire et cellulaire ? La récente révolution de la génomique a fourni un nombre considérable de données pour répondre à cette question importante. Toutefois, l'évidence de la spécificité des réponses pour chaque organe et individu et le continuum des réponses aux radiations imposent d'étudier :

- une gamme de réponses aux radiations aussi large que possible afin de définir des paramètres moléculaires ou cellulaires fiables permettant de prédire une situation quelconque pour une dose donnée ;
- des modèles humains ou humains-compatibles afin d'éviter les biais qui, en raison des différences entre espèces et de la gamme de dose étudiée, peuvent modifier les interprétations des phénomènes observés ;
- des conditions d'irradiation (dose, fractionnement, etc.) et des modèles de tumeurs ou de tissus sains qui soient cohérents avec la réalité clinique sans faire l'impasse sur des relations dose-effet qui ne sont généralement pas linéaires.

Pour la suite du paragraphe, gardons à l'esprit ces trois conditions pour obtenir une corrélation quantifiée entre la

radiosensibilité cellulaire (survie clonogénique) et le paramètre moléculaire à choisir.

5.2. Expression de gène et radiosensibilité

Si l'expression radio-induite d'un gène pouvait prédire tous les niveaux de réponses cellulaires et tissulaires aux radiations, cela impliquerait que l'expression de ce gène varie avec la dose de radiation en corrélation avec la survie clonogénique. Toutefois, les protéines impliquées dans les événements radio-induits précoces (formation des dommages de l'ADN, reconnaissance, signalisation et réparation) sont très abondantes et aucune variation de leur expression en fonction de la dose n'a encore été mise en évidence. En revanche, certains acteurs protéiques impliqués dans les événements radio-induits plus tardifs (plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures après irradiation) montrent souvent (mais pas systématiquement) une sur- ou une sous-expression radio-induite. C'est le cas notamment des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et certaines voies de mort cellulaire comme la protéine p21 (désormais appelée CDKN1A) [7]. Une étude récente utilisant la technique de la Q-PCR quantitative (*quantitative polymerase chain reaction*) et concernant des cultures de lymphocytes T établis à partir de 22 patientes atteintes d'un cancer du sein a montré que le niveau d'expression de CDKN1A prédit correctement la survie clonogénique après 2 Gy [32]. À l'inverse, en utilisant la technologie des micropuces, Svensson et al. ont constaté que sur les lymphocytes de 38 patients souffrant de carcinome de la prostate (dont 21 avec des complications graves et 17 sans symptôme apparent), aucune sur- ou sous-expression radio-induite sur les milliers de gènes testés ne pouvait prédire les réactions suraiguës post-irradiation [33]. Comme on le voit, la variété des techniques utilisées ne facilitent pas l'interprétation sur le pouvoir potentiellement prédictif de l'expression des gènes. Il faut donc considérer pour l'instant ces tests comme des outils ponctuels, utiles pour la détermination d'une réponse éventuellement anormale aux radiations dans des conditions très spécifiques mais sans donner forcément une mesure quantitative de l'ampleur de la réaction. Notons enfin que, comme la plupart de ces tests d'expression de gènes sont effectués sur des lymphocytes, des investigations sont nécessaires pour vérifier la validité de ces tests sur d'autres tissus plus directement concernés par les réactions suraiguës post-irradiation.

Notons également quelques pièges concernant l'expression des gènes. Par exemple, certaines mutations de la célèbre protéine p53, causent souvent une surexpression du gène qui évolue avec la dose et qui est généralement associée à une forte radiorésistance [34]. D'autre part, les nouvelles technologies basées sur les ARN interférents (*short interference RNA* ou siRNA) permettent aujourd'hui de diminuer l'expression de gènes afin de mieux comprendre leur rôle biologique. Cependant, rappelons que la diminution drastique voire l'extinction *in vitro* totale de certains gènes n'existe pas à l'état naturel. Ainsi, une expression de gène réduite par génie génétique mais qui n'est jamais éteinte en réalité peut conduire le chercheur à

conclure sur des effets qui n'ont pas de sens physiologique. C'est notamment le cas pour de nombreux gènes dont les mutations homozygotes ne sont pas viables chez l'homme. Un exemple particulier est le gène *BRCA1*, dont les mutations hétérozygotes sont impliquées dans les cancers familiaux du sein alors que les mutations homozygotes conduisent à la létalité cellulaire : le gène est toujours exprimé chez l'homme alors que les siRNA de *BRCA1* sont largement utilisés dans la littérature pour simuler les conséquences biologiques de ses mutations [34–36]. On pourra d'ailleurs citer dans le même cas la neurofibromatose [37].

5.3. Mutation de gène et radiosensibilité

Vu la diversité des réponses aux radiations, un seul gène endommagé ne permet pas d'expliquer tous les gradients de réactions tissulaires radio-induites. Au contraire, de nombreuses revues ont mis en évidence l'implication d'un très grand nombre d'acteurs protéiques dans la réponse aux radiations, agissant à différents étapes des processus moléculaires et cellulaires [10,38–40]. Il est souvent vérifié que pour un même gène, les mutations peuvent conduire à des phénotypes très différents : par exemple, des mutations ponctuelles de la protéine ATM confèrent une radiosensibilité modérée et une espérance de vie plus longue si elles ne concernent pas le domaine kinase de la protéine [6,41,42]. La séquence intégrale du génome suffit-elle pour autant à prédire toute la radiosensibilité humaine ? Là encore, la nature multigénique de la réponse aux radiations et l'influence probable de facteurs épigénétiques rendent insuffisante la seule connaissance du génome d'une cellule pour prédire son comportement sous irradiation. Un exemple concret a été fourni par un article récent sur la radiosensibilité de fibroblastes de peau provenant d'un patient atteint de xeroderma pigmentosum C, syndrome associé à une radiosensibilité modérée : la complémentation par l'ajout du gène sauvage *XPC* n'a réduit que partiellement la radiosensibilité des cellules, suggérant ainsi que le syndrome n'était pas causé uniquement par les effets dus à la mutation du seul gène *XPC* [43]. Une approche consistant à prédire la radiosensibilité à partir de la recherche de mutations doit donc inclure une connaissance complète de la relation génotype-phénotype. Ce n'est pas encore le cas pour la plupart des gènes concernés par une forte radiosensibilité.

La génomique et la protéomique ont facilité et popularisé la recherche de certains polymorphismes de gènes impliqués dans la réponse aux radiations : c'est le cas des polymorphismes concernant un simple nucléotide (*single nucleotide polymorphism*, ou SNP) [31]. Les polymorphismes désignent des variations de paires de bases du génome qui n'entraînent pas des changements conformationnels mesurables. En particulier, les SNP représentent 90 % des cas de polymorphismes et se retrouvent dans notre génome toutes les 300 paires de bases : un individu est donc porteur de plusieurs centaines de milliers de SNP où généralement une cytosine se substitue à une thymine. Les progrès de la génomique ont permis l'identification d'un nombre considérable de SNP. Toutefois, le lien entre polymorphismes et syndromes n'est cependant pas

évident puisque la substitution d'une base par une autre ne suffit généralement pas (par définition) à modifier significativement le tableau clinique. Certains SNP des gènes *ATM*, *XRCC1*, *XRCC3*, *SOD2*, *RAD21*, *TGF- β 1* et *PARP-1* ont été mis en évidence et ont été associés à une réponse anormale aux radiations [7,31,44–46]. Cependant, là encore, parce que les porteurs d'un même SNP peuvent montrer des réactions suraiguës de grades différents, un seul SNP ne peut expliquer tous les gradients de réponses aux radiations et donc ne peut être corrélé à la radiosensibilité. Notons enfin que, face à la non-significativité des corrélations entre un seul SNP et les manifestations d'une radiosensibilité, certains auteurs regroupent plusieurs SNP ensemble d'une part et plusieurs gradients de sévérité de réactions d'autre part : la nature de la corrélation (souvent significative) s'en trouve évidemment biaisée [47]. La détermination de SNP pourrait cependant être utile pour la prédiction de prédispositions à certains cancers et à des réponses bien particulières sur des localisations tumorales spécifiques [44–46]. C'est justement le cas des SNP de la *PARP-1* qui pourraient être associés à certains cancers de la prostate, de l'œsophage et du poumon [7,31].

On voit donc ici que la mesure de l'expression des gènes comme la détermination de mutations sont utiles pour mieux rendre compte de risques spécifiques à certaines affections et réactions mais ne peuvent constituer des paramètres qui évolueraient en corrélation quantitative avec la dose et la survie clonogénique afin de prédire toute la radiosensibilité humaine dans n'importe quelle condition d'irradiation.

5.4. Le sang en question

À ce stade de la revue, nous devons insister sur le fait que la majorité des expériences sur l'expression ou la mutation des gènes ont été effectuées sur des lymphocytes (sang frais ou cellules transformées). Pourtant, les réactions suraiguës post-irradiation concernent plus particulièrement les tissus conjonctifs, l'épithélium ou l'endothélium. Ainsi, même si le choix des lymphocytes reste principalement basé sur des considérations pratiques de rapidité, de disponibilité et d'acquisition simplifiée (pour le praticien, un prélèvement sanguin est facile à mettre en place), il suggère néanmoins plusieurs remarques importantes :

- l'existence de corrélation entre les effets *in vitro* mesurés sur le sang et la prédiction de réactions cliniques survenant sur d'autres tissus bien différents reste encore à vérifier ;
- l'apoptose, plus fréquente dans les cellules sanguines que dans les autres tissus pourrait constituer un biais technique dans la mise au point des tests prédictifs de la radiosensibilité ;
- la taille des noyaux de lymphocytes est environ 1,5 fois plus petite que celles des noyaux cellulaires des autres tissus, suggérant l'organisation d'une chromatine plus condensée qui pourrait également constituer un biais technique dans la prédiction de la radiosensibilité ;

- la manipulation des lymphocytes est délicate (faible espérance de vie en culture *in vitro*) et peut nécessiter alors une transformation par le virus d'Epstein-Barr (EBV) qui modifie la radiosensibilité (les lymphocytes transformés ou lymphoblastes sont généralement plus radio-résistants que leurs homologues non-transformés) [48,49].

En 1990, Kushiro et al. n'ont pas trouvé de corrélation entre la radiosensibilité de fibroblastes et de lymphocytes issus d'un même donneur [50]. En 1991, à partir de fibroblastes et de lymphocytes irradiés en phase G0/G1, Green et al. ont montré sur 34 donneurs que les fibroblastes discriminaient les patients en fonction de leur radiosensibilité alors que les lymphocytes ne le permettaient pas [51]. Enfin, en 1992, à partir de 30 fibroblastes et 29 lymphocytes, Geara et al. concluent également qu'il n'y avait pas de corrélation entre la survie clonogénique des fibroblastes et celle des lymphocytes provenant d'un même donneur [52]. Ainsi, malgré l'incontestable rapidité de tests prédictifs basés sur les lymphocytes, une analyse générale de la littérature incite à la plus grande prudence quant à la portée des résultats obtenus avec ce type de cellules. De nouvelles approches systématiques viendront sans doute à bout de ces limitations.

6. La fonction de réparation

Parmi toutes les fonctions cellulaires, la mort cellulaire est par définition la plus proche de l'effet létal des radiations ionisantes. Toutefois, nous avons vu qu'il existe plusieurs types de morts cellulaires et que chacune est quantifiable par des techniques différentes, ce qui rend difficile la mesure de la mort radiobiologique *globale*. En amont de la mort cellulaire se trouvent les mécanismes d'arrêt du cycle et de contrôle de la prolifération. Toutefois, sur des cellules qui seraient déjà quiescentes, les arrêts du cycle influenceront peu la réponse aux radiations. Enfin, en amont des fonctions de mort et de prolifération cellulaire se trouve la notion de gestion des dommages de l'ADN ou des chromosomes et de leur signalisation. C'est l'objet de ce chapitre.

6.1. Cytogénétique : entre cassures et aberrations chromosomiques

La cytogénétique est née d'observations microscopiques anciennes et de la mise au point de techniques de colorations des chromosomes, notamment avec le colorant Giemsa [53] (Fig. 5). Ainsi, les cassures mais aussi les aberrations chromosomiques devinrent détectables donc mesurables. Concernant les cassures chromosomiques, leur induction apparut rapidement proportionnelle à la dose ainsi que celle des micronoyaux dont elles sont la cause [54]. Toutefois, un facteur limitant l'intérêt de ces tests cytogénétiques est la période de temps (quelques heures) nécessaire pour obtenir des métaphases, indispensables à la visualisation de chromosomes. En effet, au cours de cette période de temps, certains phénomènes de réparation peuvent se produire et biaiser le résultat final. C'est d'ailleurs encore plus le cas pour la dosimétrie

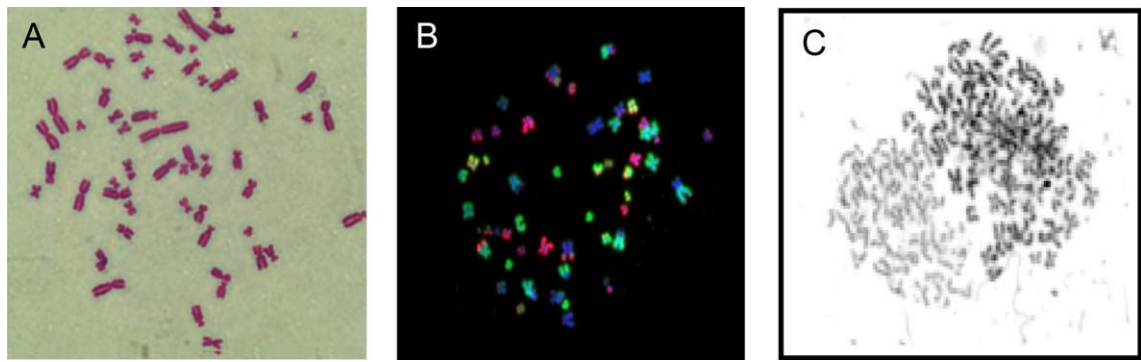


Fig. 5. Illustration de l'évolution technologique de la cytogénétique. A. Chromosomes colorés par Giemsa où les différentes zones condensées apparaissent plus foncées. B. Chromosomes colorés par la technique du FISH où les télomères sont marqués en jaune. C. Fusion par condensation prématurée des chromosomes (PCC) où l'on voit à droite, une mitose de tumeur synchronisée et à gauche, les chromatides d'un fibroblaste humain condensés par les facteurs mitotiques (données du laboratoire).

biologique des irradiations accidentelles où cette période s'ajoute aux incertitudes sur les paramètres de l'exposition exacte aux radiations pendant l'accident. Afin d'éviter ce biais, la technique de condensation prématurée des chromosomes (PCC ou *premature chromosome condensation*) a été mise au point. La PCC consiste à faire apparaître plus rapidement les fragments chromosomiques en fusionnant la cellule testée avec une cellule en mitose. L'hétérodictyone ainsi formé permet l'échange des facteurs mitotiques à la cellule en G0/G1 et produit alors une condensation prématurée de la chromatine. La PCC a permis d'établir une corrélation entre cassures chromosomiques non réparées et radiosensibilité [11,55]. C'est grâce à cette technique que Cornforth et Bedford (1987) démontrèrent avec une lignée fibroblastique humaine qu'une cassure chromosomique non réparée par cellule suffit à entraîner un événement létal [56] (Fig. 5).

Concernant les aberrations chromosomiques, elles sont soit stables (translocations), soit instables (chromosomes dicentriques, acentriques, anneaux) [57,58]. L'incidence des dicentriques et des fragments acentriques est généralement proportionnelle à la dose. Par contre, l'incidence des translocations suit souvent une loi linéaire-quadratique. Cette dernière observation a pu être considérée comme un argument de corrélation avec les courbes de survie clonogénique qui obéissent au modèle linéaire-quadratique (α , β). Toutefois, les paramètres d'ajustement ne sont pas comparables quantitativement et des lignées radiosensibles qui montrent pourtant des aberrations chromosomiques comme les lignées mutées pour le gène *ATM* ont des courbes de survie mono-exponentielles [42].

En 1986, une avancée technologique s'est produite avec le développement de sondes spécifiques de chromosomes entiers ou de structures chromosomiques (centromères, télomères) [59]. Cette technique couramment appelée FISH (*fluorescence in situ hybridization*) a permis de dénombrer avec précision la plupart des types d'aberrations [60]. La méthode du FISH associée ou non à la PCC a permis d'établir une corrélation entre les cassures chromosomiques et la radiosensibilité. Toutefois, la lourdeur de ces techniques l'a emporté sur sa fiabilité à refléter la réponse aux radiations [60,61] (Fig. 5).

Enfin, plus récemment, une autre technique, l'hybridation génomique comparative (*comparative genomic hybridization* ou CGH) a été développée sur la base des progrès de la génomique de masse et permet aujourd'hui de dresser rapidement la carte cytogénétique de n'importe quelle tumeur [62,63]. Cependant, la CGH fournit la liste des séquences répétées qui peuvent éventuellement refléter l'instabilité génomique et l'association à certains cancers mais ne peut révéler des aberrations stables comme des translocations ou des inversions. D'autre part, la CGH ne peut être une mesure d'effet radio-induit de haute précision puisque les dommages de l'ADN sont généralement distribués au hasard sur tout le génome et de façon stochastique dans chaque cellule. Ainsi, les CGH ne peuvent refléter une relation dose-effet indispensable à la prédiction de l'effet létal radio-induit ni donc se substituer à des tests fonctionnels.

Les techniques cytogénétiques comme le FISH ou la coloration Giemsa fournissent actuellement l'une des bases prédictives de la radiosensibilité les plus fiables. D'ailleurs, encore aujourd'hui, la dosimétrie biologique reste basée sur des mesures cytogénétiques de dicentriques, de translocations voire de marqueurs télomériques [64]. À ce titre, signalons que les tests cytogénétiques développés par l'IRSN sont les seuls tests de dosimétrie biologique accrédités en France [65]. Toutefois, ces tests ont pour but d'estimer la dose biologique de radiations qu'un individu a pu subir lors d'un accident et non de caractériser la susceptibilité individuelle car les mêmes taux de cassures et/ou d'aberrations chromosomiques peuvent être produits par des dysfonctionnements moléculaires et des causes génétiques très différents [66,67].

6.2. Réparation par suture et réparation par recombinaison homologue : quoi d'autre ?

Comme les dommages chromosomiques sont générés par des lésions de l'ADN, il semblait donc logique d'étudier, après la cytogénétique, les mécanismes de réparation de l'ADN et leur lien éventuel avec la radiosensibilité (Fig. 1 et 2) [10,42,68–70]. Cependant, quel dommage radio-induit de l'ADN choisir pour mieux prédire la radiosensibilité ? Dans une revue précédente, nous avons exposé tous les

arguments en faveur des cassures double-brin de l'ADN (CDB) plutôt que des cassures simple-brin (CSB) ou des dommages de bases [6,71]. Nous n'y reviendrons pas mais rappelons un fait : aucune corrélation n'existe dans la littérature entre la radiosensibilité et les défauts de réparation des dommages de bases ou de CSB. En particulier, l'ataxie telangiectasique, le syndrome humain associé à la plus forte radiosensibilité connue, causé par les mutations du gène *ATM*, n'est pas associé à des défauts de réparation des dommages de bases ni de CSB mais plutôt à des défauts de réparation des CDB [6].

La réparation des CDB chez les mammifères a longtemps été décrite comme *duale* avec deux voies majeures : la recombinaison homologue (*homologous recombination*, ou HR) [39] et la suture non-homologue (*non-homologous end-joining*, ou NHEJ) [38]. Toutefois, comme la voie HR est seulement active en phase S-G2/M et la voie NHEJ est seulement active en G0/G1, le paradigme « NHEJ ou bien HR » ne peut expliquer la radiosensibilité de cellules quiescentes (en G0/G1) qui seraient normales pour la suture NHEJ [6,11]. D'autre part, les voies HR et NHEJ étant des voies essentiellement fidèles, comment expliquer l'instabilité génomique issue d'une mauvaise réparation ? L'existence d'une voie alternative de réparation devrait donc à la fois expliquer certaines radiosensibilités en G0/G1 et certaines prédispositions au cancer [6,11].

En plus de ces interrogations, les modèles actuels de réparation des CDB issus des données sur les rongeurs et les microorganismes, impliquent une vingtaine d'acteurs majeurs dont les mutations ne correspondent à aucun syndrome connu chez l'homme. En effet, les protéines Ku, DNA-PKcs, RAD51, RAD52 sont indispensables à la vie cellulaire (mitose, méiose, etc.) et leur absence n'est pas viable chez l'homme [6]. À l'inverse, les levures ou les cellules de rongeurs porteurs de mutations de Ku, DNA-PKcs, RAD51, RAD52 existent mais sont radiosensibles [40,72,73]. Ce paradoxe s'explique notamment par le fait que les gènes humains se distinguent souvent de leurs homologues des autres espèces par des différences importantes de séquences avec rarement les mêmes fonctions biologiques [74,75]. Par exemple, la protéine Rad51 humaine porte un domaine endonucléase III qui permet à cette protéine de couper l'ADN alors que le gène considéré comme homologue chez la bactérie, appelé RecA, possède une séquence deux fois moins longue et un domaine endonucléase est absent [74,75]. L'accumulation des connaissances sur les séquences des gènes s'est en effet effectuée à une vitesse bien plus grande que la détermination de leurs fonctions biologiques. Ainsi, l'usage des mêmes sigles des gènes est effectivement trompeur. En prenant l'exemple du gène *BRCA1*, associé aux cancers familiaux du sein et de l'ovaire, rappelons que la séquence du gène *Brca1* chez le rat n'a que 58 % d'identité de séquence avec son homologue humain *BRCA1* [76]. De plus, il faut souligner que les modèles de rongeurs mutés pour *Brca1* montrent très rarement des phénotypes associés à des cancers du sein mais quand ils en montrent, les mutations considérées sont issues du génie génétique avec des expressions de gène conditionnelles [77]. Ainsi, l'usage des noms-mêmes des gènes doit inspirer une grande

prudence en ce qui concerne l'extrapolation des modèles à d'autres espèces. Les gènes de réparation de l'ADN en sont des exemples représentatifs.

6.3. Nature de la corrélation entre radiosensibilité et réparation des CDB

Les CDB fragmentent l'ADN. Les premières techniques de mesure des CDB ont été basées sur la discrimination des fragments radio-induits d'ADN en fonction de leur taille. Cela a été notamment le cas de la sédimentation en gradients de sucrose, de l'éluion neutre et de l'électrophorèse en champs pulsés [71,78]. Un tel principe a l'avantage de mesurer la réparation des CDB indépendamment de toutes voies moléculaires de réparation quel que soit le temps post-irradiation. En revanche, ces techniques ne permettent pas d'évaluer la qualité de la réparation, c'est-à-dire son caractère fidèle ou bien fautif. Les CDB mais surtout les CSB radio-induites, plus nombreuses, provoquent dans certaines conditions une augmentation du noyau cellulaire due à la décondensation de la chromatine. La technique du halo consiste, à l'aide d'intercalants fluorescents, à quantifier une telle augmentation [79]. La technique de la comète combine l'électrophorèse et la technique du halo toutes deux appliquées individuellement à chaque cellule [80]. Les données issues de la technique de la comète sont généralement fournies sous la forme du produit de l'augmentation de la taille du noyau (tête de comète) par la distance de migration des fragments de l'ADN (queue de comète). Toutefois, comme la décondensation de la chromatine et la religation des brins d'ADN ne sont pas organisées par les mêmes voies protéiques [70,81], la technique de la comète ne fournit pas une mesure directe du rythme de réparation des CDB mais une estimation globale de la gestion des CSB et des CDB, ce qui pose souvent un problème d'interprétation des données.

Toutes les techniques détaillées ci-dessus nécessitent une préparation de l'ADN ou des cellules qui s'étalent sur un ou deux jours. Elles ont été progressivement abandonnées au profit de tests plus rapides. Pourtant, les données issues de ces techniques sont à l'origine des premières corrélations entre la réparation des CDB et la radiosensibilité. En compilant les résultats obtenus sur des lignées tumorales humaines avec toutes ces techniques, nous avons montré dans une revue publiée en 1997 que 13 sur 20 publications, (représentant 89 sur 101 lignées testées), montrèrent une corrélation significative entre la réparation des CDB et la radiosensibilité [71]. Concernant les cellules non tumorales et notamment les fibroblastes, la même tendance fut observée mais le nombre de lignées testées était très inférieure. De plus, la nature de la corrélation apparaissait plus complexe. En effet, malgré une radiosensibilité identique (même survie clonogénique), le taux de cassures non réparées est deux à quatre fois plus élevé dans des fibroblastes issus d'un patient muté dans la ligase IV que dans des cellules provenant de patients atteints d'ataxie telangiectasique (mutations d'*ATM*). Inversement, certains syndromes très différents comme le syndrome de Bloom et xeroderma pigmentosum respectivement causés par des mutations de gènes *BLM* et

XP, sont souvent associés à la même survie clonogénique après 2 Gy (SF2) [6,11].

6.4. Le test H2AX n'est pas suffisant pour expliquer toute la radiosensibilité humaine

Comme évoqué dans les chapitres ci-dessus, une grande majorité de radiobiologistes ont développé des études monogéniques qui ont l'avantage d'élucider le rôle biologique d'un seul gène dans la réponse aux radiations. Cependant, une telle approche ne peut fournir une vue globale et comparative du continuum des réactions post-irradiation. Récemment, la technique d'immunofluorescence basée sur des marqueurs d'histones H2AX phosphorylés (γ -H2AX) a permis une mesure précise du nombre de CDB au sein-même du noyau des cellules irradiées sous la forme de foci nucléaires. Il existe une relation linéaire entre le nombre de CDB et le nombre de foci γ -H2AX [82]. Malheureusement, malgré la précision et la rapidité (quelques heures de traitement) de ce test, la réalité est plus complexe. D'une part, le signal de fluorescence et la lisibilité des foci γ -H2AX peuvent être perturbés par des dysfonctionnements de la chromatine dus au traitement ou au statut génétique (Fig. 6). D'autre part, comme il est précisé dans le paragraphe suivant, les foci γ -H2AX disparaissent à un rythme normal dans certains cas de radiosensibilités [6,11].

Depuis une dizaine d'années, au rebours des études monogéniques, notre groupe a délibérément choisi d'adopter une démarche avec le plus grand spectre

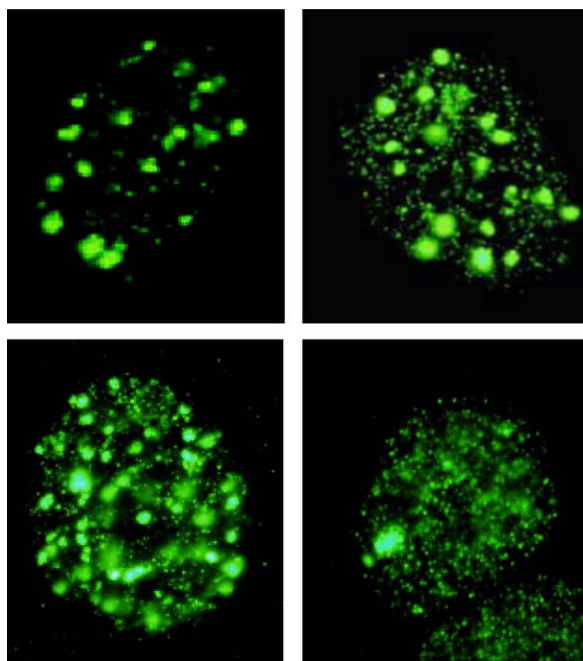


Fig. 6. Exemples représentatifs d'images de noyaux de cellules humaines irradiées contenant des foci γ -H2AX obtenus par immunofluorescence. Pour le même traitement (2 Gy de rayons X suivies de 4 h de réparation), on peut dénombrer les foci γ -H2AX dans les deux photos du haut. Toutefois, le fond du noyau peut être couvert d'une coloration verte artificielle ou d'un certain nombre de petits foci dont la prise en compte dans le comptage final est un réel problème technique (photos du bas).

possible de radiosensibilité. La relation entre la radiosensibilité et la réparation des CDB a été examinée dans un premier temps au sein d'une collection de 40 fibroblastes humains représentant au moins huit différents syndromes génétiques [6,11]. Cette démarche se poursuit aujourd'hui avec une centaine de lignées cellulaires issus de syndromes connus ou de patients ayant montré de fortes réactions tissulaires après radiothérapie. L'application systématique de la plupart des tests moléculaires prédictifs de la radiosensibilité nous a permis d'obtenir une corrélation quantitative entre la radiosensibilité cellulaire et la réparation des CDB valable pour toutes les cellules de mammifères : la SF2 apparaît comme inversement proportionnelle au taux de CDB non réparées reconnues par la phosphorylation de H2AX (Fig. 7). Une telle corrélation nous apprend qu'il suffit d'une à deux CDB restant encore non réparées 24 h après irradiation pour entraîner la mort d'une cellule irradiée [6,11]. Cependant, le test γ -H2AX ne permet à lui seul de prédire l'ensemble de la radiosensibilité humaine. En effet, ce test distingue difficilement les cellules radiorésistantes des cellules montrant une radiosensibilité modérée. Sur la Fig. 7, on voit notamment que la limite inférieure de ce que l'on pourrait appeler des cellules radiorésistantes cohabite avec la limite supérieure du groupe de cellules montrant une radiosensibilité modérée mais significative. Pour des raisons statistiques, on ne peut ainsi affirmer que ces fibroblastes sont déficients dans la voie NHEJ. Étant irradiés en quiescence (G0/G1), la voie HR ne peut être incriminée. De tels cas de radiosensibilité modérée suggèrent donc l'existence d'une troisième voie de réparation des CDB, indépendante des deux autres et dont le dysfonctionnement serait responsable d'une radiosensibilité modérée.

6.5. La voie MRE11-dépendante, une alternative à la réparation par suture

Dans notre étude, toutes les cellules de radiosensibilité modérée proviennent soit de syndromes génétiques associés à une forte prédisposition au cancer, soit de patients traités pour un cancer. De façon systématique, ces cellules montrent également un taux de foci nucléaires formés par la protéine MRE11 significativement plus élevé après irradiation que les cellules plus radiorésistantes (Fig. 8). La protéine MRE11 est une nucléase dont la séquence est particulièrement conservée à travers les espèces. Le fait qu'une protéine qui peut couper soit anormalement plus active dans des cellules associées à une forte instabilité génomique impliquée suggère qu'elle joue un rôle dans un processus de réparation recombinatoire fautif [11]. Le nombre de foci MRE11 a été justement corrélé à des phénomènes d'hyper-recombinaison indépendante de la HR et associé à une forte prédisposition au cancer [11]. Le test des foci MRE11 permettrait donc la quantification de la « mauvaise » réparation, responsable de l'instabilité génomique mais participant aussi à la réparation globale et donc aux processus de radiorésistance. Le double test γ -H2AX-MRE11 nous donne alors une vision quantifiée de la radiosensibilité et de l'instabilité génomique radio-induite. Une classification des cellules en

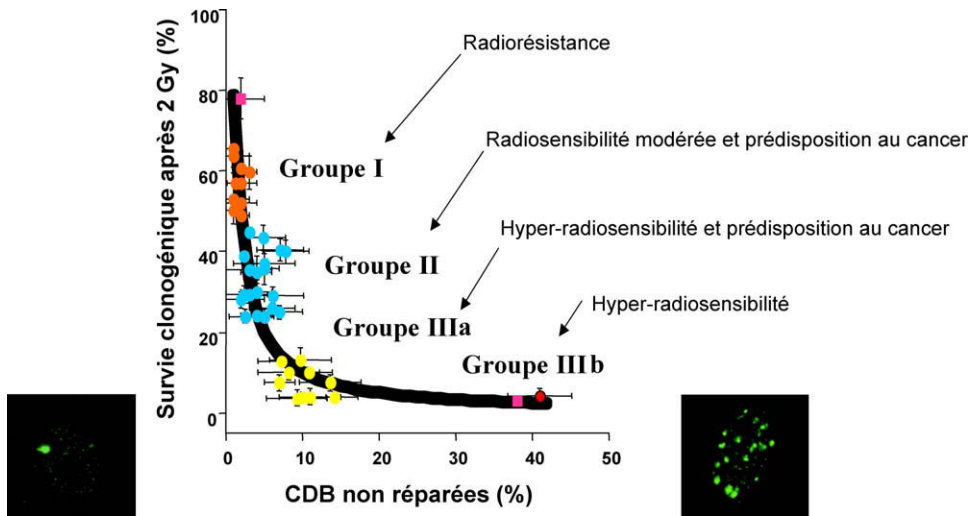


Fig. 7. Relation entre la SF2 et le pourcentage de CDB non réparées mesurée par immunofluorescence γ -H2AX 24 h après l'irradiation. Ces données sont issues de [11]. Les flèches désignent les différents groupes de radiosensibilité (groupe I : $65,6\% < SF2 < 45,2\%$; groupe II : $45,2\% < SF2 < 7,4\%$; groupe III : $SF2 < 7,4\%$). Le groupe III contient pour l'instant deux sous-groupes concernant respectivement certaines mutations de ATM (IIIa) et certaines mutations de la ligase IV et de DNA-PKcs (IIIb). Les carrés roses correspondent aux lignées de rongeur très radioresistantes et très radiosensibles de la famille CHO-xrs [11]. La SF2 est inversement proportionnelle aux CDB non réparées. Les deux photos montrent des exemples représentatifs de foci γ -H2AX après 24 h sur des lignées radiosensibles et radioresistantes.

fonction de leur SF2 et des taux de foci γ -H2AX et MRE11 a donc été proposée :

- le groupe I décrit les cellules radioresistantes sans instabilité génomique particulière ;

- le groupe II rassemble les cellules montrant une radiosensibilité modérée (SF2 comprise entre 7 et 45 %), un taux de CDB non réparées inférieur à 7 % et une forte instabilité génomique. Il regroupe notamment la plupart des syndromes génétiques associés à une forte

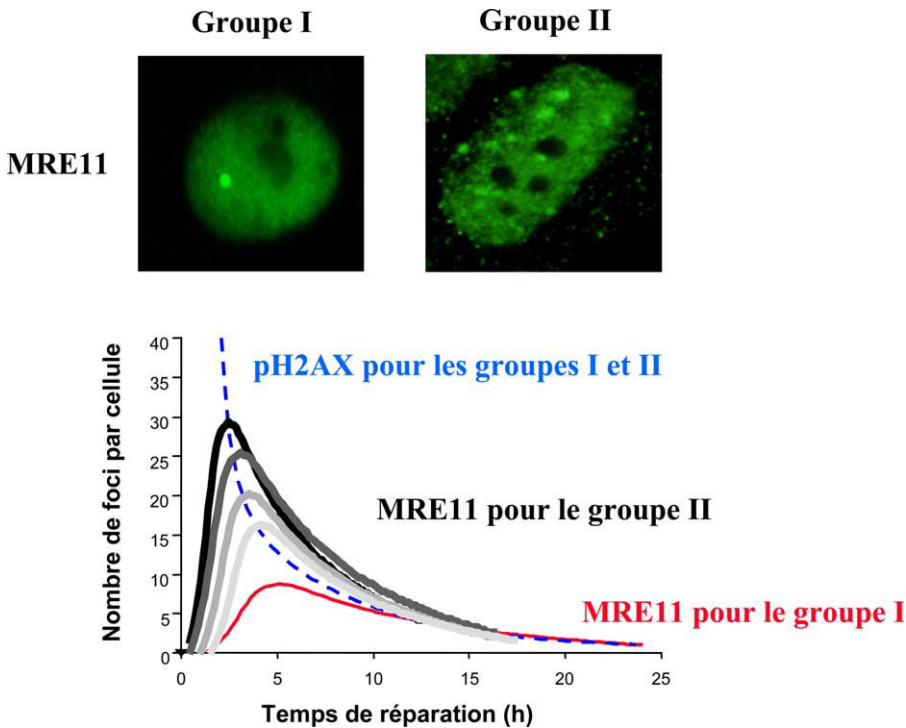


Fig. 8. Foci MRE11 et patients radiosensibles. Les cellules des patients du groupe II (radiosensibilité modérée et prédisposition au cancer) montrent un nombre de foci MRE11 radio-induits plus nombreux que les patients du groupe I (radioresistants). Ces conclusions sont illustrées à la fois par des photos d'immunofluorescence (haut) et le graphe (bas) résumant schématiquement le nombre de foci MRE11 au cours du temps après une dose de 2 Gy de rayons X [11].

prédisposition au cancer et les patients montrant des réactions suraiguës après un traitement radiochimiothérapique ;

- le groupe III concerne les cellules hyper-radiosensibles (SF2 inférieures à 7 %) et correspond à des syndromes génétiques dont les premiers signes cliniques sont observés au niveau pédiatrique [6,11] (Fig. 7).

6.6. Un lien fort avec les conditions cliniques d'irradiation

Dans le cadre d'une radiothérapie où la dose est fractionnée, les cellules du groupe II accumulent des taux de CDB non réparés non négligeables au fur et à mesure des sessions de radiothérapie. Les réactions suraiguës peuvent alors survenir quand ces taux atteignent des valeurs comparables à celles obtenues en dose unique pour des cellules du groupe III [6,11] (Fig. 9). La définition de ces trois groupes est bien sûr provisoire. Notre laboratoire la documente régulièrement par l'ajout de nouvelles données sur des syndromes génétiques connus associés à une radiosensibilité et/ou une forte prédisposition au cancer mais surtout à partir de biopsies de peau issues de patients ayant montré des réactions suraiguës à la suite de leur traitement radiothérapique. À partir d'un double test γ -H2AX-MRE11 sur une biopsie de peau, il est donc aujourd'hui possible de prédire de façon fiable la radiosensibilité des tissus sains d'un individu tant en termes diagnostiques que pronostiques, et ce, quelle que soit la modalité d'irradiation.

En plus des doses utilisées habituellement en radiothérapie, il faut également souligner l'importance croissante de la prise en compte des faibles doses de rayons X appliquées soit par l'imagerie portale pendant le traitement radiothérapique, soit par des radiodiagnostic standard (scanners, radiographies, etc.). La mise en évidence du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses de rayons X généralement observé entre 1 mGy et 50 cGy sur des tissus à fort pouvoir métastatique constitue également une véritable opportunité pour éprouver nos

hypothèses sur le pouvoir prédictif des tests basés sur la réparation des CDB [83]. Ainsi, aucune expression de gène ni aucune mutation unique n'a jusqu'à présent été corrélée au phénomène d'hyperradiosensibilité aux faibles doses afin de prédire la radiosensibilité observée dans un continuum allant de 1 mGy à plusieurs Gy [83,84]. Par contre, certaines fonctions comme l'activité kinase de DNA-PK ou la mesure des taux non réparés des CDB permettent aujourd'hui de mieux rendre compte de ce phénomène [83–85].

6.7. La radiosensibilité et les réactions observées en clinique

Nous avons cité dans cette revue des maladies génétiques associées à de fortes radiosensibilités causées par des mutations homozygotes mais dont la fréquence est de l'ordre de 1/100 000 : elles ne constituent donc pas la majorité des cas de radiosensibilité que l'on peut rencontrer dans les services de radiothérapie à la suite d'un traitement anti-cancer. À l'inverse, les cas observés en radiothérapie sont plutôt des cas de radiosensibilités modérées (groupe II) (Granzotto et al., en préparation). Une radiosensibilité modérée de type groupe II est justement l'un des symptômes cliniques associé aux mutations hétérozygotes de la plupart des gènes précités. Les porteurs hétérozygotes des gènes comme *ATM*, *NBS1*, *MRE11* pourraient ainsi représenter une fraction importante des patients radiosensibles. En particulier, les porteurs de mutations hétérozygotes d'*ATM* représentent environ 1 % de la population mondiale et seraient associés à des prédispositions au cancer plus élevées que la moyenne [86]. Quantifier et tenir compte de la susceptibilité individuelle reste donc une des tâches majeures de la radiobiologie et de la radiothérapie. Rappelons toutefois que le seul patient portant une mutation de la ligase IV a été soumis puis a succombé à son traitement radiothérapique à la suite d'un lymphome détecté dans son adolescence alors que rien ne laissait supposer durant les premières années de sa vie qu'il souffrait d'une telle

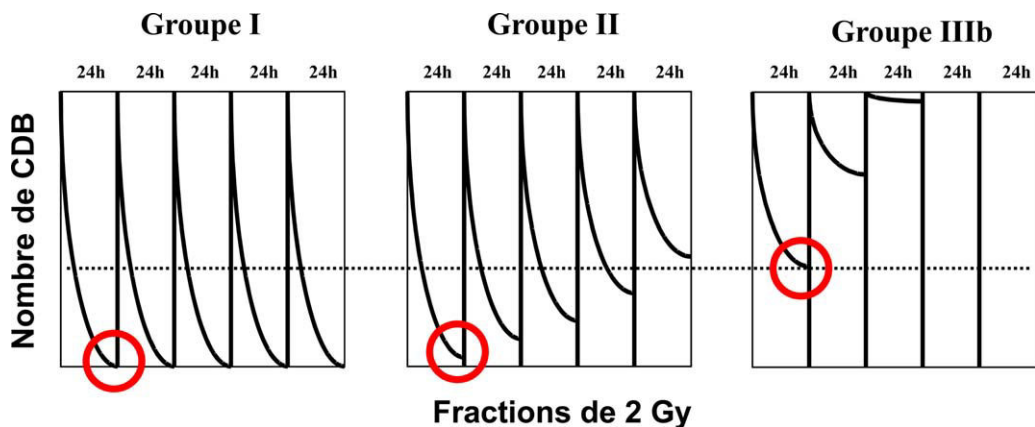


Fig. 9. Influence du groupe de radiosensibilité dans la réponse au fractionnement de dose : lors d'une séance de dose fractionnée standard (2 Gy espacés de 24 h), le nombre de CDB diminue avec le temps de réparation jusqu'à un taux de CDB non réparables. Ce taux s'accumule progressivement tout au long des séances pour atteindre éventuellement des taux de toxicité (pointillés) comparables aux effets observés en dose unique pour les cellules les plus radiosensibles (groupe III). Ainsi, les patients du groupe II, souffrant d'un défaut de réparation faible en dose unique, peuvent montrer des réactions suraiguës résultant d'une accumulation de dommages à partir d'un nombre de séances de radiothérapie théoriquement prévisible par les tests de réparation.

radiosensibilité [87]. Plus récemment encore, en 2010, un patient atteint d'une tumeur de Wilms a succombé à son traitement radiothérapeutique : une analyse *post-mortem* a conclu à une mutation du gène *ATM* [88]. Les doses appliquées en radiothérapie sont évidemment plus élevées qu'un stress environnemental quotidien et pourraient mettre en évidence brutalement des affections peu décelables dans la vie de tous les jours.

7. Conclusions

Les bases moléculaires et cellulaires de la radiosensibilité sont incroyablement complexes. Toutefois, leur élucidation rendra possible le développement de tests fiables :

- pour prédire l'efficacité des traitements radiochimiothérapeutiques contre les tumeurs ;
- pour anticiper et optimiser les nouvelles modalités anticancer (*cyberknife*, irradiation par modulation d'intensité, micro-irradiations, hadronthérapie, etc.) ;
- pour prévoir et prévenir l'apparition des réactions suraiguës.

Sept points majeurs sont à retenir :

- les tissus sains comme les tumeurs montrent un très large spectre de radiosensibilité dont le statut génétique est l'un des facteurs essentiels ;
- la rapidité d'un protocole n'est pas une preuve de fiabilité ni de prédictibilité : les différences inter-individuelles, inter-organes, inter-tissus ainsi que les tests moléculaires rapides peuvent être des pièges. De plus, l'usage des lymphocytes peut entraîner des biais dans la prédiction des réactions radio-induites des tissus conjonctifs ;
- la mesure de la survie clonogénique reste le « *standard* » cellulaire pour évaluer quantitativement la radiosensibilité *in vitro*, prédire la radiocurabilité des tumeurs *in vivo* et prévoir les réactions suraiguës sur les tissus sains irradiés ;
- tous les paramètres relatifs à la croissance cellulaire ou à l'hypoxie sont insuffisants pour prédire correctement la radiosensibilité des tissus sains ou des tumeurs ;
- les tests cytogénétiques rendent assez fidèlement compte d'une large gamme de radiosensibilité mais la période de temps nécessaire à l'obtention des métaphases peut être source de biais ;
- la mesure de l'expression radio-induite ou la détermination de SNP souvent effectuées à partir de lymphocytes présentent des avantages de rapidité, d'acquisition de données, mais la littérature actuelle suggère qu'ils ne prédisent pas suffisamment la relation dose-effet ainsi que les réactions suraiguës qui surviennent généralement sur les autres tissus ;
- l'étude d'une multitude de syndromes génétiques consolide la conclusion que les tests prédictifs basés sur la fonctionnalité des voies de réparation de l'ADN permettent de quantifier et de prévenir les réactions suraiguës post-traitement quelle que soit leur sévérité. De nouvelles investigations sont cependant nécessaires

pour établir encore plus finement les relations existant entre les dysfonctionnements de la réparation des CDB et la radiosensibilité et choisir au mieux le ou les marqueurs prédictifs des acteurs de la réparation.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Remerciements

Nous remercions les Prs M. Tubiana (Académie des sciences), J.L. Lagrange (CHU Henri-Mondor de Créteil), E. Lartigau (centre Oscar-Lambret, Lille), J.-M. Cosset (institut Curie, Paris), J. Bourhis (institut Gustave-Roussy, Villejuif), les Drs C. Carrie et L. Claude (centre Léon-Bérard, Lyon) ainsi que l'équipe des praticiens hospitaliers de l'hôpital cantonal de Genève pour leur concours. Nous remercions également les Drs E.P. Malaise, V. Favaudon, D. Averbeck, P. Gourmelon et L. Sabatier pour leurs conseils précieux. Ce travail a été réalisé grâce au soutien d'Électricité de France (Commission de radioprotection), du Centre national d'études spatiales, de l'Agence nationale de la recherche, de l'Institut national du cancer et de l'Association pour la recherche sur l'ataxie-telangiectasie. Les auteurs de cette revue ont reçu le Prix Louis-Fontaine 2008 de la Fondation Rhône-Alpes Futur pour leur travail sur la prédiction des réactions suraiguës après traitement radiochimiothérapeutique. G.V. est lauréat du Prix Mallet 2009 et N.F. est lauréat de l'Académie des sciences (Prix du Dr et de Mme Peyré 2009).

Références

- [1] B. Fertil, E.P. Malaise, Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7 (1981) 621–629.
- [2] RTOG/EORTC, Late effects consensus conference, *Radiother. Oncol.* 35 (1995) 5–7.
- [3] W. Dörr, J.H. Hendry, Consequential late effects in normal tissues, *Radiother. Oncol.* 61 (2001) 223–231.
- [4] R. Abderrahmani, A. François, V. Buard, M. Benderitter, J.C. Sabourin, D.L. Crandall, et al., Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74 (2009) 942–948.
- [5] D. Ash, Lessons from epinal, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 19 (2007) 614–615.
- [6] A. Joubert, N. Foray, Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells, *Cancer Radiother.* 11 (2007) 129–142.
- [7] C. Hennequin, L. Quero, V. Favaudon, Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity, *Cancer Radiother.* 12 (2008) 3–13.
- [8] M.L. Bouchacourt, Sur la différence de sensibilité aux rayons de Röntgen de la peau des différents sujets et sur le même sujet des différents régions du corps, in: S.p.I.A.D. Sciences (Ed.), Masson, Paris, 1911, pp. 942–947.
- [9] C. Regaud, A. Lacassagne, Effets histophysiologiques des rayons de Röntgen et de Becquerel-Curie sur les tissus adultes normaux des animaux supérieurs, in : C. Regaud (Ed.), Radiophysologie et radiothérapie, Presses Universitaires de France, Paris, France, 1927.
- [10] D. Averbeck, Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes, *Cancer Radiother.* 4 (2000) 335–354.
- [11] A. Joubert, K. Gamo, Z. Bencokova, J. Gastaldo, W. Rénier, N. Chavaudra, et al., DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008) 1–19.
- [12] V. Despeignes, *Lyon Medical* 26 juillet 1896 (1896) 428–506.
- [13] P. Curie, H. Becquerel, Action physiologique des rayons du radium, *C. R. Acad. Sci.* 82 (1901) 1289.
- [14] T.T. Puck, P.I. Marcus, Action of X-rays on mammalian cells, *J. Exp. Med.* 103 (1956) 653–666.

- [15] J. Bergonié, L. Tribondeau, Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle, *C. R. Acad. Sci.* 143 (1906) 983–984.
- [16] P.J. Deschavanne, B. Fertil, A review of human cell radiosensitivity in vitro, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34 (1996) 251–266.
- [17] B. Fertil, H. Dertinger, A. Courdi, E.P. Malaise, Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves, *Radiat. Res.* 99 (1984) 73–84.
- [18] B. Fertil, I. Reydellet, P.J. Deschavanne, A benchmark of cell survival models using survival curves for human cells after completion of repair of potentially lethal damage, *Radiat. Res.* 138 (1994) 61–69.
- [19] A.C. Begg, The clinical status of Tpot as a predictor? Or why no tempest in the Tpot!, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32 (1995) 1539–1541.
- [20] K. Haustermans, J. Fowler, K. Geboes, M.R. Christiaens, A. Lerut, E. van der Schueren, Relationship between potential doubling time (Tpot), labeling index and duration of DNA synthesis in 60 esophageal and 35 breast tumors: is it worthwhile to measure Tpot? *Radiother. Oncol.* 46 (1998) 157–167.
- [21] P. Antognoni, N.H.A. Terry, A. Richetti, R. Luraghi, M. Tordiglione, M. Danova, The predictive role of flow cytometry-derived tumor potential doubling time (Tpot) in radiotherapy: open questions and future perspectives, *Int. J. Oncol.* 12 (1998) 245–256.
- [22] F. Eschwege, J. Bourhis, T. Girinski, E. Lartigau, M. Guichard, D. Deble, et al., Predictive assays of radiation response in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a review of the Institute Gustave Roussy experience, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39 (1997) 849–853.
- [23] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [24] H. Zhang, Molecular signaling and genetic pathways of senescence: its role in tumorigenesis and aging, *J. Cell Physiol.* 210 (2007) 567–574.
- [25] B. Zhivotovskiy, B. Joseph, S. Orrenius, Tumor radiosensitivity and apoptosis, *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 10–17.
- [26] P.L. Olive, R.E. Durand, Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int. J. Radiat. Biol.* 71 (1997) 695–707.
- [27] A. Schmitz, J. Bayer, N. Dechamps, L. Goldin, G. Thomas, Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68 (2007) 1169–1177.
- [28] A. Schmitz, J. Bayer, N. Dechamps, G. Thomas, Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57 (2003) 769–778.
- [29] M. Ozsahin, N.E. Crompton, S. Gourgou, A. Kramar, L. Li, Y. Shi, et al., CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7426–7433.
- [30] M. Ozsahin, H. Ozsahin, Y. Shi, B. Larsson, F.E. Wurgler, N.E. Crompton, Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38 (1997) 429–440.
- [31] M. Fernet, J. Hall, Predictive markers for normal tissue reactions: fantasy or reality? *Cancer Radiother.* 12 (2008) 614–618.
- [32] C. Badie, S. Dziwura, C. Raffy, T. Tsigani, G. Alsbeih, J. Moody, et al., Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment, *Br. J. Cancer* 98 (2008) 1845–1851.
- [33] J.P. Svensson, L.J. Stalpers, R.E. Esveltd-van Lange, N.A. Franken, J. Haveman, B. Klein, et al., Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity, *PLoS Med.* 3 (2006) e422.
- [34] N. Foray, V. Randrianarison, D. Marot, M. Perricaudet, G. Lenoir, J. Feunteun, Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2, *Oncogene* 18 (1999) 7334–7342.
- [35] M. Promkan, G. Liu, P. Patmasiriwat, S. Chakrabarty, BRCA1 modulates malignant cell behavior, the expression of survivin and chemosensitivity in human breast cancer cells, *Int. J. Cancer* 125 (2009) 2820–2828.
- [36] E. Cabuy, C. Newton, P. Slijepcevic, BRCA1 knock-down causes telomere dysfunction in mammary epithelial cells, *Cytogenet. Genome Res.* 122 (2008) 336–342.
- [37] K.H. Yohay, The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2, *Semin. Pediatr. Neurol.* 13 (2006) 21–26.
- [38] E. Weterings, D.C. van Gent, The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis, *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 1425–1435.
- [39] A. Dudas, M. Chovanec, DNA double-strand break repair by homologous recombination, *Mutat. Res.* 566 (2004) 131–167.
- [40] N. Foray, P. Verrelle, Réparations et réparatoses : entre modèles moléculaires et réalité clinique, *Bull. Cancer* 2011 (in press).
- [41] C.M. McConville, T. Stankovic, P.J. Byrd, G.M. McGuire, Q.Y. Yao, G.G. Lennox, et al., Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 320–330.
- [42] N. Foray, A. Priestley, G. Alsbeih, C. Badie, E.P. Capulas, C.F. Arlett, et al., Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks, *Int. J. Radiat. Biol.* 72 (1997) 271–283.
- [43] C.F. Arlett, P.N. Plowman, P.B. Rogers, C.N. Parris, F. Abbaszadeh, M.H. Green, et al., Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum, *Br. J. Radiol.* 79 (2006) 510–517.
- [44] D. Azria, M. Ozsahin, A. Kramar, S. Peters, D.P. Atencio, N.E. Crompton, et al., Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6284–6288.
- [45] K. De Ruyck, M. Van Eijkeren, K. Claes, K. Bacher, A. Vral, W. De Neve, et al., TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65 (2006) 1240–1248.
- [46] J. Werbrouck, K. De Ruyck, F. Duprez, L. Veldeman, K. Claes, M. Van Eijkeren, et al., Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73 (2009) 1187–1195.
- [47] O. Zschenker, A. Raabe, I.K. Boeckelmann, S. Borstelmann, S. Szymczak, S. Wellek, et al., Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFbeta1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity, *Radiother. Oncol.* 97 (2010) 26–32.
- [48] C.F. Arlett, M.H. Green, A. Priestley, S.A. Harcourt, L.V. Mayne, Comparative human cellular radiosensitivity: I. The effect of SV40 transformation and immortalisation on the gamma-irradiation survival of skin derived fibroblasts from normal individuals and from ataxia-telangiectasia patients and heterozygotes, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 911–928.
- [49] J. Cole, C.F. Arlett, M.H. Green, S.A. Harcourt, A. Priestley, L. Henderson, et al., Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 929–943.
- [50] J. Kushihiro, N. Nakamura, S. Kyoizumi, M. Nishiki, K. Dohi, M. Akiyama, Absence of correlations between radiosensitivities of human T-lymphocytes in G0 and skin fibroblasts in log phase, *Radiat. Res.* 122 (1990) 326–332.
- [51] M.H. Green, C.F. Arlett, J. Cole, S.A. Harcourt, A. Priestley, A.P. Waugh, et al., Comparative human cellular radiosensitivity: III. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual, *Int. J. Radiat. Biol.* 59 (1991) 749–765.
- [52] F.B. Geara, L.J. Peters, K.K. Ang, J.L. Wike, S.S. Sivon, R. Guttenberger, et al., Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation, *Cancer Res.* 52 (1992) 6348–6352.
- [53] H.J. Evans, Actions of radiations on human chromosomes, *Phys. Med. Biol.* 17 (1972) 1–13.
- [54] S.J. Grote, G.P. Joshi, S.H. Revell, C.A. Shaw, Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 39 (1981) 395–408.
- [55] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, B. Cedervall, N. Chavaudra, et al., 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 (1995) 26–35.
- [56] M.N. Cornforth, 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 (1987) 385–405.
- [57] J.M. Brown, M.S. Kovacs, Visualization of nonreciprocal chromosome exchanges in irradiated human fibroblasts by fluorescence in situ hybridization, *Radiat. Res.* 136 (1993) 71–78.
- [58] J.N. Lucas, R.K. Sachs, Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (1993) 1484–1487.
- [59] D. Pinkel, T. Straume, J.W. Gray, Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83 (1986) 2934–2938.
- [60] F. Darroudi, J. Fomina, M. Meijers, A.T. Natajaran, Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH, *Mutat. Res.* 404 (1998) 55–65.
- [61] A. Leonard, J. Rueff, G.B. Gerber, E.D. Leonard, Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods, *Radiat. Prot. Dosimetry* 115 (2005) 448–454.

- [62] A.S. Ishkanian, G. Zafarana, J. Thoms, R.G. Bristow, Array CGH as a potential predictor of radiocurability in intermediate risk prostate cancer, *Acta Oncol.* 49 (2010) 888–894.
- [63] S. Tapio, S. Hornhardt, M. Gomolka, D. Leszczynski, A. Posch, S. Thalhaammer, et al., Use of proteomics in radiobiological research: current state of the art, *Radiat. Environ. Biophys.* 49 (2010) 1–4.
- [64] J.P. Murnane, L. Sabatier, Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer, *Bioessays* 26 (2004) 1164–1174.
- [65] A. Vaurijoux, G. Gruel, F. Pouzoulet, E. Gregoire, C. Martin, S. Roch-Lefevre, et al., Strategy for population triage based on dicentric analysis, *Radiat. Res.* 171 (2009) 541–548.
- [66] L. Roy, E. Gregoire, V. Durand, V. Buard, M. Delbos, N. Paillole, et al., Study of the tools available in biological dosimetry to estimate the dose in cases of accidental complex overexposure to ionizing radiation: the Lilo accident, *Int. J. Radiat. Biol.* 82 (2006) 39–48.
- [67] S. Derreumaux, C. Etard, C. Huet, F. Trompier, I. Clairand, J.F. Bottollier-Depois, et al., Lessons from recent accidents in radiation therapy in France, *Radiat. Prot. Dosimetry* 131 (2008) 130–135.
- [68] N. Foray, C. Monroco, B. Marples, J.H. Hendry, B. Fertil, D.T. Goodhead, et al., 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 (1998) 551–560.
- [69] N. Foray, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Underestimation of the small residual damage when measuring DNA double-strand breaks (DSB): is the repair of radiation-induced DSB complete? *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (1999) 1589–1595.
- [70] N. Chavaudra, J. Bourhis, 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 (2004) 373–382.
- [71] N. Foray, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look, *Biochimie* 79 (1997) 567–575.
- [72] P.A. Jeggo, Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat. Res.* 150 (1998) S80–91.
- [73] P.A. Jeggo, L.M. Kemp, X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents, *Mutat. Res.* 112 (1983) 313–327.
- [74] S. Vispe, M. Defais, Mammalian Rad51 protein: a RecA homologue with pleiotropic functions, *Biochimie* 79 (1997) 587–592.
- [75] A. Shinohara, T. Ogawa, Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes, *Mutat. Res.* 435 (1999) 13–21.
- [76] L.M. Bennett, H.A. Brownlee, S. Hagavik, R.W. Wiseman, Sequence analysis of the rat Brca1 homolog and its promoter region, *Mamm. Genome* 10 (1999) 19–25.
- [77] B. Evers, J. Jonkers, Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects, *Oncogene* 25 (2006) 5885–5897.
- [78] G. Iliakis, The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells, *Bioessays* 13 (1991) 641–648.
- [79] J.L. Roti Roti, W.D. Wright, Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage repair, *Cytometry* 8 (1987) 461–467.
- [80] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage, *Methods Mol. Biol.* 291 (2005) 85–95.
- [81] E.C. Woudstra, J.M. Roesink, M. Rosemann, J.F. Brunsting, C. Driessen, T. Orta, et al., Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines, *Int. J. Radiat. Biol.* 70 (1996) 693–703.
- [82] K. Rothkamm, 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 (2003) 5057–5062.
- [83] C. Thomas, J. Charrier, C. Massart, M. Cherel, B. Fertil, J. Barbet, et al., Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: impact of DNA repair, *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008) 533–548.
- [84] B. Marples, S.J. Collis, Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 (2008) 1310–1318.
- [85] S. Vaganay-Juery, C. Muller, E. Marangoni, B. Abdulkarim, E. Deutsch, P. Lambin, et al., Decreased DNA-PK activity in human cancer cells exhibiting hypersensitivity to low-dose irradiation, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 514–518.
- [86] M. Swift, D. Morrell, R.B. Massey, C.L. Chase, Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1831–1836.
- [87] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, G.E. Pantellias, R. Okayasu, et al., Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient, *Cancer Res.* 55 (1995) 1232–1234.
- [88] B.M. Pietrucha, E. Heropolitanska-Pliszka, A. Wakulinska, H. Skopczynska, R.A. Gatti, E. Bernatowska, Ataxia-telangiectasia with hyper-IgM and Wilms tumor: fatal reaction to irradiation, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 32 (2010) e28–e30.

Annexe N°4

ARTICLE : 4

Impact of the nucleo-shuttling of the ATM protein in the response to radiotherapy: towards a molecular classification of human radiosensitivity

Adeline Granzotto^{1*}, Guillaume Vogin^{1,2*}, Clément Devic¹, Mélanie Ferlazzo¹, Larry Bodgi^{1,3}, Laurène Sonzogni¹, Muriel Viau¹, Aurélie Etaix¹, Karim Malek²⁶, Marie-Thérèse Zabol⁴, Aurélie Joubert⁵, Anne Vincent¹, Nicole Dalla Venezia¹, Michel Bourguignon⁶, Edmé-Philippe Canat⁷, Bernard Talon⁷, Anne D'Hombres⁸, Ronan Tanguy⁸, Estelle Thébaud⁹, Pierre Souteyrand¹⁰, Daniel Orbach¹¹, Dominique Stoppa-Lyonnet¹¹, Raouf Radgi¹², Eric Doré¹³, Yoann Pointreau¹⁴, Carmen Llacer-Moscardo¹⁵, Céline Bourcier¹⁵, Pierre Leblond¹⁶, Anne-Sophie Defachelles¹⁶, Cyril Lervat¹⁶, Stéphanie Guey¹⁷, François Gilsoul¹⁸, Claire Berger¹⁹, Coralie Montcharmont¹⁹, Marie-Virginie Moreau-Claeys², Nicole Chavaudra²⁰, Isabelle Martel-Lafay²¹, Cécile Laude²¹, Ngochanh Hau-Desbat²¹, Amira Ziouéche²¹, Frédéric Baleyrier²¹, Bertrand Fleury²¹, Marie-Pierre Sunyack²¹, Séverine Racadot²¹, Pascal Pommier²¹, Line Claude²¹, Renaud de Crevoizier²², David Azria¹⁵, Jean-Marc Simon¹⁷, Pierre Verrelle²³, Yazid Belkacemi²⁴, Jean Bourhis²⁵, Eric Lartigau¹⁶, Christian Carrie²¹, Alain Puisieux¹, Jean-Léon Lagrange²⁴, Jacques Balosso²⁶, Nicolas Foray¹⁵

¹INSERM, UMR1052, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France; ²Centre Alexis Vautrin, Nancy, France; ³Université Saint-Joseph, Beirut, Lebanon; ⁴Centre de Biotechnologie Cellulaire, Hospices Civils de Lyon, France; ⁵CEA, Cadarache, France; ⁶Autorité de Sûreté Nucléaire, Paris, France; ⁷Clinique Jean-Mermoz, Lyon, France; ⁸Hôpital Lyon-Sud, Hospices Civils de Lyon, France; ⁹Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ¹⁰Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France; ¹¹Institut Curie, Paris, France; ¹²Centre Joliot-Curie Rouen, France; ¹³Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France; ¹⁴Centre Jean-Bernard, Tours, France; ¹⁵Institut du Val d'Aurelle, Montpellier, France; ¹⁶Centre Oscar-Lambret, Lille, France; ¹⁷Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹⁸Hôpital Saint Joseph, Charleroi, Belgique; ¹⁹Centre Hospitalier Universitaire, Saint-Etienne, France; ²⁰Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; ²¹Centre Léon-Bérard, Lyon, France; ²²Centre Eugène-Marquis, Rennes, France; ²³Centre Jean-Perrin, Clermont-Ferrand, France; ²⁴Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ²⁵Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse; ²⁶ Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 GRENOBLE cedex 9.

* The two authors have equally contributed to this work

Running title: ATM nucleo-shuttling and clinical radiosensitivity

Keywords: radiosensitivity, tissue reactions, ATM nucleo-shuttling, DSB repair

Conflict of interest: none

Pages: 29

Figures: 6

In supplementary data : Figure 7

§Reprint request to: Dr. Nicolas Foray - Inserm, UMR 1052, Groupe de Radiobiologie, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Bâtiment Cheney A, 69008 Rue Laennec, Lyon, France. Email: Nicolas.foray@inserm.fr

Abstract

Purpose: While the post-radiotherapy over-reactions (OR) represent to a clinical and societal outcome, there is still no consensual radiobiological parameter to predict clinical radiosensitivity reliably. Since 2013, we collected more than hundreds skin biopsies from OR patients treated against different tumor localization and showing a wide range of radiosensitivity. The goal of the present paper was to establish links between molecular and clinical parameters of RT-induced toxicity by considering the CTCAE and RTOG scale grades as endpoints of clinical radiosensitivity, independently from the tumor localization. **Methods and materials:** Triplicates immunofluorescence experiments were performed on a collection of skin fibroblasts from 11 radioresistant, 6 hyper-radiosensitive and 100 OR patients, irradiated at 2 Gy and observed at 10 min and 1, 4, 24 h post-irradiation: the numbers of micronuclei and γ H2AX and pATM nuclear foci that reflect different steps of DSB recognition and repair were assessed and plotted against OR severity grades.

Results: OR patients did not necessarily show a gross DSB repair defect, which is in discrepancy with the actual paradigms that DSB repair alone is the best radiosensitivity predictor. Conversely, OR

patients elicited a systematic delay of the nucleo-shuttling of the ATM protein required for a complete DSB recognition. When plotted against severity grade, the numbers of micronuclei and γ H2AX and pATM nuclear foci suggested a link with clinical radiosensitivity but the best discrimination among OR patients is provided when both DSB recognition and DSB repair are considered.

Conclusions: Our results are consistent with a general classification of human radiosensitivity based on three groups : radioresistance (group I); moderate radiosensitivity caused by delay of nucleo-shuttling of ATM which includes OR patients (group II) and hyper-radiosensitivity caused by a gross DSB repair defect (group III). The incidence of each group was discussed.

Introduction

Among the patients treated with radiotherapy (RT), up to 25% can exhibit some tissue over-reactions (OR), which limits the application of the scheduled treatment and increases the morbidity [78, 79]. OR cover a large spectrum of localizations but the most frequent ones concern dermatitis and rectites during or after breast and prostate treatment, respectively. Furthermore, while OR were longer divided into *early* and *late* ones, the development of innovating anti-cancer strategies has complexified these two categories: there is now evidence that OR cover a continuum of occurrence times and severities [80].

Despite of considerable efforts to define OR severity scales, there is still no objective, quantifiable and consensual clinical parameter to describe and predict OR: in practise, to recognize that a patient effectively suffers from OR is still often done on the only basis of the local experience of the clinician [81, 82]. Furthermore, since some OR may be equivalent to the reactions expected on normal tissues after a dose excess, it was suggested that OR are mainly due to dosimetry errors. However, OR are likely to be more frequent than irradiation accidents. Besides, the RT accident in Epinal (France) showed that, with the same 20% dose excess delivered to prostate cancer patients, a large spectrum of OR intensities was observed systematically, strongly suggesting the impact of individual radiosensitivity. Reliable predictive assays based on biological parameters are therefore needed to predict OR[83].

To date, strong arguments support that unreparable DNA double-strand breaks (DSB) are the bases of radiosensitivity: 1) Cytogenetics support that micronuclei and unrepaired chromosome breaks, both consequences of unrepaired DSB, are quantitatively correlated with radiosensitivity [84]; 2) Quantitative correlations were obtained between cell survival and DSB repair [56, 85]; 3) The syndromes caused by mutations of DSB repair proteins are systematically associated with radiosensitivity [86, 87]. The ATM kinase, whose mutations causes ataxia telangiectasia, the most

radiosensitive human syndrome, is upstream the major DSB repair and signaling pathway [88, 89]. Despite of these arguments and because of the variety of techniques, the choice of experimental protocols (doses, repair times, cell types) and the complexity of DSB repair mechanisms, there is still no consensus about the DSB repair parameter to predict radiosensitivity reliably.

Interestingly, some syndromes like the progeroid syndromes [57], Bruton's disease [90], neurofibromatosis [91], Huntington disease [58] or Usher's syndrome [92] that are caused by mutations of cytoplasmic proteins that are not directly involve in DSB repair show moderate but significant radiosensitivity, which suggests the transport of some information or proteins from cytoplasm to nucleus after irradiation [58, 91, 92]. Interestingly, our last report on Huntington's disease showed that mutated huntingtin sequesters the ATM kinase in cytoplasm, which limits DSB recognition and repair in the nucleus. Pre-treatment of cells to statins accelerates the nucleo-shuttling of ATM, increases DSB recognition, DSB repair and radioresistance, suggesting that the transport of ATM impacts on radiation response [58].

Since 2003, in order to build a collection of cells eliciting one of the widest ranges of human radiosensitivity, our group has accumulated more than 100 skin fibroblasts from patients suffering from various OR after RT against different cancer types. The goal of the present paper was to establish links between molecular and clinical parameters of RT-induced toxicity by considering the CTCAE and RTOG scale grades as endpoints of clinical radiosensitivity, independently from the localization of the treated tumor. Immunofluorescence techniques were systematically applied to fibroblasts irradiated at 2 Gy and observed at 10 min and 1, 4, 24 h post-irradiation : the yields of micronuclei and γ H2AX and pATM nuclear foci that reflect different steps of DSB recognition and repair were assessed and plotted against OR severity grades. Results were compared to the data obtained from radioresistant and hyper-radiosensitive (ATM- and LIG4-mutated) human fibroblasts.

Methods and Materials

Patients and skin fibroblasts

This study was conducted on 117 skin fibroblasts derived from 100 OR patients and 12 radioresistant, 4 ATM-mutated and 1 LIG4-mutated cells lines. Clinical data on tumor characteristics and therapy regimens of the patients were extracted from the medical records. Further details are gathered in tables 1 (Supplementary data). The tissue severity was scored according to the CTCAE and RTOG scales. All the anonymous patients were informed and signed consent according to the ethics recommendations. This study was approved by Ethical Committee and the cell lines were declared under the number RC585 to Ministry of Research as human samples. Skin biopsies were collected in unirradiated areas after local lidocaine anesthesia and dermatological punch. After sampling, cells biopsies were placed in DMEM and cultured according standard procedures.

Irradiation

Skin fibroblasts were irradiated (2 Gy) in plateau phase of growth to avoid any artifacts due to cell cycle. All the irradiations were performed with gamma-radiation provided by standard medical accelerators and were already described elsewhere [58].

Immunofluorescence

Protocol for survival curves and antibodies against pATM and γ H2AX proteins was previously described [56, 58]

Statistical analysis and modeling

All the statistics and data analysis were performed with MathLab 7 (The Mathwork, Natick, MA) and Kaleidagraph 4.5 (Synergy Software, Reading, PA). The foci kinetics were fitted and analyzed by using the Bodgi's formula, detailed elsewhere [93]. The correlation between radiobiological parameters and severity grade were examined by linear regression analysis.

Results

The numbers of spontaneous micronuclei and DSB do not predict radiosensitivity

ATM kinase was shown to phosphorylate γ H2AX and trigger its relocalization visible by immunofluorescence as nuclear foci, considered as a DSB recognition step [36, 38, 40]. Similarly, ATM dimers are auto(trans)phosphorylated forms that are quantifiable as foci [94]. By analyzing the numbers of spontaneous micronuclei, γ H2AX and pATM foci assessed on unirradiated cells, two distinguishable sub-populations appeared: the radioresistant on one side and the OR+hyper-radiosensitive patients on the other side. However, neither inter-individual difference inside the OR subpopulation nor correlation with CTCAE (Fig.1) nor RTOG (data not shown) grades was observed. These conclusions did not change when grades were gathered in two categories (0+1+2 vs. 3+4, data not shown). These data strongly suggest that spontaneous data do not predict radiosensitivity.

The radiation-induced micronuclei discriminate three sub-populations of patients

Radiation-induced micronuclei are the consequences of unrepaired DSB that propagate all along the cell cycle leading to irreversibly damaged chromosomal fragments and causing mitotic death [95]. In human fibroblasts, since the production of radiation-induced micronuclei requires more than 4 h, their number after 2 Gy does not significantly vary from 10 min to 4 h post-irradiation (data not shown). Consequently, we only measured the number of radiation-induced micronuclei after 24 h post-irradiation. The number of residual micronuclei made appear three distinguishable sub-populations that correspond to the radioresistant, OR and hyper-radiosensitive patients ($p < 0.05$). Interestingly, the data values of each subpopulation correspond to those of the three groups of radiosensitivity that we have previously defined with well-characterized radiosensitive syndromes [56]: group I: radioresistance; group II: moderate radiosensitivity and cancer proneness; group III: hyper-radiosensitivity (Fig. 2). However, although the number of residual micronuclei was found to

be to proportional to grades (whatever the OR scale), the quantitative correlation with grades was not significant statistically (Fig.2). A similar conclusion was reached when grades were gathered into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4) (data not shown).

The residual γ H2AX foci discriminate four sub-populations of patients

When the number of γ H2AX foci was plotted against repair time after 2 Gy, a great variety of DSB repair kinetics appeared (Fig. 3A). Through a rigorous mathematical analysis, we have proposed the “Bodgi’s formula” to describe the kinetics of appearance/disappearance of γ H2AX foci: after the DSB induction phase, the DSB recognition phase during which the number of foci increases precedes the DSB repair phase during which the number of foci decreases [93]. Five situations were identified, whether cells are provided from well-characterized genetic syndromes or not:

in the cell lines that showed more than 70 γ H2AX foci 10 min after 2 Gy, the number of γ H2AX foci systematically decreased up to 24 h. In this case, the DSB recognition is compatible with the commonly-accepted DSB induction rate of about 40 DSB per Gy. However, the number of residual γ H2AX foci can be either lower than 3 (normal DSB recognition and complete DSB repair, group I, radioresistant cells) or higher than 8 (group IIIb, normal DSB recognition and DSB repair deficiency, hyper-radiosensitive LIG4-mutated cells) [56];

in the cell lines that showed less than 70 γ H2AX foci 10 min after 2 Gy, the DSB recognition can be considered as deficient. In this case, three situations were identified: 1) the number of γ H2AX foci decreased up to 24 h post-irradiation to reach values higher than 3 but lower than 8 (irreversible DSB recognition impairment, moderate DSB repair deficiency, moderate radiosensitivity, group IIa, some OR patients); 2) the number of γ H2AX foci increased up to 1 h and then decreased continuously to reach values higher than 3 but lower than 8 (delayed DSB recognition, moderate DSB repair deficiency, moderate radiosensitivity, group IIb, some OR patients); 3) the number of γ H2AX foci is

nearly negligible, DSB are not recognized and therefore not repaired by NHEJ (no DSB recognition, gross DSB repair deficiency, hyper-radiosensitivity, group IIIb, ATM-mutated cells [56] (Fig. 3A).

From the above description, it appeared that the numbers of γ H2AX foci after 10 min, 1 or 4 h post-irradiation cannot properly predict the radiosensitivity of all the cells of the collection (data not shown). Conversely, the number of residual γ H2AX foci discriminated 4 subpopulations, in agreement with previous studies [56, 93]: group I (radioresistant), group II (OR), group IIIa (ATM-mutated) and group IIIb (LIG4-mutated patients). Interestingly, it appeared also proportional to the grades. Again, the correlation with the CTCAE (Fig. 3B) and RTOG (Fig.3C) grades inside the OR patients subgroup was not significant. A similar conclusion was reached when grades were gathered into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4) (data not shown). Although encouraging, these data show that the number of residual DSB alone is not a satisfactory predictor of radiosensitivity linked to OR.

The analysis of pATM foci suggests a radiation-induced nucleo-shuttling of ATM that is a common feature of OR patients

The statement that about 40 DSB are induced per Gy per human diploid cell has been abundantly documented in literature [96, 97]. Hence, the fact that a majority of cells of the collection show less induced DSB than expected cannot be explained by physical considerations or by a nucleus size that would be shorter (Fig.4A). Besides, ancillary data did show that OR patients cells elicit a normal DSB induction rate by using pulsed field gel electrophoresis technique [96, 97] and a normal ATM expression (data not shown). Since H2AX phosphorylation required ATM kinase activity, these results suggest some impairment of an ATM-dependent DSB recognition process. Interestingly, from some fibroblasts of the collection that are provided from well-known characterized syndromes, the pATM localization after irradiation elicited some differences with the radioresistant controls, suggesting that ATM diffuse from cytoplasm to nucleus [58, 93]. In order to investigate the role of ATM

localization in the radiosensitive cells, pATM immunofluorescence was systematically applied to the cell lines in the same conditions as for γ H2AX data.

Without irradiation, the pATM forms were found essentially cytoplasmic, whatever the radiosensitivity status (Fig 4B). After irradiation, like γ H2AX foci kinetics, pATM foci kinetics also obeyed the Bodgi's formula (Fig.4C). Interestingly, the number of pATM foci was systematically found twice lower than that the number of γ H2AX foci (Fig.4C). In parallel with the increase of the number of pATM foci in the nucleus, immunoblots from cytoplasmic and nuclear extracts confirm that some pATM forms become nuclear, suggesting a radiation-induced nucleo-shuttling of the ATM protein (Fig.4B).

Since OR patients cells showed very different ATM foci kinetics at early post-irradiation times, it was not surprising that the number of pATM foci after 10 min and 1h post-irradiation was not correlated with CTCAE (Fig 5A,B) or RTOG grade (data not shown). Conversely, the maximal number of ATM foci chosen between 10 min or 1h discriminated all the grades and was the best predictor of this study (Fig. 5C). When grades were gathered into 2 categories (0+1+2 vs. 3+4), the maximal number of ATM foci provide a significant prediction of radiosensitivity among the OR patients.

Both γ H2AX and pATM foci are required for a better description of radiosensitivity

The residual γ H2AX foci more likely reflect the DSB repair deficiency while the number of early pATM foci reflects DSB recognition. Since radiosensitivity seems to result to relative impairments in both these process, the corresponding numbers of residual γ H2AX and pATM foci were plotted together in the same graph. The resulting figure provided the better way to discriminate groups and OR sub-groups (Fig 6A.), suggesting that both ATM nucleo-shuttling (DSB recognition) and DSB repair data are required to describe all the range of human radiosensitivity. Interestingly, some natural limits appeared with regard the ratio between DSB recognition and DSB repair defects. For example, there

is no radiosensitive cell line that can show normal DSB repair but impaired DSB recognition or normal DSB recognition but impaired DSB repair (Fig. 6B). Hence, the Fig.6B shows the occurrence domains of radiosensitivity. By considering that the probability of belonging to a given group is proportional to the inverse of the corresponding confidence areas, the normalized incidence of each group was deduced (Fig. 6C). While this hypothesis fits with a gaussian distribution of the groups of radiosensitivity, it appears that the estimated incidence of group II (to which the majority of OR patients belong to) is in agreement with literature (i.e. about 25% of patients) (see Introduction). Obviously, further experiments are required to better evaluate the incidence of each of these groups.

Discussion

Justification of the methodology

A global approach: The goal of the present paper was to establish quantitative links between molecular and clinical radiosensitivity by considering tissue toxicity scale grades as endpoints of clinical radiosensitivity, independently from the localization of the treated tumor and the early or late nature of the reactions. One of the arguments against this approach would be that a given grade may correspond to different tissue reactions on different localizations whose link is not necessarily obvious (ex: telangiectasia vs. hair loss). However, by considering each tumor localization separately, the links established between molecular and clinical features do not vary significantly from the global approach (data not shown). Conversely, when the tissue reactions are expected to be nearly an all-or-none phenomenon (like in the case of ear-nose and throat tumor where grade-3 or -4 reactions represent the majority of side-effects), the sensitivity and the specificity of our assays are even reinforced (data not shown). Similar global approaches were applied to consider the intrinsic radiosensitivity as a general notion [98]. Lastly, we have deliberately chosen to consider correlations with severity grades taken separately. Indeed, while nearly all the studies dichotomized the grades in two arbitrary categories (0+1+2 vs 3+4), we endeavored to examine the corresponding radiobiological values for each grade. Altogether, these data support that the prediction of radiosensitivity can be based on molecular hypotheses, independently from the localization of the irradiated zone and the treated tumor, considering that there is no particular DSB repair and signaling pathways that would be tissue-specific.

Choice of the cellular model: For practical reasons, the great majority of experiments performed in the field of gene expression and mutations are performed with blood cells. However, RT-induced reactions concerned more preferentially conjunctive, endothelial or epithelial tissues than lymphocytes. Even if the choice of blood cells is mainly based on practical considerations and rapidity of analyses, it raises therefore the question of the actual existence of a causal correlation between

data from lymphocytes and the severity of tissue reactions. This choice is inasmuch crucial as blood cells are naturally more prone to apoptosis than fibroblasts for example. Besides, our data show here that radiosensitivity can be predict from cellular models (fibroblasts) than do not show apoptosis even for hyper-radiosensitive cases. Furthermore, the estimation of the intrinsic radiosensitivity of blood cells (quantified by clonogenic survival) is limited by the reduced life of circulating lymphocytes or requires EBV-transformation that may bias the assessment of radiosensitivity (transformed cells are generally more radioresistant than their untransformed counterparts) [99]. In 1990, Kushiro et al. did not find any correlation between radiosensitivity of fibroblasts and lymphocytes [100]. In 1991, from quiescent skin and blood cells of 34 non-radiosensitive donors, Green et al. demonstrated significant differences in radiosensitivity with fibroblasts but not with T-lymphocytes [101]. In 1992, from 30 human fibroblasts and 29 lymphocytes, Geara et al. concluded that there was no correlation between survival fractions assessed in lymphocytes and those assessed in fibroblasts, suggesting that tissue-specific characteristics, such as differentiation, may modulate radiosensitivity [102].

The nucleo-shuttling of ATM at the molecular basis of the radiosensitivity

The choice of the ATM-dependent DSB repair and signaling markers to predict radiosensitivity is justified by a very solid documentation that strongly supports that unrepaired DSB are the key-event of radiation-induced cell lethality [50]. The investigations about ATM are also justified by the major role that this protein plays in response to stress [89]. The commonly accepted paradigm is the predominance of nuclear forms of ATM. However, radiosensitivity can be observed in some cells while the level of spontaneous ATM proteins in nucleus is normal. This is notably the case of radiosensitive syndromes caused by mutations of cytoplasmic proteins [92]. Particularly, our last report on Huntington's disease showed that mutated huntingtin sequesters ATM in cytoplasm, which delays the nucleo-shuttling of ATM, limits DSB recognition, DSB repair and increases radiosensitivity. A treatment to statins and bisphosphonates was shown to alleviate the delay of the

nucleo-shuttling, stimulate DSB repair and increase radioresistance [58]. Our more recent reports suggest that the radiation-induced flux of ATM monomers that enter in the nucleus is much higher important that the quantity of ATM proteins present in the nucleus before irradiation (Bodgi and Foray, submitted). Altogether, our data support that the ATM nucleo-shuttling is required for a normal radiation response [57, 58]. Besides, the fact that γ H2AX foci are systematically found twice more numerous than pATM ones is consistent with this hypothesis: two γ H2AX foci (one on each DNA end) are phosphorylated by two ATM monomers. Once DSB is repaired, both monomers associate together to give one ATM autophosphorylated dimer revealed by one pATM foci (Fig. 7 Supplementary Data).

One of the major conclusions of the present paper is that the cellular radiosensitivity of OR patients (even with grade 4 toxicities) cannot be considered as hyper-radiosensitivity as shown in ATM-mutated patients but rather to moderate radiosensitivity as observed in cells derived from genetic syndromes like Bloom's syndrome, Fanconi anemia, neurofibromatosis or Huntington's disease [56, 92]. This statement encourages the definition of a classification of radiosensitive cases based on objective criteria, since the terms "radiosensitivity" or "hyperradiosensitivity" are generally used indifferently in literature [56, 92, 103]. Hence, by considering the cells as made by two independent compartments, cytoplasm in which DSB recognition is conditioned and nucleus in which DSB repair is performed, radiosensitivity can be caused either by impairment of DSB recognition or impairment of DSB repair or both and at different levels. It was therefore logical to use two markers, at least, to predict a wide range of radiosensitivity. In 2008, we concluded that two different assays were required to predict radiosensitivity: immunofluorescence assays against both γ H2AX and MRE11 were proposed. Interestingly, MRE11 foci are also formed in an ATM-dependent manner [56].

The second major conclusion of this paper is that OR patients do not necessarily suffer from a significant DSB repair defect but systematically from a DSB recognition impairment reflecting by a delay in the ATM nucleo-shuttling. This conclusion is in clear disagreement with the commonly

accepted paradigm that only the nuclear damage impact on the cell survival. In a previous report, we hypothesized that the delay of the ATM nucleo-shuttling is caused by a sequestration of ATM by mutated cytoplasmic substrates [58, 93]. Since the delay of cytoplasmic proteins appears to be a common feature of OR patients, it can be thought that the causes of radiosensitivity linked to OR may be mutations of cytoplasmic proteins that become ATM substrates. The resulting protein-protein complex may be not diffusible into nucleus. Such requirements can be reached by a number of mutated proteins, which may be in agreement with a non-negligible of proportion of OR patients. Further investigations are required to identify these ATM neo-substrates to better predict cellular and clinical radiosensitivity.

Legend to figures

Fig.1: Number of micronuclei, γ H2AX and pATM foci as a function of the severity CTCAE grade.

Each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates. Open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.2: Number of residual micronuclei as a function of the severity CTCAE or RTOG grade.

Micronuclei were scored during immunofluorescence experiments via DAPI counterstaining after 2 Gy followed by 24 h for repair. Each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates. Open squares represent the mean \pm SD for each grade category. Linear regression ($p > 0.9$ each) were performed on radioresistant and OR data only. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters.

Fig.3: Number of residual γ H2AX foci as a function of the severity CTCAE or RTOG grade. A.

Representative examples of γ H2AX foci time-kinetics obtained from cells of the collection. For convenience error bars and plot markers were omitted for the 10 min, 1h 4 and 24 h repair time data. B and C: The number of γ H2AX foci remaining 24 h after 2 Gy were plotted against the indicated severity grade. Linear regression ($p > 0.9$ each) were performed on radioresistant and OR data only. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters. For all the panels, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.4: The pATM foci data suggest a nucleo-shuttling of ATM. A. The number of pATM foci scored 10

min after 2 Gy are provided for all the cell lines of the collection: the dotted line indicates the normal

DSB incidence of 40 DSB per Gy per cell. B. Representative pATM immunoblots of the pATM expression at the indicated times after 2 Gy in the cytoplasm or in the nucleus. The corresponding immunofluorescence data are shown for unirradiated or irradiated (2Gy + 10 min) cells. C. Representative examples of pATM foci time-kinetics obtained from cells of the collection. For convenience error bars and plot markers were omitted for the 10 min, 1h 4 and 24 h repair time data. For the panels A and C, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.5: Number of residual pATM foci as a function of the severity CTCAE grade. A. The pATM foci were scored either after 2 Gy+10 min (A) or 2Gy+ 1h min (B). Panel C represent the maximal number of pATM between the two corresponding values shown in panels A and B. The group of radiosensitivity is indicated in roman characters. For all the panels, each plot represents the mean \pm SEM of three independent replicates and open squares represent the mean \pm SD for each grade category.

Fig.6: Radiosensitivity is determined by both DSB recognition and repair data. A. The average values of the number of γ H2AX and pATM foci shown in Fig. 3B and Fig. 5C, respectively, were plotted together. B. The information shown in panel A was reproduced in squared confidence areas. C. By considering that the probability of belonging to a given group is proportional to the inverse of the corresponding confidence areas, the normalized incidence of each group is represented as bars. Dotted line corresponds to the Gaussian curve that provides the best data fit ($r=0.9$).

Fig.7 : A model explaining the ratio between the number of γ H2AX and pATM foci.

Acknowledgements

We thank the patients for their contribution. We thank Madame Beaufrère for her assistance in editing English and the Radiobiology Group staff. We are grateful to the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Electricité-de-France (Comité de Radioprotection), the Plan Cancer/AVIESAN «Micromegas project», the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

References

1. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 1996;36:1065-1075.
2. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncologica* 2001;40:702-711.
3. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001;61:223-231.
4. Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, Langer C, Murphy B, Cumberlin R, Coleman CN, Rubin P. CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:176-181.
5. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the radiation therapy oncology group (rtog) and the european organization for research and treatment of cancer (eortc). *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1995;31:1341-1346.
6. Ash D. Lessons from epinal. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:614-615.
7. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiation research* 1987;111:385-405.
8. Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, Foray N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *International Journal of Radiation Biology* 2008;84:1-19.
9. 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.
10. Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiation research* 1998;150:S80-91.
11. McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:37-55.
12. 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* 2003;22:2860-2871.
13. Lobrich M, Jeggo PA. The two edges of the atm sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* 2005;76:112-118.
14. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, Lopez-Otin C. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 2008;14:767-772.
15. Huo YK, Wang Z, Hong JH, Chessa L, McBride WH, Perlman SL, Gatti RA. Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, x-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer research* 1994;54:2544-2547.
16. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer genetics and cytogenetics* 1993;66:120-125.
17. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, Foray N. Mutations of the huntington's disease protein impact on the atm-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks:

- Corrective effect of statins and bisphosphonates. *Molecular neurobiology* 2014;49:1200-1211.
18. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1996;34:251-266.
 19. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol* 2013;333:135-145.
 20. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462-42467.
 21. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5057-5062.
 22. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone h2ax phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998;273:5858-5868.
 23. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
 24. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, Shaw CA. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981;39:395-408.
 25. 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* 1997;72:271-283.
 26. Foray N, Arlett CF, Malaise EP. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look. *Biochimie* 1997;79:567-575.
 27. Fertil B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1985;11:1699-1707.
 28. Cole J, Arlett CF, Green MH, Harcourt SA, Priestley A, Henderson L, Cole H, James SE, Richmond F. Comparative human cellular radiosensitivity: Ii. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (g0) t-lymphocytes, t-lymphocyte lines, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia-telangiectasia patients and from ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1988;54:929-943.
 29. Kushihiro J, Nakamura N, Kyoizumi S, Nishiki M, Dohi K, Akiyama M. Absence of correlations between radiosensitivities of human t-lymphocytes in g0 and skin fibroblasts in log phase. *Radiation research* 1990;122:326-332.
 30. Green MH, Arlett CF, Cole J, Harcourt SA, Priestley A, Waugh AP, Stephens G, Beare DM, Brown NA, Shun-Shin GA. Comparative human cellular radiosensitivity: Iii. Gamma-radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting t-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int J Radiat Biol* 1991;59:749-765.
 31. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Sivon SS, Guttenberger R, Callender DL, Malaise EP, Brock WA. Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer research* 1992;52:6348-6352.
 32. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719.
 33. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: How we have forgotten the evidence. *Radiology* 2012;264:627-631.

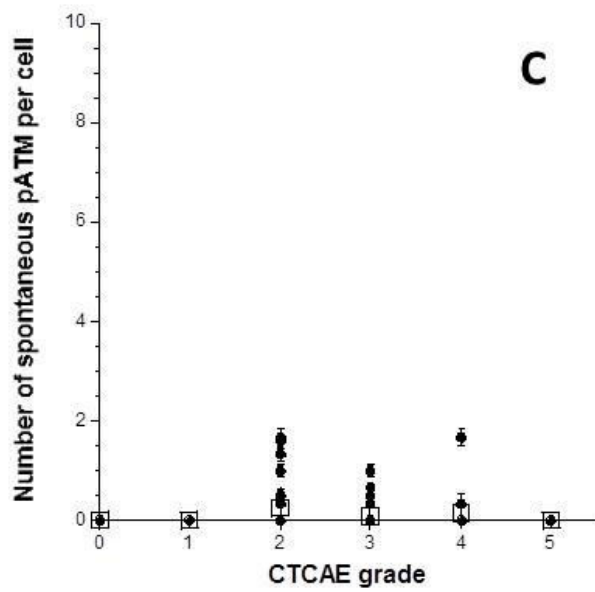
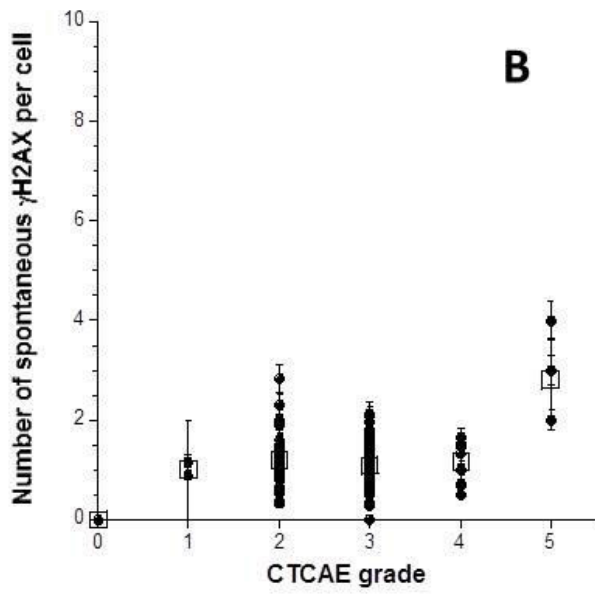
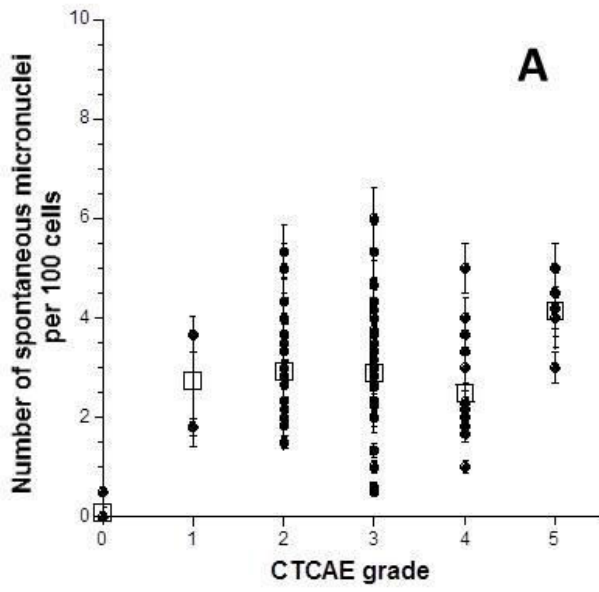


Fig. 1

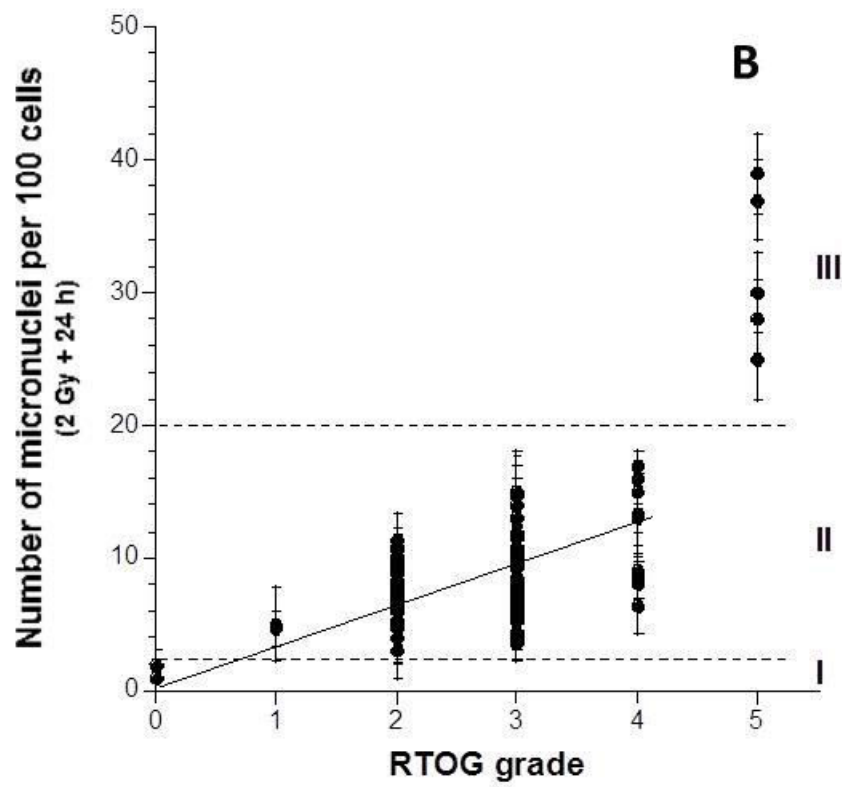
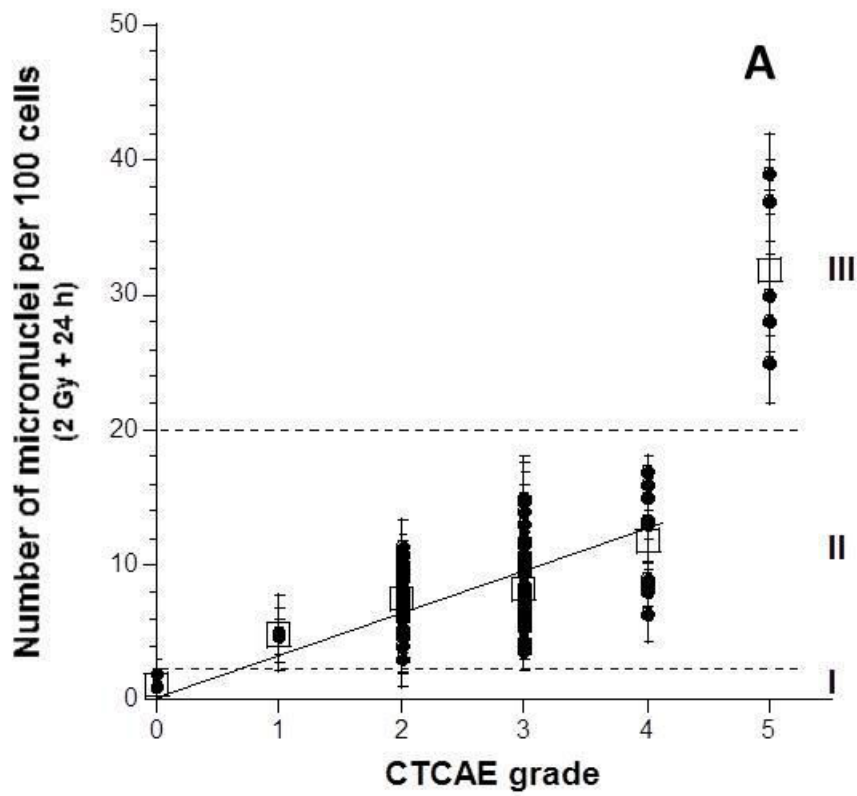


Fig. 2

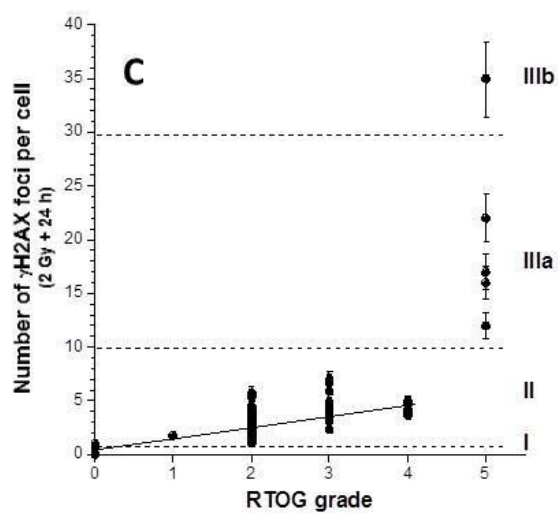
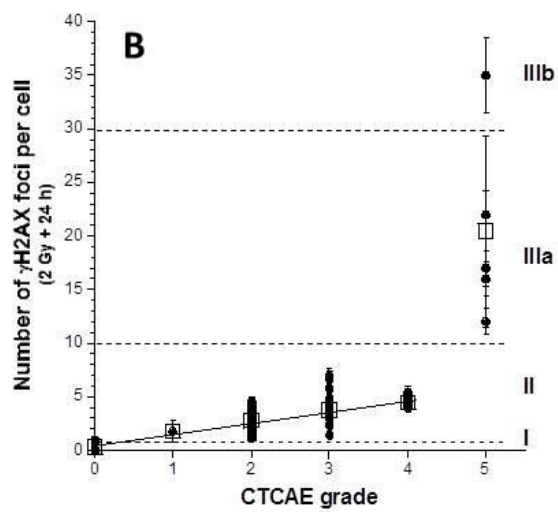
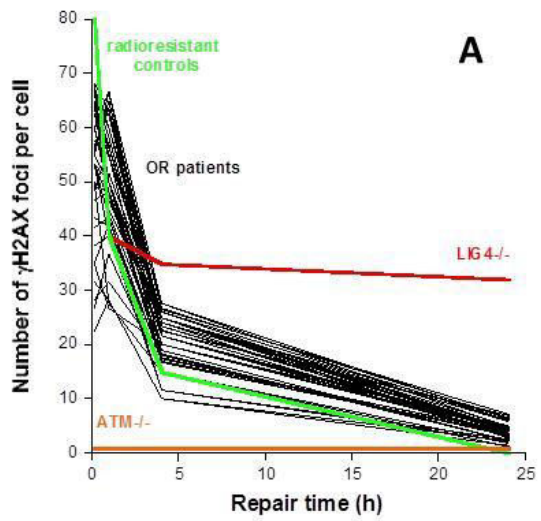


Fig. 3

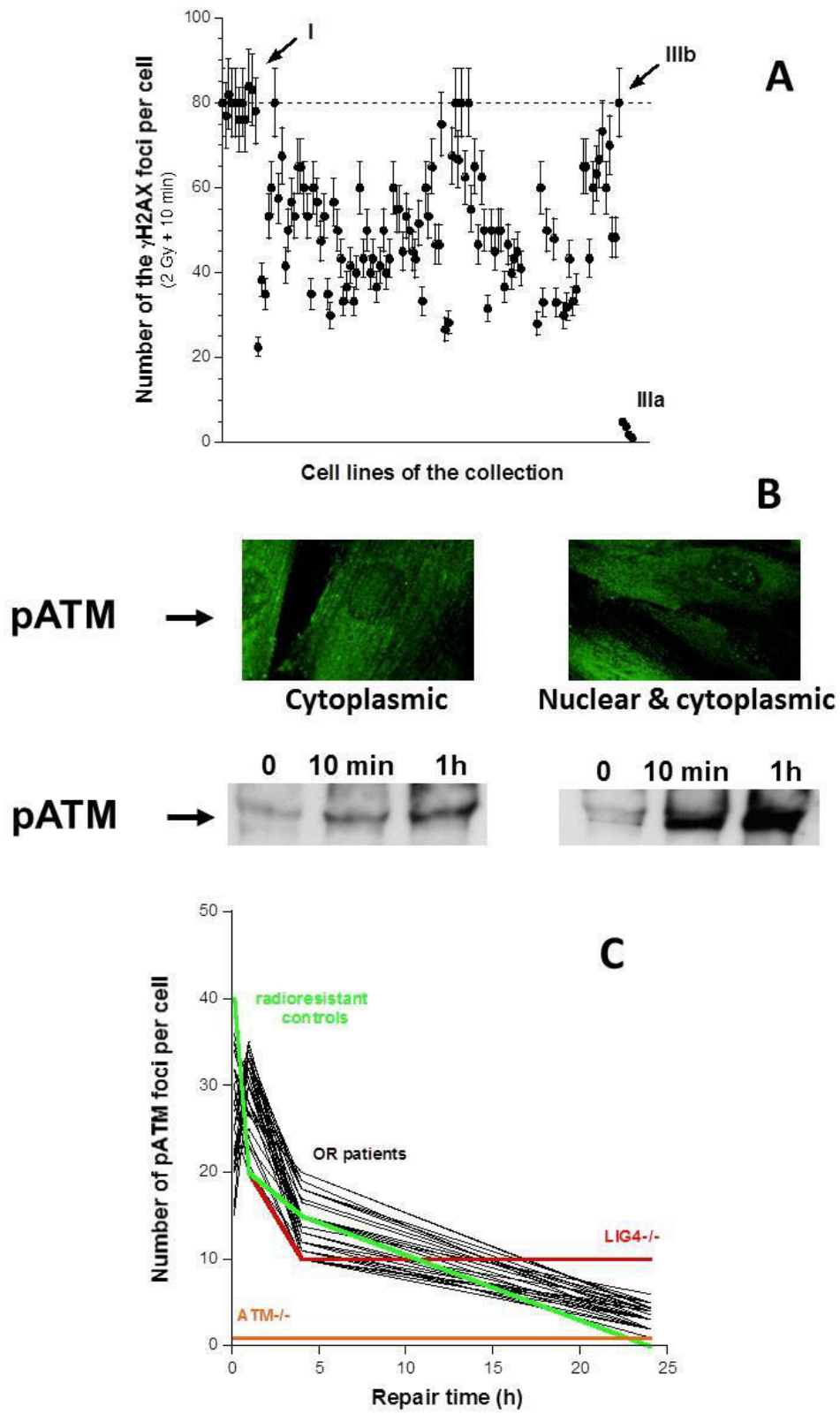


Fig. 4

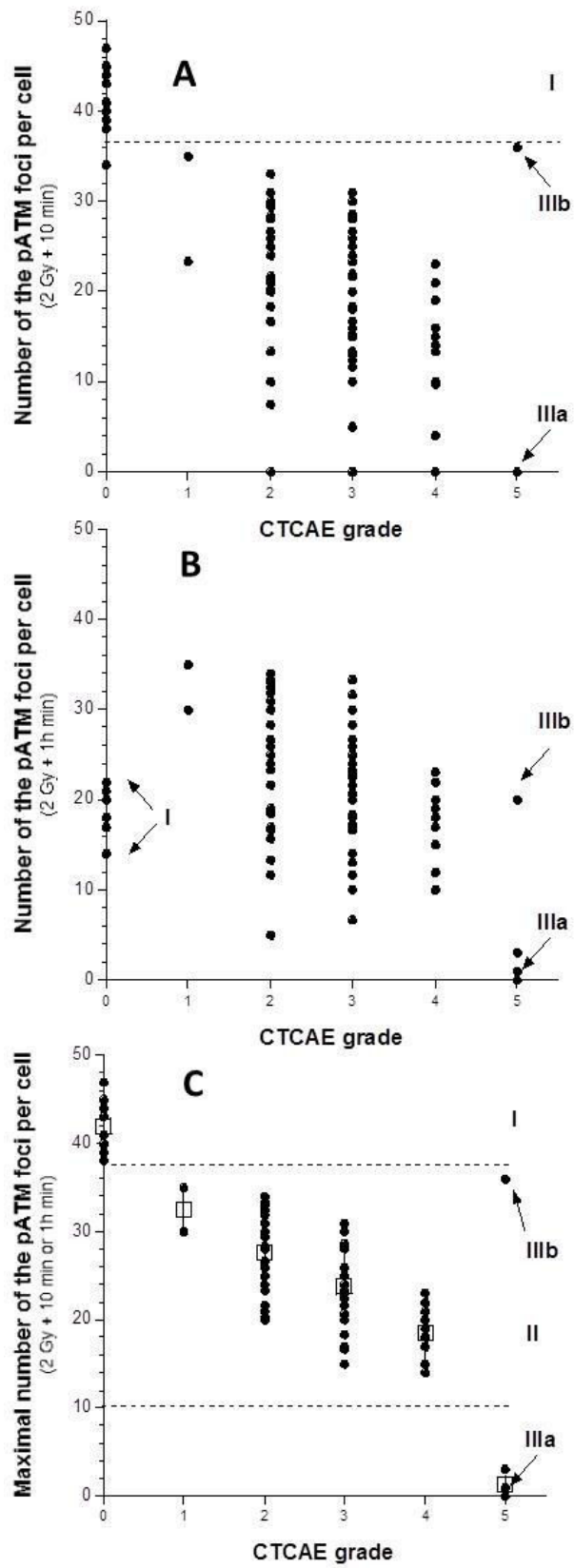


Fig. 5

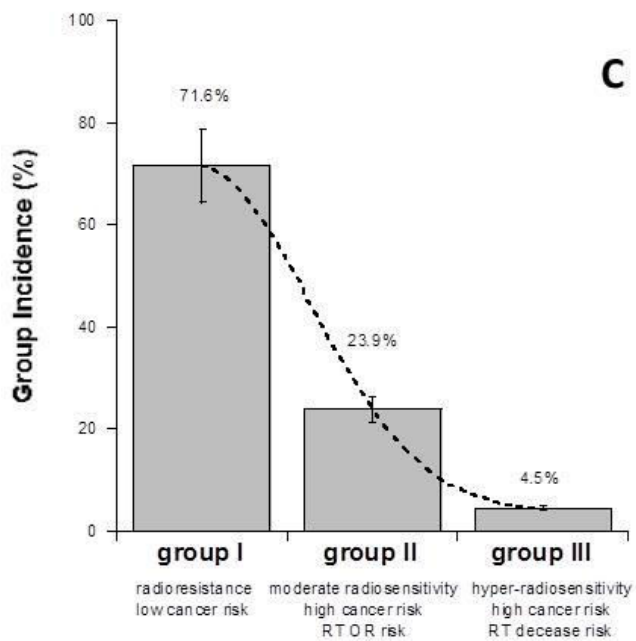
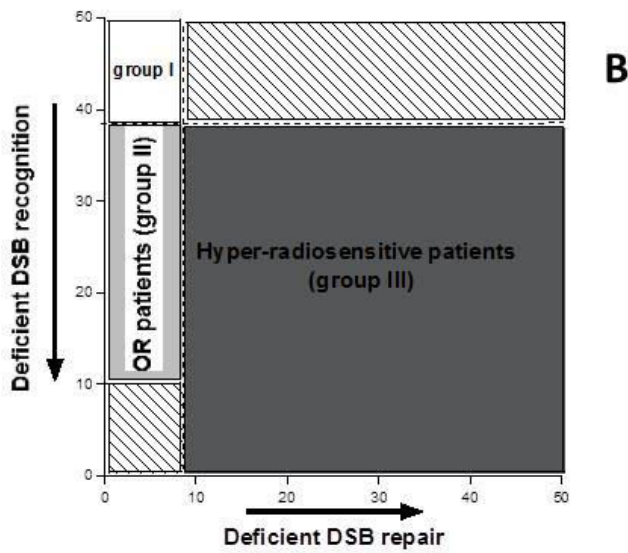
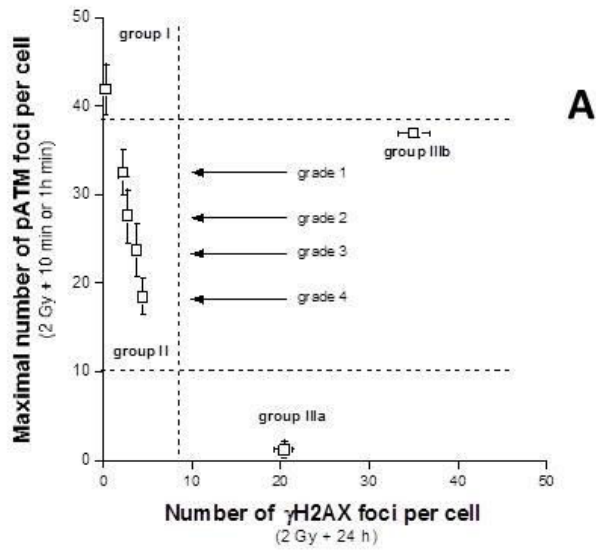
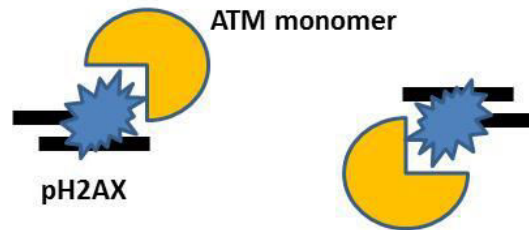


Fig.6

Step 1: DSB induction



Step 2: phosphorylation of H2AX by ATM monomer :
Formation of pH2AX foci



Step 3: DSB repair. ATM redimerization
And transphosphorylation :
Formation of pATM foci

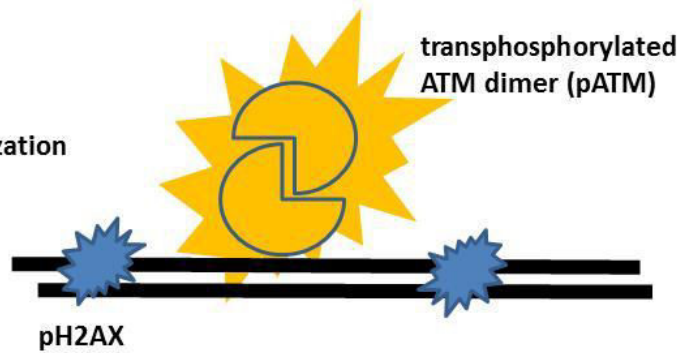


Fig.7

Annexe N°5

ARTICLE: 5

Prenylation inhibitors partially rescue normal ATM-dependent DNA repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome cells

Sandrine Pereira¹, Catherine Massart¹, Adeline Granzotto¹, Muriel Viau¹, Mélanie L. Ferlazzo¹, Clément Devic¹, Karim Malek³, Pierre Cau², Nicolas Lévy^{2,3*} and Nicolas Foray^{1,3*}

¹Inserm, UMR1052, Centre de Recherches en Cancérologie de Lyon, Lyon, France;

²Inserm, UMR-S 910, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 13385, Marseille, France;

³ Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 GRENOBLE cedex 9

³These two authors have contributed equally to the work

Running title: DSB repair in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

Keywords: progeria, DSB repair, radiosensitivity, prenylation

Pages: 28 and

Figures : 8

Table : 1

*Correspondence to: *Nicolas FORAY* – Groupe de radiobiologie, INSERM,

Email : nicolas.foray@inserm.fr

Summary

The Hutchinson-Gilford Progeria syndrome (HGPS), is a major premature ageing disease caused by a specific heterozygous mutation in the *LMNA* gene. This mutation leads to the production of progerin, a 50 amino-acids deleted prelamin A that keeps its farnesyl anchor. Recently, we provided evidence that the inhibition of the prenylation of progerin caused by pravastatin and zoledronate (ZoPra), partially rescued the aging phenotype and some defects in the repair of X-rays-induced DNA double-strand breaks (DSBs) in HGPS cell lines. Here, we examined the constitutive and the X-rays-induced phosphorylation of the major ATM substrates involved in the DSB repair and signalling pathways in HGPS fibroblasts. HGPS was found to be associated with an early impaired ATM kinase activity whose consequences are the lack of DSB recognition, the early inhibition of the DNA-PK kinase and the overactivation of the MRE11-dependent DSB repair pathway leading together to radiosensitivity and genomic instability. One of the cellular consequences of such inhibition is the impaired phosphorylation of CHK2. These phenotypes were partially or totally rescued by ZoPra. Our findings suggest that the presence of progerin impairs the nucleo-shuttling of ATM and reduces the activation of the ATM-dependent DNA repair and signalling pathways.

Introduction

Most of laminopathies are caused by mutations in the *LMNA* gene encoding A-type lamins that are the major components of the nuclear skeleton. Laminopathies consist in a wide spectrum of phenotypes ranging from tissue specific features to severe and systemic disorders generally classified as *premature ageing syndromes* (De Sandre-Giovannoli and Levy, 2006). Among them, the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is an exceedingly rare and devastating disorder, post-natally occurring and characterized by diverse clinical features including premature and accelerated ageing (Hennekam, 2006). The most common mutation identified in HGPS syndrome is a *de novo* heterozygous mutation of *LMNA* resulting in the activation of a cryptic splicing donor site in exon 11 leading to a subsequent deletion embarking the last 150 bp of exon 11 (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). The 50 aminoacids deleted prelamin A, called progerin, lacks the recognition site by and is not cleaved by the ZMPSTE24 protease and therefore retains the farnesylated cysteine residues. In HGPS cells, significant changes due to this *LMNA* mutation are observed in the nuclear shape: herniation of the nuclear envelope, thickening of the nuclear lamina, loss of peripheral heterochromatin, and clustering of nuclear pore complexes. All these changes have been related to an abnormal accumulation of progerin in the nuclear lamina associated to a decrease of normal soluble lamin A in the nuclear lamina and matrix (Navarro et al., 2006). Recently, some studies demonstrated that the abnormal association of progerin with membranes during mitosis impairs the targeting of the nuclear envelope components to daughter cell nuclei in the late telophase/early G1 phase. These defects likely lead to a deleterious impact on cell cycle progression (Dechat et al., 2007). Since the accumulation of such farnesylated forms of lamin A in the nuclear lamina impacts upon cell morphology and cell cycle, these observations lead to the hypothesis of the *toxicity* of progerin (Goldman et al., 2004).

The presence of progerin deregulates some p53-dependent pathways and some DNA damage processing machineries by impairing the recruitment of DNA repair factors at damage sites (e.g. (Liu et al., 2005). Varela et al. (2005) have notably demonstrated that accumulation of farnesylated prelamin A in *Zmpste24*-deficient fibroblast nuclei leads to the activation of some p53-dependent signalling pathways and to the over-expression of many essential p53 targets, causing a senescent cellular phenotype. Besides, *Zmpste24*^{-/-} x *p53*^{-/-} mice elicited a partially restored phenotype (Varela et al., 2005; Varela et al., 2008). Interestingly, p53 activation generally leads to deleterious effects on bone development, as it is commonly observed in HGPS (Zambetti et al., 2006). Since p53 activation is triggered by DNA damage (Burma et al., 1999; d'Adda di Fagagna et al., 2003), a particular focus has been made on DNA damage repair and signalling pathways in HGPS for the last past years (Table 1). Recent studies have notably shown that DNA double-strand breaks (DSB) typically accumulate in HGPS cells and that the resulting genome instability might contribute to premature aging (Liu et al., 2005; Manju et al., 2006). However, to the notable exception of references (di Masi et al., 2008; Liu et al., 2005), most studies about DNA repair and signalling in HGPS human cells concerned X-rays-induced DNA *single*-strand breaks (SSBs) or *spontaneous* DSBs (Table 1). Furthermore, a rapid overview of literature about progeroid syndromes indicates that few studies in human cells have been performed with X-rays, a very common DSB inducer (Table 1). Hence, the nature of DSB repair impairments that would be specific to the HGPS syndrome is still unknown and further investigations are therefore needed to elucidate the potential interplay between lamin A and DSB repair and signalling machinery.

Our understanding of the role of the DSB repair has considerably progressed all along these last years. DSBs are considered as the key-lesions for radiation-induced cell lethality and misrepaired radiation-induced DSBs are a source of genomic instability leading to cancer proneness (Harper and Elledge, 2007; Jeggo and Lobrich, 2007). We have recently demonstrated that the intrinsic radiosensitivity (i.e. the clonogenic survival assessed post-irradiation) is quantitatively correlated with

the yield of unrepaired DSBs: about 1-2 residual DSBs per cell are sufficient to cause death (Joubert and Foray, 2007; Joubert et al., 2008). Hence, our data based on the largest spectrum of radiosensitive human fibroblasts investigated demonstrate that even a few residual DSBs induce deleterious defects. One representative example of this apparent paradox is well illustrated by the case of *ataxia telangiectasia*, caused by mutations in the *ATM* gene, and considered as the most radiosensitive human syndrome: while showing hyper-radiosensitivity, the *ATM*-mutated fibroblasts elicit a small but significant number of unrepaired DSBs. In addition to this conclusion, our general study of human radiosensitivity showed that an MRE11-dependent recombination-like process may compensate some defects in the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway that is considered as the major DSB repair process in G0/G1 cells, but by increasing genomic instability through DSB misrepair (Foray et al., 1999; Joubert and Foray, 2007; Joubert et al., 2008).

In parallel to the investigations about DSB repair, our understanding in the DNA damage signalling pathways has considerably progressed, as well, especially about the role of the ATM kinase (Lobrich and Jeggo, 2005). It has been notably demonstrated that a functional and temporal hierarchy between *ATM*-dependent phosphorylation substrates occurs early after irradiation and conditions the success of DSB recognition, repair, cell cycle arrest and death steps. This is notably the case of γ -H2AX, pDNA-PK, MRE11, CHK2, BRCA1, p53, c-jun substrates (Foray et al., 2003). Hence, all these substrates act some minutes or hours post-irradiation and their kinetics of phosphorylation provide an evaluation of the functionality of each step of the DSB management process.

In a recent report, we have shown that the combination of pravastatin and zoledronate (ZoPra), two prenyl group synthesis inhibitors, block progerin prenylation (farnesylation as well as geranylgeranylation) and restore DSB repair impairments observed in X-rays-irradiated HGPS cell lines (Varela et

al., 2008). Here, we examined the kinetics of the X-rays-induced phosphorylation of the major ATM substrates in G0/G1 HGPS cells and evaluated the complementation provided by a ZoPra pre-treatment.

Results

Effect of ZoPra treatment on HGPS cells chromatin

Varela et al. (2008) have shown that the combination of pravastatin and zoledronate (ZoPra) leads to the accumulation of unfarnesylated progerin in the nucleoplasm of HGPS fibroblasts (Varela et al., 2008). To investigate further the effect of this treatment on the nuclear architecture of HGPS cells, chromatin state was analyzed. HP1 α protein is known to be involved in the chromatin organization maintenance and nuclear HP1 α foci may serve as quantifiable marker for decondensation chromatin (Luger and Hansen, 2005). However, since HP1 α foci may be frequently observed with a broad stained background, we considered only HP1 α foci as entities of 1 μ m only (see Material and methods). HP1 α was found to be relocalised as more numerous nuclear foci in HGPS fibroblasts (7 ± 3 per nucleus) than in control cells (2 ± 2 per nucleus) suggesting an abnormally decondensed chromatin ($p=0.05$). Interestingly, while the ZoPra treatment has no effect in control cells, it drastically reduced the number of HP1 α foci. Our preliminary data suggest that HP1 α foci may be a reliable sensor of DNA *single*-strand breaks (SSBs) (Fig. 1) (Viau et al., in preparation). It is noteworthy that similar data were obtained in another cell line denominated AG011498 (data not shown). Altogether, these data suggest that the significant constitutive genomic instability in HGPS cells, notably due to a chromatin decondensation, can be partially restored by the reduction of progerin farnesylation.

HGPS cells elicit impairment in the γ -H2AX-dependent DSB recognition process

After the observations on spontaneous DNA damage, we focused on the repair and signalling of *X-rays-induced* DSBs. In the 1BR3 radioresistant controls, the recognition and the repair rate of X-rays-induced DSBs were found in good agreement with previously published data showing 40 ± 4 γ -H2AX foci per cell per Gy 10 min after irradiation and 2 ± 2 residual γ -H2AX foci after 24 h post-irradiation (Joubert et al., 2008). In the HGPS fibroblasts, the number of γ -H2AX foci scored 10 min after irradiation in the HGPS cells was found lower than that assessed in the 1BR3 controls (35 ± 2 γ -H2AX foci per cell per Gy; $p < 0.05$), suggesting an impairment in the DSB recognition process (Fig. 2). Furthermore, the HGPS fibroblasts showed a slower DSB repair rate notably with a higher amount of persistent γ -H2AX foci after 2 Gy followed by 24 h post-irradiation (10 ± 2 γ -H2AX foci per cell) ($p < 0.03$) (Fig. 2).

While the ZoPra treatment did not alter the kinetics of γ -H2AX foci in 1BR3 cells ($p > 0.6$), the DSB repair defect observed in the HGPS cells was found to be similar to those of the 1BR3 controls ($p > 0.7$), suggesting that the treatment has permitted to alleviate both the impairment of DSB recognition and the impairment of the γ -H2AX-dependent repair (Fig. 2). All these conclusions were confirmed with the other HGPS cell line AG011498 (data not shown).

Altogether these results show that $14 \pm 3\%$ of X-rays induced DSBs remain unrepaired after 24 h post-irradiation in HGPS cells. Recently, we pointed out a quantified correlation between surviving fraction at 2Gy (SF2) and percentage of unrepaired DSBs assessed after 2 Gy followed by 24 h repair from a collection of 40 untransformed human fibroblasts showing a wide range of radiosensitivity (Joubert et al., 2008). If our γ -H2AX data are plotted against SF2 of GM01972 from (Weichselbaum et al., 1980) (Table 1), the plot is in very good agreement with the quantitative correlation published between clonogenic survival and DSB repair (Joubert et al., 2008) (Fig. 3). Furthermore, it suggests that, despite an apparently low yield of unrepaired DNA damage, radiosensitivity may be very significant. Lastly, the ZoPra treatment leads to an impressive radioprotection effect (Fig. 3).

HGPS cells elicit abnormal ATM and DNA-PK kinase activities

Since the ATM kinase was found to be both responsible for the early phosphorylation of H2AX and the radiation-induced activation of DNA-PK, an essential NHEJ factor, the above findings prompted us to examine the nuclear foci caused by the auto-phosphorylation of the ATM kinase (pATM) (You et al., 2007). In the 1BR3 controls, an exposure to 2 Gy X-rays resulted in an early nucleo-shuttling of the pATM forms and the formation of nuclear pATM foci: more than 40 pATM foci were observed at 10 min post-irradiation. This number progressively decreased with repair time to reach 5.4 ± 2 pATM foci per cell at 24 h post-irradiation. In the HGPS fibroblasts, the pATM forms were localised in cytoplasm essentially. Conversely, no significant difference was observed between the kinetics of appearance and disappearance of pATM foci in the HGPS and 1BR3 cells from 1 to 24 h post-irradiation ($p > 0.5$) (Fig. 4).

The ZoPra treatment did not significantly affect the kinetics of pATM foci in the 1BR3 controls, whatever the time post-irradiation ($p > 0.7$), nor in the HGPS cells in the 1-24 h post-irradiation range ($p > 0.8$). However, it is noteworthy that the number of pATM foci assessed 10 min after irradiation increased drastically from 6 ± 5 in untreated HGPS cells to 24 ± 5 in ZoPra treated HGPS cells (Fig. 4). This last result strongly suggests that the ZoPra treatment partially restores the early inhibition of the ATM kinase activity observed in the HGPS cells. We hypothesized therefore that such partial restoration of ATM kinase activity that occurs early after irradiation may be sufficient to rescue the early H2AX phosphorylation and consequently, the DSB recognition. Similar conclusions were obtained with the other HGPS cell line AG011498 (data not shown).

The DNA-PK auto-phosphorylation (pDNA-PK) has been demonstrated to be required for the NHEJ process and can be used as an indicator of the DNA-PK kinase activity (Joubert et al., 2008). From 40 different human cell lines, our previous findings indicate a nearly one-to-one correlation between γ -H2AX and pDNA-PK foci in normal cells (Joubert et al., 2008). We investigated therefore the formation

and the disappearance of pDNA-PK foci in the HGPS cells. The pDNA-PK data were found similar to that of γ -H2AX foci in the 1BR3 cells, in agreement with previous reports (Joubert et al. 2008). By contrast, the number of pDNA-PK foci scored 10 min after irradiation in the HGPS fibroblasts was found significantly lower than that observed in the 1BR3 controls ($p < 0.001$). This number was also significantly lower than that of γ -H2AX foci assessed in the HGPS fibroblasts ($p < 0.0001$) (Fig. 5). At 1 h post-irradiation, the number of pDNA-PK foci became similar to that of γ -H2AX foci assessed in the HGPS cells. The rate of pDNA-PK foci disappearance remained however slower than that of the 1BR3 controls from 1 h up to 24 h post-irradiation (Fig. 5). Such pDNA-PK data suggest therefore that the DNA-PK kinase activity required for a normal NHEJ process is impaired in the HGPS fibroblasts tested.

Similarly to what was observed with γ -H2AX data, the ZoPra treatment did not alter the kinetic of pDNA-PK foci in the 1BR3 cells ($p > 0.7$). Conversely, the early activation of the DNA-PK kinase was partially recovered with an amount of DSB assessed 10 min after irradiation of 29 ± 7 pDNA-PK foci per HGPS cell (10 ± 0.5 per untreated HGPS cells) (Fig. 5). Altogether, our findings demonstrate a reduction of the ATM kinase activity in the HGPS cells, which impairs DSB recognition and repair *via* the DNA-PK-dependent NHEJ process.

HGPS cells elicit abnormally high MRE11 activity

The ATM kinase was also shown to interact with a number of proteins substrates involved in the DSB repair pathways. This is notably the case of MRE11 protein, a component of the RAD50-MRE11-NBS1 complex that forms nuclear foci after genotoxic stress (Lavin, 2007). Some authors have proposed that MRE11 participates to the NHEJ pathway, notably on the basis of *co-immunofluorescence* observations showing that MRE11 and γ -H2AX co-localize early after irradiation. However, the involvement of MRE11 in the NHEJ process is still controversial (Di Virgilio and Gautier, 2005). Furthermore, our recent findings

supported that co-immunofluorescence of γ -H2AX and MRE11 may introduce biases due to *the bleed-through* fluorescence phenomenon: in fact, the kinetic of MRE11 foci after 2 Gy X-rays is clearly different from that of γ -H2AX foci (Renier et al., 2007). We investigated therefore the occurrence of MRE11 foci in the HGPS fibroblasts. The MRE11 foci in the 1BR3 controls appeared from 2 to 8 h after 2 Gy X-rays and reached their maximal yield at 4 h post-irradiation (Fig. 6). The HGPS fibroblasts showed more MRE11 foci per cell than the 1BR3 controls in the 10 min - 8 h post-irradiation time range, suggesting a deregulation of the MRE11-dependent pathway maybe due to the early impairments observed with γ -H2AX, pDNA-PK and pATM data.

The ZoPra treatment was shown to decrease the differences between the kinetics of appearance/disappearance of MRE11 foci in the HGPS and the 1BR3 cells: only the 1 h data were found different significantly ($p < 0.05$) (Fig. 6). Altogether, our findings indicate that the HGPS cells elicit an over-activation of the MRE11-dependent DSB repair pathway, suggesting a more important ratio of mis-repaired DSBs and a higher genomic instability. Similar conclusions were obtained with the other HGPS cell line, AG011498 (data not shown).

HGPS cells elicit abnormal phosphorylation of some ATM substrates such as CHK2

ATM phosphorylates a number of substrates involved in DNA repair, cell cycle checkpoints and cellular death pathways substrates (for reviews see Khanna *et al.*, 2001; Lavin and Khanna, 1999; Shiloh, 2001). Particularly, CHK2, that is required in the G1 checkpoint, relocalised after irradiation as nuclear foci (Rainey et al., 2008). The immunofluorescence signals with antibodies against the phospho-CHK2^{thr68} (pCHK2) forms were found significantly lower in the HGPS cells than in the 1BR3 fibroblasts. Whether after 2 Gy (data not shown) or 15 Gy (Fig. 7), no significant pCHK2 foci appeared in the HGPS fibroblasts whereas they were systematically present in the irradiated 1BR3 controls.

The ZoPra treatment did not modify significantly the relocalisation of pCHK2 forms in the 1BR3

fibroblasts, whether irradiated or no. Conversely, the ZoPra treatment strongly increased the number of pCHK2 immunofluorescence signals in irradiated HGPS cells (Fig. 7). This result was also confirmed by western blotting (data not shown). Similar conclusions were also reached with other ATM substrates like BRCA1, p-p53^{ser15} and p-c-jun (data not shown).

Discussion

HGPS is associated with radiosensitivity and NHEJ defect

Despite some discrepancies, progeroid syndromes have long been known to be radiosensitive (Table 1). Their radiosensitivity was systematically found higher than radioresistant controls but lower than that of ataxia telangiectasia, the genetic disease associated with the highest radiosensitivity in humans (Table 1) (Joubert et al., 2008). Here, the number of radiation-induced γ -H2AX foci scored immediately after irradiation in HGPS fibroblasts was significantly higher than that of the 1BR3 controls but systematically lower than the most radiosensitive human cells such as the *ATM*- or *LIG4*-mutated fibroblasts (Joubert et al., 2008) (Fig.3). Hence, our data strongly suggest that the HGPS syndrome belongs to lower limit of the group of genetic syndromes associated with *moderate* radiosensitivity, in very good agreement with a number of papers published in the eighties (see references in Table 1). Such syndromes are notably characterised by a reduced ATM kinase activity leading to an impairment of both the DSB recognition step and the DNA-PK-dependent rejoining step (Joubert et al., 2008). Here, the γ -H2AX, pDNA-PK and pATM data from HGPS cells are very consistent with such phenotypes.

HGPS is associated with genomic instability and uncontrolled MRE11-dependent pathway

As shown in Fig. 6, the number of MRE11 foci was particularly high and their occurrence was much earlier than in the radioresistant controls. We previously proposed that abnormally high number of MRE11 foci reflects hyperrecombination phenomenon that may lead to genomic instability and misrepaired DSBs (Joubert et al., 2008), in very good agreement with chromosomal aberrations observed routinely in the HGPS cells (Table 1). This hypothesis is also in agreement with the RAD51 data of Liu et al. (2005) (Liu et al., 2005). However, although the radiation-induced relocalization of RAD51 was found to be impaired in the HGPS cells, it is noteworthy that the RAD51 protein is more likely involved in the homologous recombination process, a DSB repair pathway only active in S-G2/M (Joubert et al., 2008). In this report, the cells are in G0/G1 mainly. Liu et al. (2005) also investigated the co-localisation of 53BP1 and γ -H2AX foci after X-rays irradiation (Liu et al., 2005). However, it must be stressed that the co-immunofluorescence of green-red markers may introduce biases in the data interpretation, notably when γ -H2AX antibodies are used (Renier et al., 2007). Furthermore, there is no one-to-one correlation between 53BP1 and γ -H2AX foci in normal human fibroblasts all along the repair of X-rays induced DSBs (Joubert et al., 2008). Here, our findings support a model for quiescent HGPS fibroblasts in which the impairment of the early ATM activity may lead to a slight defect of the NHEJ DSB repair pathway (less recognized DSBs by H2AX phosphorylation and more residual γ -H2AX foci) and to genomic instability (more MRE11 foci). Further investigations are needed to complete this model for proliferating cells, notably with the impact of the ATR protein (Liu et al., 2006).

HGPS is associated with abnormal chromatin decondensation

High MRE11 nuclease activity is frequently associated with spontaneous DNA damage, chromatin decondensation and particularly large nuclei. This is notably the case of some cases of *Xeroderma pigmentosum*, Bloom's syndrome and Fanconi Anemia (Puvion-Dutilleul and Sarrazin, 1987; Joubert et al., 2008). Interestingly, our HP1 α data suggest also an abnormal chromatin decondensation in HGPS cells. Progerin has been demonstrated to cause nuclear envelope alterations and chromatin disorganization, both in cells from HGPS patients and in animal models (Filesi et al., 2005). Interestingly, heterochromatin (HC) is the most severely affected part of chromatin in premature ageing laminopathies (Bergo et al., 2002). This is consistent with the straight links that exist between HC, nuclear *lamina* and the inner nuclear membrane. Furthermore, the HGPS cells display altered histone modification patterns, including reduced heterochromatin-specific trimethylation of Lysine 9 from histone H3 (Tri-Me-K9H3) and an altered association with HP1 α) (Liu et al., 2005). Non-farnesylated prelamin A causes the redistribution of LAP2 α , HP1 α and Tri-Me-K9H3, and triggered heterochromatin localization in the nuclear interior. In contrast, the farnesylated lamin A precursor accumulates at the nuclear periphery and causes loss of heterochromatin markers and LAP2 α in enlarged nuclei (Goldman et al., 2004; Lattanzi et al., 2007; Scaffidi and Misteli, 2005). Such chromatin impairment may therefore contribute to make more difficult the DSB recognition and repair processed.

A link between ageing, nuclear import and DNA repair?

Although the effect of ageing on many cellular processes has been investigated, little information is available regarding nuclear import of DNA repair factors and ageing-related DNA damage. Some authors have pointed an age-reduction of nuclear import proteins in human fibroblasts (32, 34) and in some pathologic conditions, impairment of nuclear import could be associated with accumulation of DNA damage (33).

Indeed a relationship between progeroid syndromes and DNA damage is clearly now established.

Di Masi and collaborators have shown that accumulation of the lamin A precursor protein determines a defect in DNA damage response after X-ray exposure in Mandibuloacral dysplasia type A (MADA; OMIM # 248370) another premature ageing disease (15).

In this study we showed in HGPS cells that accumulation of progerin led to an impairment of DNA repair processes associated with a defect in ATM nucleo-shuttling. Some authors have shown that a prenylation mutant of lamin A co-localizes with the nuclear pore complex proteins, including Nup53 and Nup98 (35). The impact of prenylated prelamin A on the ATM nucleo-shuttling may be due to its association with and/or its accumulation at the nuclear pore complex.

As evoked in Introduction, we previously provided evidence of a functional and temporal hierarchy between ATM-dependent phosphorylation substrates that would conditions the success of DSB recognition, repair, cell cycle arrests and death pathways (Foray et al., 2003). Hence, since ATM kinase activity was found impaired in HGPS cells, it was not surprising to observe impaired phosphorylation of BRCA1, p53, CHK2 and c-jun. Particularly, impaired CHK2 phosphorylation and expression may explain cell cycle features commonly observed in progeroid syndromes. Furthermore, impaired c-jun phosphorylation may explain the absence of apoptotic bodies and highlights the predominance of senescence and mitotic death with micronuclei in the HGPS cells (data not shown). Lastly, we provide evidence that the ZoPra treatment partially restores some DNA damage repair and signalling steps in the HGPS cells, which was not the case with FTI treatment (36). Altogether, the biological consequences of impaired phosphorylations of various ATM substrates made the HGPS syndrome as a very severe and pleiotropic disease.

A tentative model explaining the impairments of DSB repair and signalling in HGPS cells

How to explain the action of lamins A onto ATM? In radioresistant controls, the ATM auto-phosphorylation signals revealed an important number of active ATM forms already present in cytosol. In the first minutes post-irradiation, ATM relocates as nuclear foci, suggesting a significant nucleo-shuttling of this protein caused by X-rays. Recently, we have observed the neurofibromin, a cytoplasmic protein whose mutations cause neurofibromatosis type I translocates into nucleus in response to X-rays exposure and is required for a normal nucleo-shuttling of ATM (Bencokova et al., submitted). We hypothesize here those alterations in lamins A may prevent or, at least, delay the nucleo-shuttling of active ATM forms required for a normal radiation response. In the case of mutations of *LMNA* causing insoluble fractions of lamin A, the biological consequences may be very similar to mutations of ATM gene itself. An alternative but not exclusive explanation could be that impairment of lamin and nuclear membrane elasticity impact upon chromatin by favouring its decondensation. Obviously, further experiments are needed to consolidate these two explanations that may be complementary.

Conclusions

As suggested by previous publications in the eighties, progeroid syndromes belong to the group of radiosensitive diseases. With the present data, we have provided elements to better understand the impairments in the DSB repair and signalling pathways observed specifically in HGPS cells and that are at the origin of the genomic instability and ageing of this syndrome. Furthermore, the rescue of some molecular and cellular phenotypes due to the ZoPra treatment suggest also that the nuclear forms of the ATM kinase plays a major role in the management of the DNA damage,

whether spontaneous or X-ray-induced, that are observed in the HGPS cells. Finally, all these data put in light the benefit of ZoPra treatment on DNA damage repair pathways.

Materials and methods

Cell lines and ZoPra treatment.

Untransformed fibroblast cell lines were chosen for their genomic stability and to avoid any confounding effects of immortalization. The 1BR3 untransformed fibroblast cell line provided from a skin biopsy of a young adult apparently healthy was used as radioresistant control. The radiobiological features of the 1BR3 cell line were abundantly reported (Foray et al., 1997; Joubert et al., 2008). The AG01972 and the AG011498 HGPS fibroblast cell lines were purchased from the Coriell Cell Repositories (Camden, USA) and hold a G608G mutation in the *LMNA* gene. Cells were routinely cultured as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells at passages 14, 16, 18 and 22 in plateau phase of growth (95 - 99 % of cells in G0/G1) to overcome any bias generated by cell cycle.

The ZoPra treatment was applied as previously published (Varela et al., 2008). Briefly, cells were incubated with 1 μ M pravastatin (Sigma-Aldrich France, France) in PBS for 24 h at 37°C. Thereafter, 1 μ M zoledronate (Novartis, France) in PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37°C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

X-rays irradiations

A Philips X-ray clinical irradiator devoted to research was used to perform all the irradiations. The X-ray 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 $1.234 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ (Joubert et al., 2005). Culture medium was changed before irradiation. Incubation at 37°C was applied immediately after irradiation.

Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol employed for DNA repair and signalling actors was described elsewhere (Foray et al., 2003). Briefly, cells were fixed in 3% paraformaldehyde 2% sucrose PBS for 15 min at room temperature and permeabilized in 20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 300 mM sucrose 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 3 min. Thereafter, coverslips were washed in PBS prior to immunostaining. Primary antibody incubations were performed for 40 min at 37°C in PBS supplemented with 2% bovine serum fraction V albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and followed by PBS washing. Anti-pH2AX^{ser139} antibodies were provided by Upstate Biotechnology (Euromedex) and were used at 1:800. Anti- pDNA-PK^{thr2609} (#ab4194; Abcam), -pATM^{ser1981} (#ab81292; Abcam, -pCHK2^{thr68} (#ab32055; Abcam), p-p53^{ser15} (#ab1431; Abcam), -BRCA1 (#Ab1; Merck Chemicals - Oncogene Research, Nottingham, UK) and -MRE11 (#56211; Abcys, Paris, France), -HP1 α (#15.19s2; Millipore SAS-France, Saint-Quentin-Yvelines, France) were used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6' Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys) and examined with Olympus fluorescence microscope. Two hundreds nuclei per condition were analyzed. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G_1 cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), S cells

(nuclei showing numerous pH2AX foci), G₂ cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes) (Joubert et al., 2008). It is noteworthy that in our conditions, the ATM and DNA-PK kinases that phosphorylate the H2AX histones require some minutes post-irradiation to be fully active. Consequently, the earliest time post-irradiation was fixed at 10 min, in agreement with previous reports (Joubert et al., 2008). The quantification of foci was performed by eye-scoring and verified by semi-automatic scoring Cell^F software from Soft Imaging System GmbH, (Münster, Germany) that permits to quantify nuclei and foci size. By convention, only HP1α⁺ larger than 1μm were considered.

Data fitting

The number of DSB as a function of repair time DSB repair data were fitted to the following formula described previously $N(t) = N(0) \left(\frac{1}{1 + \alpha t} \right)^{\beta}$ with (α, β) representing adjustable parameters and $N(t)$ and $N(0)$ representing the number of DSB at time t and time 0 (Foray et al., 2005; Gastaldo et al., 2008).

Acknowledgements

This work was 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 Ligue contre le Cancer, the ETOILE Project (Région Rhône-Alpes and Lyon University), the Institut National du Cancer (INCA), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-France, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Association Française contre les

Myopathies and the European Union (FP6 Eurolaminopathies). All the irradiation experiments have been performed at the biomedical facility of European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) (Grenoble, France).

References

- Arlett, C. F. and Harcourt, S. A.** (1980). Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res* **40**, 926-32.
- Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y. et al.** (2002). Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13049-54.
- Burma, S., Kurimasa, A., Xie, G., Taya, Y., Araki, R., Abe, M., Crissman, H. A., Ouyang, H., Li, G. C. and Chen, D. J.** (1999). DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem* **274**, 17139-43.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. and Jackson, S. P.** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-8.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Merrer, M. et al.** (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **300**, 2055.
- De Sandre-Giovannoli, A. and Levy, N.** (2006). Altered splicing in prelamin A-associated premature aging phenotypes. *Prog Mol Subcell Biol* **44**, 199-232.
- Dechat, T., Shimi, T., Adam, S. A., Rusinol, A. E., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Sinensky, M. S. and Goldman, R. D.** (2007). Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4955-60.
- di Masi, A., D'Apice, M. R., Ricordy, R., Tanzarella, C. and Novelli, G.** (2008). The R527H mutation in LMNA gene causes an increased sensitivity to ionizing radiation. *Cell Cycle* **7**, 2030-7.
- Di Virgilio, M. and Gautier, J.** (2005). Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J Cell Biol* **171**, 765-71.

Epstein, J., Williams, J. R. and Little, J. B. (1973). Deficient DNA repair in human progeroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 977-81.

Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P. et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**, 293-8.

Filesi, I., Gullotta, F., Lattanzi, G., D'Apice, M. R., Capanni, C., Nardone, A. M., Columbaro, M., Scarano, G., Mattioli, E., Sabatelli, P. et al. (2005). Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics* **23**, 150-8.

Foray, N., Charvet, A. M., Duchemin, D., Favaudon, V. and Lavalette, D. (2005). The repair rate of radiation-induced DNA damage: a stochastic interpretation based on the gamma function. *J Theor Biol* **236**, 448-58.

Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A. M., Perricaudet, M., Ashworth, A. and Jeggo, P. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* **22**, 2860-71.

Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E. P., Arlett, C. F. and Malaise, E. P. (1997). Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* **72**, 271-83.

Foray, N., Arlett, C. F. and Malaise, E. P. (1999). Underestimation of the small residual damage when measuring DNA double-strand breaks (DSB): is the repair of radiation-induced DSB complete? *Int J Radiat Biol* **75**, 1589-95.

Gastaldo, J., Viau, M., Bouchot, M., Joubert, A., Charvet, A. M. and Foray, N. (2008). Induction and repair rate of DNA damage: a unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals. *J Theor Biol* **251**, 68-81.

Goldman, R. D., Shumaker, D. K., Erdos, M. R., Eriksson, M., Goldman, A. E., Gordon, L. B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. et al. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8963-8.

Harper, J. W. and Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-45.

Hennekam, R. C. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* **140**, 2603-24.

Jeggo, P. A. and Lobrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* **26**, 7717-9.

Joubert, A., Biston, M. C., Boudou, C., Ravanat, J. L., Brochard, T., Charvet, A. M., Esteve, F., Balosso, J. and Foray, N. (2005). 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**, 1486-96.

Joubert, A. and Foray, N. (2007). [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother* **11**, 129-42.

Joubert, A., Gamo, K., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Rénier, W., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C. and Foray, N. (2008). DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *International Journal of Radiation Biology* **84**, 1-19.

Lattanzi, G., Columbaro, M., Mattioli, E., Cenni, V., Camozzi, D., Wehnert, M., Santi, S., Riccio, M., Del Coco, R., Maraldi, N. M. et al. (2007). Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *J Cell Biochem* **102**, 1149-59.

Lavin, M. F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**, 7749-58.

Little, J. B., Epstein, J. and Williams, J. R. (1975). Repair of DNA strand breaks in progeric fibroblasts and aging human diploid cells. *Basic Life Sci* **5B**, 793-800.

Liu, B., Wang, J., Chan, K. M., Tjia, W. M., Deng, W., Guan, X., Huang, J. D., Li, K. M., Chau, P. Y., Chen, D. J. et al. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* **11**, 780-5.

Liu, Y., Rusinol, A., Sinensky, M., Wang, Y. and Zou, Y. (2006). DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci* **119**, 4644-9.

Liu, Y., Wang, Y., Rusinol, A. E., Sinensky, M. S., Liu, J., Shell, S. M. and Zou, Y. (2008). Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Faseb J* **22**, 603-11.

Lobrich, M. and Jeggo, P. A. (2005). The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother Oncol* **76**, 112-8.

Luger, K. and Hansen, J. C. (2005). Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 188-96.

Manju, K., Muralikrishna, B. and Parnaik, V. K. (2006). Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci* **119**, 2704-14.

Navarro, C. L., Cau, P. and Levy, N. (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R151-61.

Puvion-Dutilleul, F., and Sarasin, A. (1987) Chromatin and nucleolar changes in Xeroderma pigmentosum cells resemble aging-related nuclear events. *Mutat. Res.* **219**, 57-70.

Rainey, M. D., Black, E. J., Zachos, G. and Gillespie, D. A. (2008). Chk2 is required for optimal mitotic delay in response to irradiation-induced DNA damage incurred in G2 phase. *Oncogene* **27**, 896-906.

Renier, W., Joubert, A., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Massart, C. and Foray, N. (2007). Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int J Radiat Biol* **83**, 543-9.

Scaffidi, P. and Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* **11**, 440-5.

Varela, I., Cadinanos, J., Pendas, A. M., Gutierrez-Fernandez, A., Folgueras, A. R., Sanchez, L. M., Zhou, Z., Rodriguez, F. J., Stewart, C. L., Vega, J. A. et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**, 564-8.

Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A. P., Navarro, C. L., Suarez, M. F., Cau, P., Cadinanos, J., Osorio, F. G., Foray, N., Cobo, J. et al. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* **14**, 767-72.

Weichselbaum, R. R., Nove, J. and Little, J. B. (1980). X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res* **40**, 920-5.

You, Z., Bailis, J. M., Johnson, S. A., Dilworth, S. M. and Hunter, T. (2007). Rapid activation of ATM on DNA flanking double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **9**, 1311-8.

Zambetti, G. P., Horwitz, E. M. and Schipani, E. (2006). Skeletons in the p53 tumor suppressor closet: genetic evidence that p53 blocks bone differentiation and development. *J Cell Biol* **172**, 795-7.

Table 1 : Investigations of radiosensitivity and X-rays-induced DNA repair and signalling in human HGPS fibroblasts

References	Molecular and cellular endpoint investigated	Stress type	Cell lines	Conclusions
(Weichselbaum et al., 1980)	Intrinsic radiosensitivity <i>Intrinsic radiosensitivity</i>	2-8 Gy X-rays	7 cell lines incl. AG1972	D_0 between 0.96 and 1.39 Gy ^{-1a}
(Arlett and Harcourt, 1980)		1-10 Gy γ -rays Co ⁶⁰	1 cell line (PRO1PV)	$D_0 = 0.96$ Gy ^{-1a}
(Epstein et al., 1973)	SSB repair and signalling <i>SSB repair and signalling</i>	100 Gy γ -rays Co ⁶⁰	1 cell line (KH)	SSB repair 3-4 times slower in HGPS cells
(Little et al., 1975)		100 Gy γ -rays Co ⁶⁰	6 cell lines	Wide spectrum of responses. Normal repair was seen in SV40-transformed progeric fibroblasts.
(Liu et al., 2005)	DSB repair and signalling γ -H2AX and 53BP1 foci RAD51 foci	5 Gy γ -rays+ 10min-12 h	1 cell line (AG11513A)	Abnormal early colocalization between 53BP1 and pH2AX and persistence of foci after 12 h
		5 Gy γ -rays+ 10min-24 h	1 cell line (AG11513A)	Less RAD51 foci after 2 and 6 h Impaired localization and foci pattern

(Liu et al., 2006)		no stress	1 cell line (AG11513A)	Impaired phosphorylation
	ATM, ATR localization	no stress	1 cell line (AG11513A)	
	Phosphorylation of p53, CHK2, Chk1, γ -H2AX			impaired co-localizations in HGPS cells
(Liu et al., 2008)	rad50 and γ -H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	rad51 and γ -H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPA and γ -H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPC and γ -H2AX	no stress	1 cell line (AG11513A)	impaired co-localizations in HGPS cells
	XPA and γ -H2AX	4 μ M camptothecin	1 cell line (AG11513A)	
				Nuclear foci in untreated MADA cells
		2 Gy X-rays + 30 min	1 cell line (MADA)	Less foci after 30 min but more after 24 h
(di Masi et al., 2008)	p-ATM	1 Gy X-rays + 30min-24 h	1 cell line (MADA)	No change after X-rays but phosphorylated levels higher than in controls
	γ -H2AX	4 Gy X-rays + 2 h	1 cell line (MADA)	
	p-p53 (western blot)			Impaired γ -H2AX kinetics partially rescued by the ZoPra treatment
(Varela et al., 2008)	γ -H2AX foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h w/o ZoPra treatment	1 cell line (AG1972)	Spontaneous DSBs but no recognized induced DSBs
				Early inhibition of ATM kinase
This study	γ -H2AX foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Early inhibition of DNA-PK kinase
	p-ATM foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Abnormal activation of MRE11
	p-DNA-PK foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Inhibition of CHK2 phosphorylation

MRE11 foci	2 Gy X-rays 10 min-24 h	1 cell line (AG1972)	Differential rescue after ZoPra treatment
p-CHK2 foci	2 and 15 Gy X-rays 4 h w/o ZoPra treatment	1 cell line (AG1972)	

^aEquivalent to a surviving fractions at 2 Gy (SF2) between 10 and 50% (SF2 of radioresistant fibroblasts is generally higher than 50%)

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: The ZoPra treatment restores chromatin condensation in HGPS cells.

Chromatin decondensation, can be partially restored by the reduction of farnesylation of progerin.

Spontaneous HP1 α foci (green) in untreated or treated HGPS and 1BR3 cells. Scale bars represent 2 μ m.

Figure 2: γ -H2AX foci in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of γ -H2AX foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative γ -H2AX - and DAPI-stained nuclei after 24 h for repair. Scale bars represent 2 μ m.

Figure 3 : Correlation between the surviving fraction at 2 Gy (SF2) and the corresponding percentage of γ -H2AX foci remaining 24 h after 2 Gy. The closed circles represent the different human fibroblast cell lines whose survival and DSB repair data were published elsewhere (Joubert et al., 2008). Notably, AT5BI and 180BR are ATM- and LIG4-mutated cell lines that show hyper-radiosensitivity (Joubert et al., 2008). Open squares are data from the radioresistant CHO-K1 and hyper-radiosensitive CHO-xrs5 rodent cell lines (Joubert et al., 2008). The corresponding survival data from (Weichselbaum et al., 1980) and DSB data shown in fig. 2 of AG01972 HGPS cell line were included (mean \pm SEM of N=3 replicates) (open circle). Cellular radiosensitivity (SF2dp) was found to be inversely proportional to the corresponding percentage of γ -H2AX

foci remaining at 24 h post-irradiation ($SF2dp = 100 / (\gamma\text{-H2AX}_{24\text{ h}} + 1) - 1$; $r = 0.76$; $p < 0.03$) (solid line (Joubert et al., 2008)). To add the HGPS fibroblasts data does not affect significantly the formula ($r = 0.77$). Arrow indicates the change in DSB data induced by the ZoPra treatment.

Figure 4: ATM kinase activity in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of pATM foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least two replicates. Upper panel shows some representative pATM- and DAPI-stained nuclei after the 10 min for repair. For convenience the magnification of the photos has been deliberately changed to better observe cytoplasmic and nuclear forms but all the scale bars represent 5 μm .

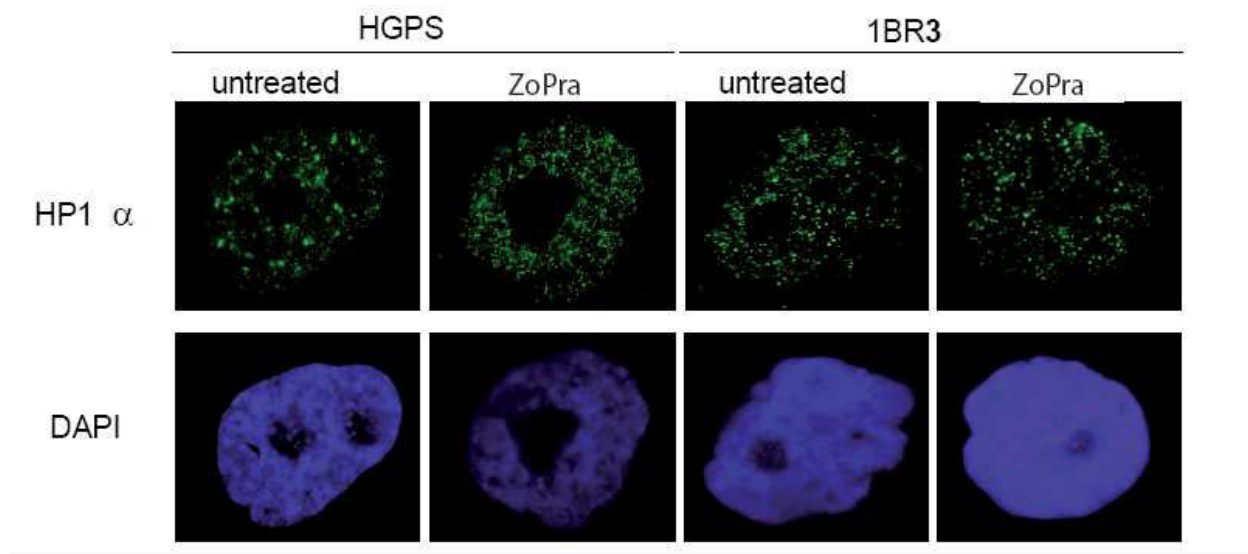
Figure 5: DNA-PK kinase activity in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-rays following the indicated times for repair. The resulting number of pDNA-PK foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative pDNA-PK- and DAPI-stained nuclei after 10 min for repair. Scale bars represent 2 μm .

Figure 6: MRE11 foci in HGPS fibroblasts. The HGPS (open circles) and 1BR3 (closed squares) fibroblasts were submitted to the ZoPra treatment (right panel) or not (left panel) and thereafter exposed at 2 Gy X-

rays following the indicated times for repair. The resulting number of MRE11 foci was plotted against repair times. Each plot represents the mean \pm standard error of at least three replicates. Upper panel shows some representative MRE11- and DAPI-stained nuclei after 4 h for repair. Scale bars represent 2 μ m.

Figure 7: CHK2 phosphorylation in HGSP fibroblasts. Representative pCHK2- and DAPI-stained nuclei after the 15 Gy followed by 4 h for repair in HGPS and 1BR3 fibroblasts, treated or not with the ZoPra treatment. Scale bars represent 2 μ m.

Figure 8: A tentative model describing defects in DNA repair in HGPS cells. In normal cells, ATM translocates into the nucleus via the Nuclear Pores Complex (NPC) anchored in Nuclear Enveloppe (NE) and phosphorylates H2AX, to activate DNA-PK and to phosphorylate downstream substrates such as CHK2 and BRCA1. In HGPS cells, progerin prevents the nucleo-shuttling of the ATM forms. An abnormally low amount of nuclear activated ATM kinase molecules does not permit a complete recognition of DSB and a normal DNA damage signalling.



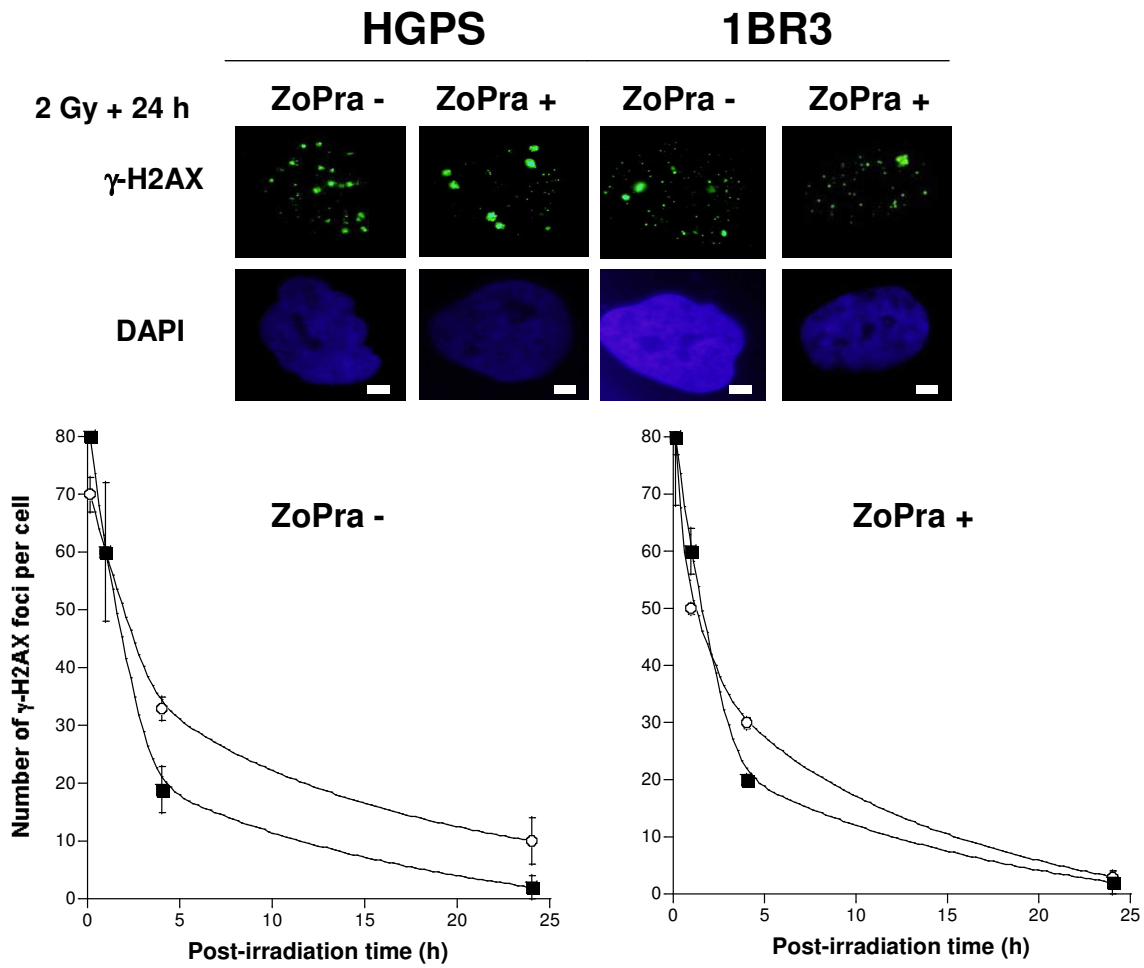


Fig. 2

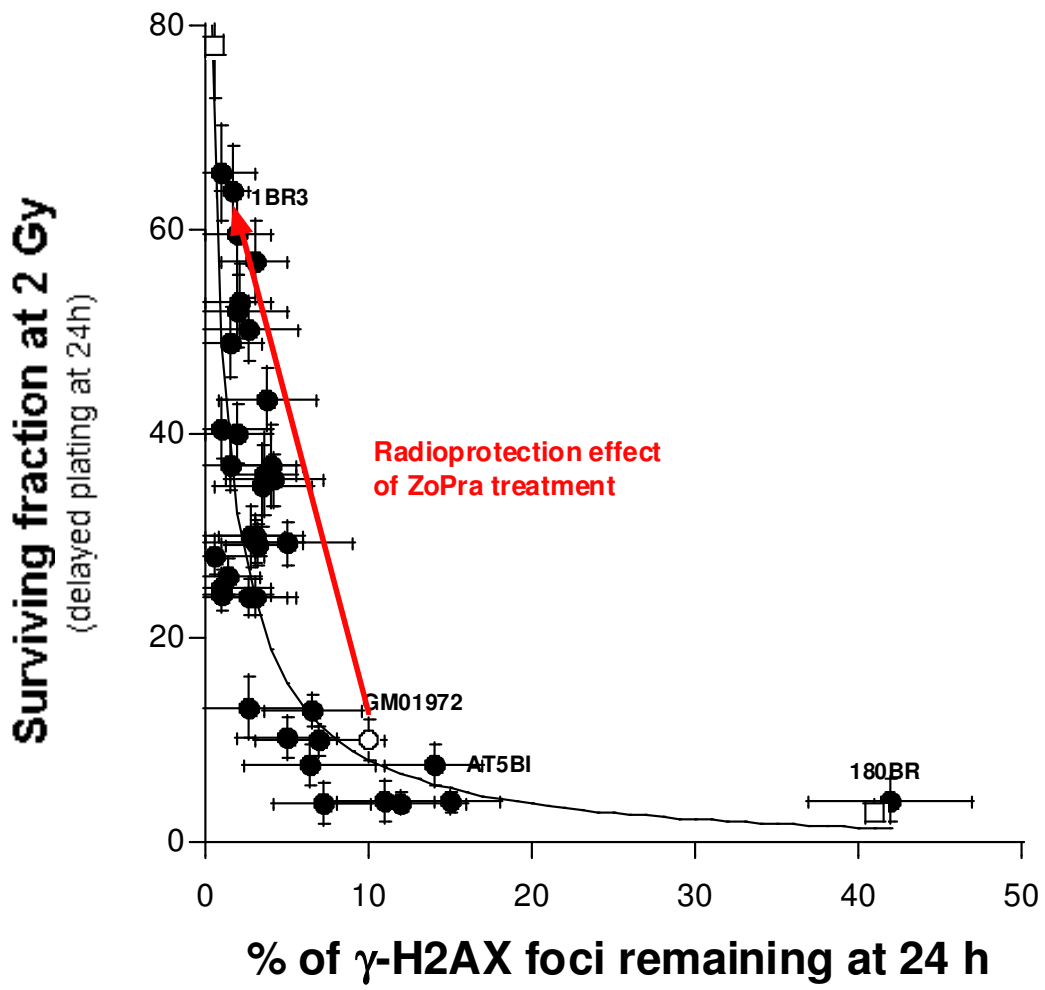


Fig 3

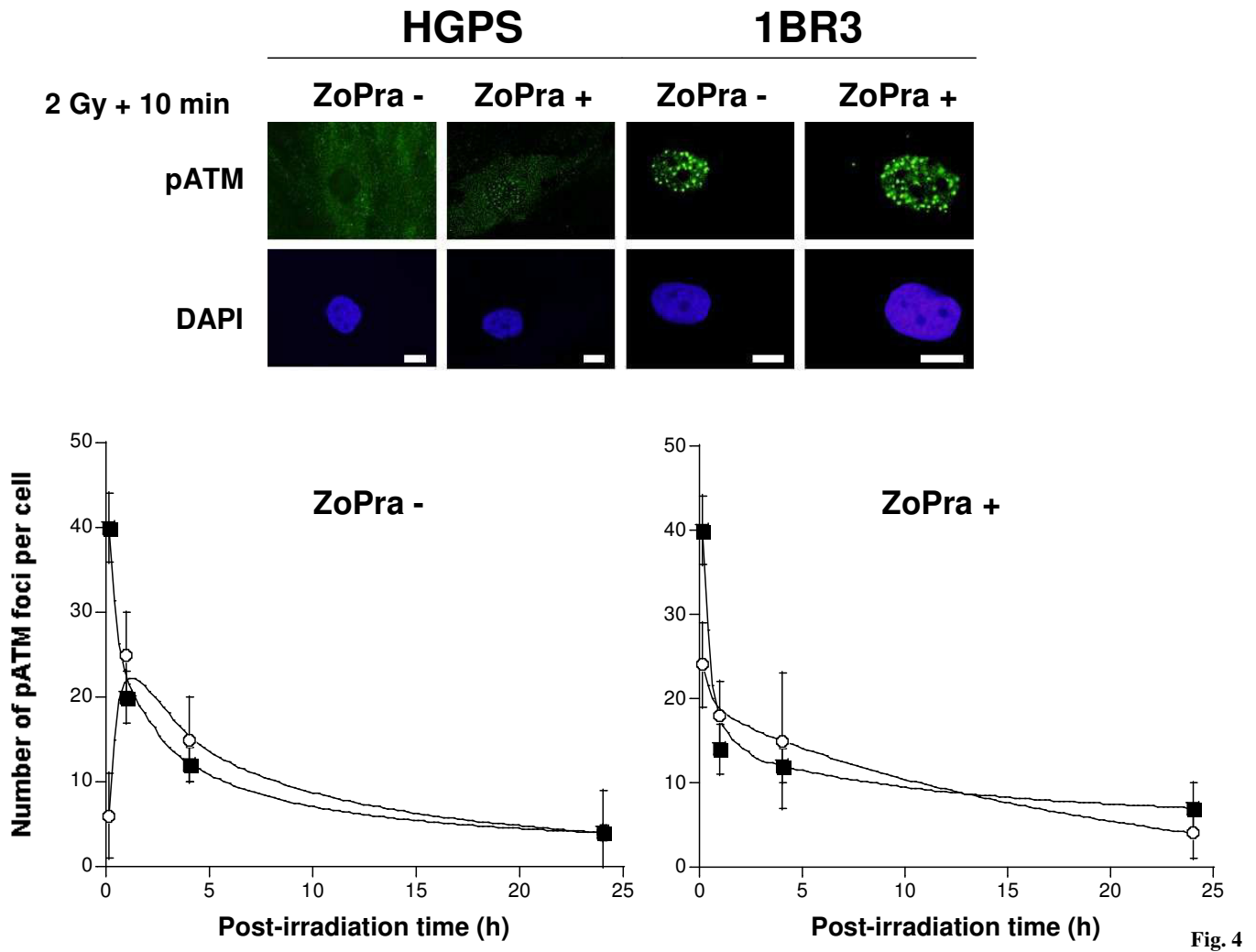


Fig. 4

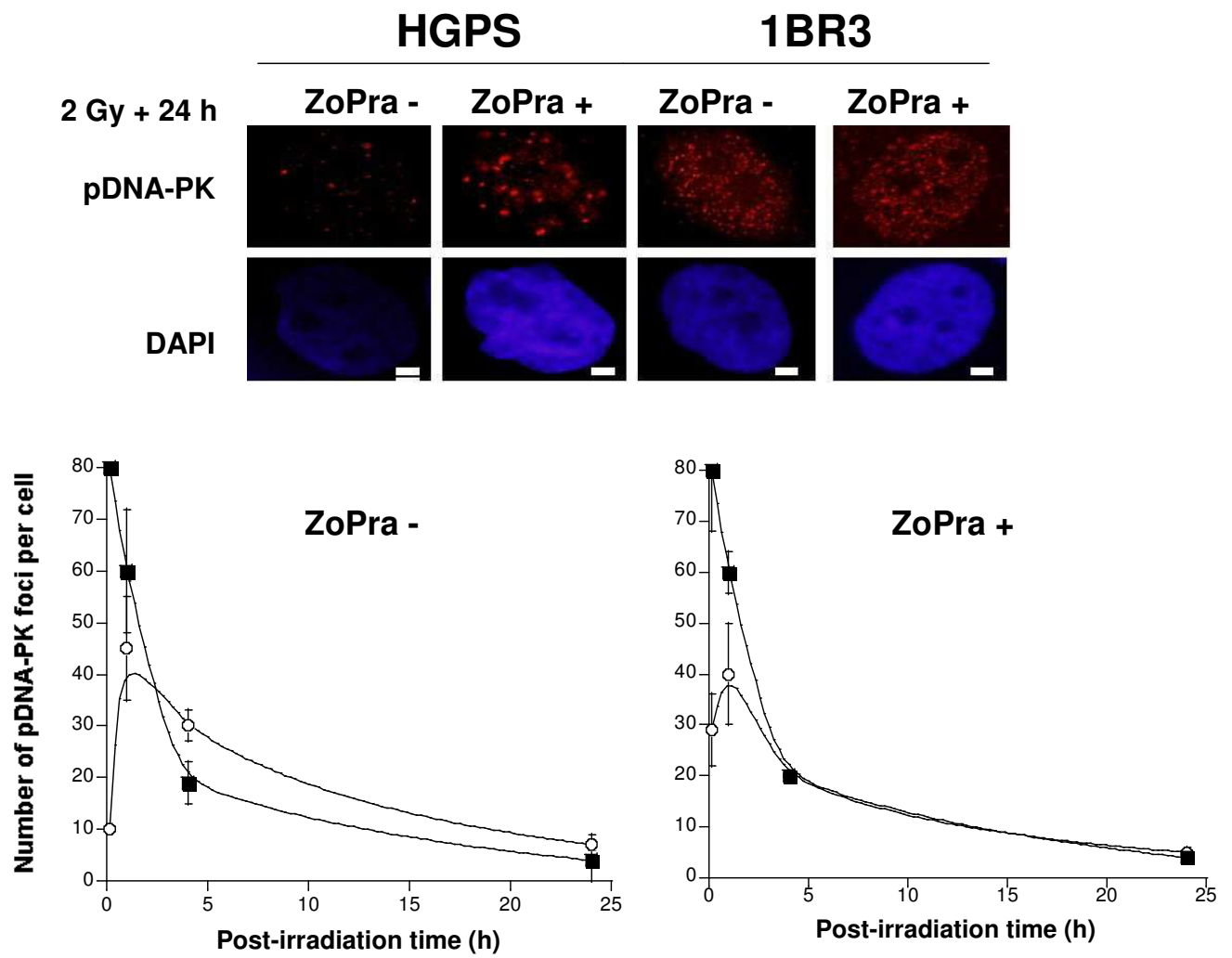


Fig. 5

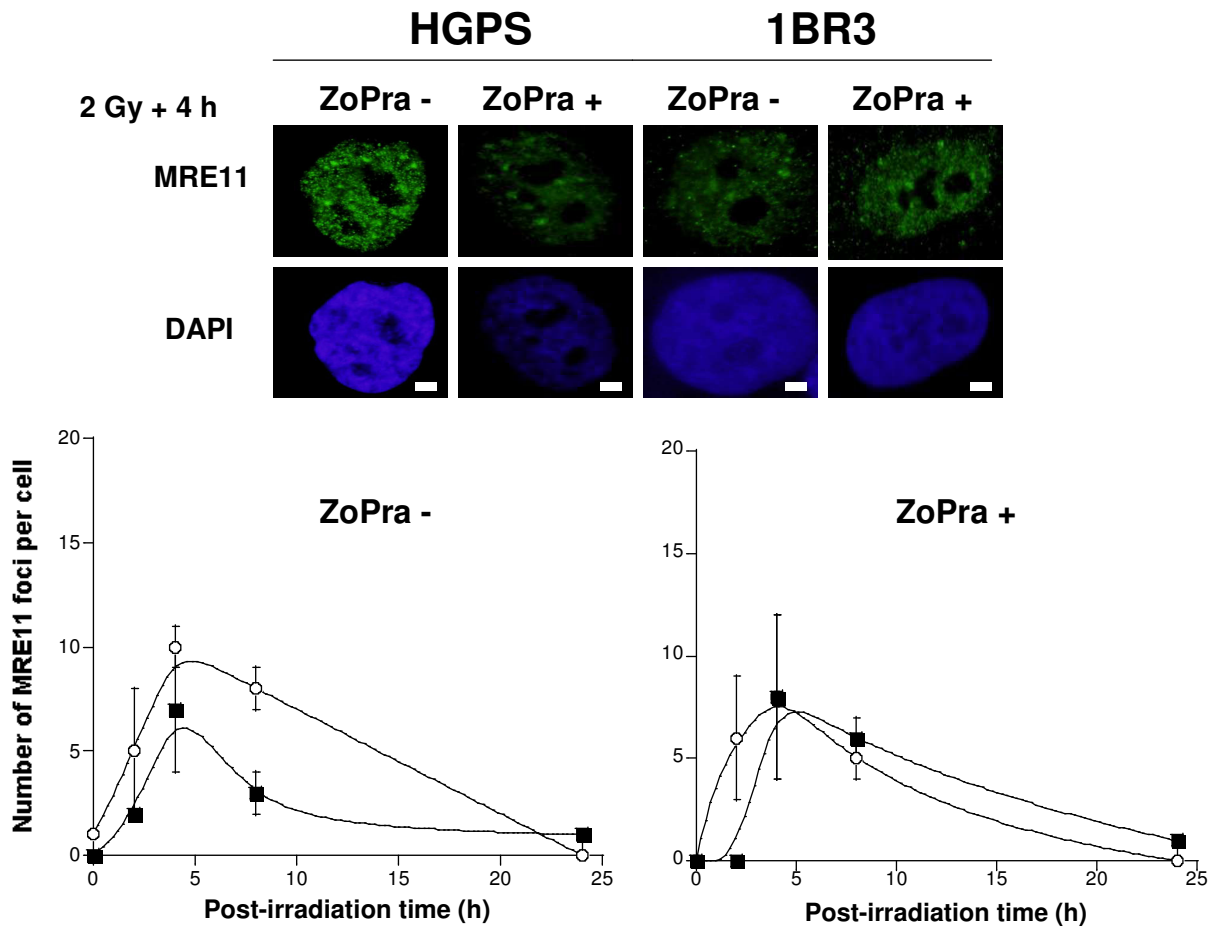


Fig. 6

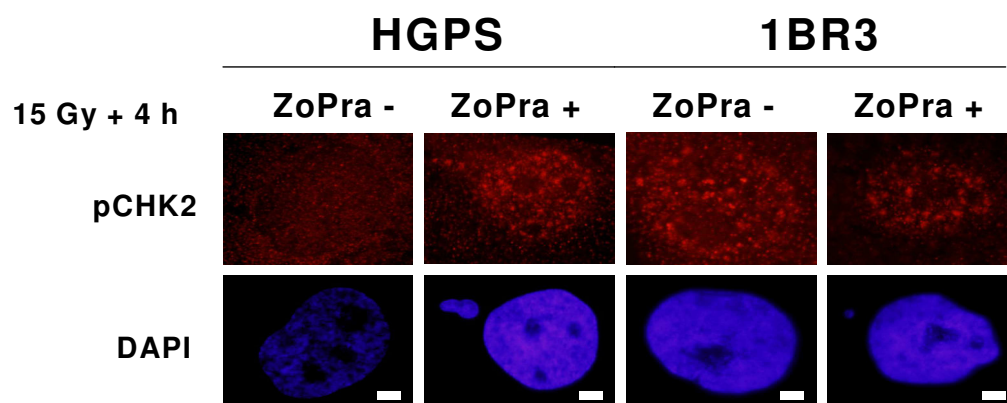


Fig. 7

Radioprotective effect of statins and prostate cancer: a biological and clinical approach

Karim Malek^{1,2}, Mélanie L. Ferlazzo¹, Adeline Granzotto¹, Clément Devic¹, Pauline Pras¹, Laurène Sonzogni¹, Larry Bodgi^{1,3}, Kallel Rahim⁴, Sandrine Pereira¹, Jacques Balosso^{2,5} and Nicolas Foray^{1}*

¹INSERM, UMR 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 69008, Lyon, France

² Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble, France

³ Université Saint-Joseph, Faculté des sciences, 1107-2050, Beyrouth, Liban

⁴

⁵Centre Hospitalier-Universitaire de Grenoble, 38041, Grenoble

Keywords: DSB repair; ATM; H2AX; MRE11; proctitis ionising radiation.

#Author for correspondence:

Abstract

Purpose: A combination of bisphosphonates (zoledronate) and statin (pravastatin) (ZOPRA) was shown to radioprotect human skin fibroblasts *in vitro* by accelerating the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM kinase, a major actor of DNA double-strand breaks (DSB) recognition and repair. Here, in order to document the potential radioprotective effect of statins, a double approach was applied: 1) as a biological approach, we analyzed the impact of statin on the DSB repair and signaling pathway in rectal fibroblasts, i.e. the healthy tissues that are the most exposed during prostate cancer radiotherapy; 2) as a clinical approach, we performed a retrospective study included 65 patients who underwent prostate cancer radiotherapy with (11) or without (54) anti-cholesterol statin treatment and evaluated the impact of statin treatment on the number and the severity grade of rectal toxicities.

Materials and Methods: DSB repair and signaling was assessed through immunofluorescence with pATM and γ H2AX markers. The 65 patients were treated by external 3D conformal radiation therapy (3D-RTE). Retrospectively, clinical data, medication taken, late proctitis (of grade 0, 1, 2 and 3 according to the RTOG / CTCAE classification) were compared with dosimetric data.

Results: The protective effect of ZOPRA was observed in rectal fibroblasts. Notably, ZOPRA reduce the number of residual micronuclei, accelerate DSB recognition and repair. Although the retrospective did not conclude to a drastic reduction of their number, a clear tendency of decreasing of the toxicity grade of proctitis was observed thank in the statin group. The difference is 6% in favour of a radioprotective effect of statins

Conclusions: For the first time, to our knowledge, is provided the proof of concept that radiosensitive rectal cells tissue may be rendered radioresistant by a pre-treatment including statins. The impact of these results on the potential reduction of radiation-induced proctitis is provided.

Introduction

Among the molecular key-events linked to radiosensitivity, there is increasing evidence that DNA double-strand breaks (DSB) can result in cell lethality and tissue radiosensitivity if unrepaired, and increase genomic instability and cancer risk if misrepaired (1,2). Correlations between unrepaired DSB and *in vitro* clonogenic cell death were established (2) and strong links with clinical radiosensitivity have been pointed out (Granzotto et al., submitted). The yields of radiation-induced DSB can be measured via the number of nuclear foci formed by the phosphorylation of the variant histone H2AX (γ H2AX) that is easily quantifiable by using immunofluorescence (3). In fact, the γ H2AX foci reflect the DSB recognized by the non-homologous end-joining (NHEJ), the major DSB repair pathway in humans. Recently, we provided evidence that ionizing radiation triggers the nucleo-shuttling of the cytoplasmic ATM forms that is required for DSB recognition and DSB repair. Hence, any delay of the nucleo-shuttling of ATM may cause radiosensitivity (4,5). Interestingly, pre-treatment of cells combining statins (pravastatin) and bisphosphonates (zoledronate) (ZOPRA) accelerates the nucleo-shuttling of ATM and increases radioresistance (5,6). While the radioprotective role of statins is more and more documented at the molecular scale, there is a number of pre-clinical studies that support a promising clinical transfer of statin to reduce radiation-induced tissue reactions (7-9). The impact of statins may arise in the context of radiotherapy, particularly in prostate cancers since the patients concerned by prostate cancer also suffer frequently from hypercholesterolemia, generally treated by statins.

In order to optimize prostate cancer radiation, innovative radiation techniques by Intensity Modulation Radio-Therapy (IMRT) (10-12) have permitted a 15-20% reduction of the dose to rectum, allowing dose escalations that improve overall

survival significantly (Zilli, Jorcano et al. 2011). Nevertheless, rectal radiation-induced toxicity remains a very alarming complication due to its distressing symptoms (pain, bleeding, incontinence aggravation). Such toxicities are generally of severity grades higher than 2 and can occur in 15-20% of patients (13) and represent therefore a clinical, economical and societal issue.

Here, in order to better document the potential radioprotective effect of statins a double approach was applied deliberately: 1) as a biological approach, we analyzed the impact of statin on the DSB repair and signaling pathway in rectal fibroblasts, i.e. the healthy tissues that are the most exposed during prostate cancer radiotherapy; 2) as a clinical approach, we performed a retrospective study included 66 patients who underwent prostate cancer radiotherapy with or without anti-cholesterol statin treatment and evaluated the impact of statin treatment on the number and the severity grade of rectal toxicities.

Materials and Methods

Cell lines

Non-transformed fibroblast cell lines were deliberately chosen for their genomic stability and in order to avoid any confounding effect of due to immortalization. HIF fibroblasts were purchased from Sciencell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) (#2920) and were isolated from human fetal intestinal tissue. The radioresistant HF19 and the radiosensitive 9CLB human skin fibroblasts were described elsewhere and were isolated from human fetal lung tissue (14). 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 bovine serum, penicillin and streptomycin. All the experiments were performed with cells in plateau phase of growth (90 - 99 % in G0/G1) to overcome any cell cycle effects (14). It is noteworthy that there was no significant difference in the distribution of cell cycle phases in the cell lines tested, whether spontaneously or up to 24 h after irradiation (data not shown). The major radiobiological features of the untransformed radioresistant HF19 and the *ATM*-mutated AT5BI and the *LIG4*-mutated 180BR cell lines were published elsewhere (2,14).

Irradiations

All the *in vitro* irradiations were performed on a 6 MeV x-rays clinical irradiator (SL 15 Phillips) at anti-cancer Centre Léon-Bérard, (Lyon, France) at a dose of 2 Gy with a dose-rate of 6 Gy.min⁻¹ to avoid any impact of DSB repair during irradiation.

Chemical in vitro treatments

The ZOPRA treatment was applied as previously published (6). Briefly, cells were incubated with 1 μM pravastatine (Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin-Fallavier, France) in PBS for 24 h at 37 °C. Thereafter, 1 μM zoledronate (Sigma-Aldrich, France) in PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37 °C. The culture medium was renewed immediately before irradiation. In the same conditions, N-acetylcystein (NAC), amifostine (Ethyol) (Sigma) were applied at the concentration indicated in the text.

Immunofluorescence

Immunofluorescence protocol was described elsewhere (15). 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-*gH2AX*^{ser139} antibody (clone JBW301; Merck, Millipore, Darmstadt,

Germany) was applied at 1:800. Anti-*pATM*^{ser1981} (clone 10H11.E12; Millipore, Germany), anti-*MRE11* (#56211; QED Bioscience Inc., San Diego, USA) and anti-*HTT* (3H2241, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, USA) antibodies were used at 1:100. Incubations with anti-mouse IgG fluorescein-conjugate (FITC) and anti-rabbit IgG rhodamine-conjugate (TRITC) secondary antibodies developed in goat (Sigma, Saint Louis, USA) were performed at 1:100 at 37°C for 20 min. Slides were mounted in 4',6'-Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Eurobio-Abcys, Courtaboeuf, France) and examined with Olympus fluorescence microscope. DAPI staining permitted also to indirectly evaluate yield of G₁ cells (nuclei with homogeneous DAPI staining), G₂ cells (nuclei with heterogeneous DAPI staining) and metaphase (visible chromosomes) (15). In order to avoid any bias due to co-immunofluorescence, we have deliberately chosen to apply immunofluorescence with only one marker (separated immunofluorescence) (16).

Clinical study

From 2003 to 2008, 176 patients treated with EBRT-3D were identified and 66 cases with complete and accessible data were included in a retrospective study. This single-centre study involved the successive records of a cohort of patients treated for a 5-year period by the same radiotherapist with a uniform technic: 3D conformal external beam radiotherapy (EBRT-3D). Patients treated with brachytherapy, IMRT or those with dosimetric criteria predictive of a high risk of proctitis (rectal diameter greater than 6cm or DVH with a V50% rectal > 50GY) were excluded from the study. Retrospectively, the clinical data were the following: Medications taken (statin and antiplatelet drugs), grades of late proctitis (0, 1, 2 and 3 according to RTOG / CTCAE V4.0) classifications were compared to the dosimetric data i.e. rectal volume, rectal diameter, dose-volume histogram and the V25 (dose delivered to 25% of volume) and V50 % values. The data were processed descriptively and the statistical analysis was performed using the Pearson correlation tests, a multimodal regression and the chi² test.

Results

Radiobiological features

Treatment to statins and bisphosphonates decreases the number of residual micronuclei in rectal fibroblasts

Radiation-induced micronuclei are the consequences of unrepaired DNA breaks that propagate all along the cell cycle leading to irreversibly damaged chromosomal fragments and causing mitotic death (17). Micronuclei are the cytogenetic endpoint the most correlated with cellular death and toxicity (17). In the rectal fibroblasts, the numbers of spontaneous and residual micronuclei remaining after 24 h post-irradiation were found to be 2.2 ± 0.4 and 25 ± 5 , respectively, suggesting a severe radiation response (Fig. 1). By comparison, in radioresistant lung fibroblasts, the corresponding data were 0.2 ± 0.3 ($p < 0.05$) and 2.0 ± 0.4 ($p < 0.001$), respectively. The ZOPRA treatment did not change the number of spontaneous micronuclei in rectal fibroblasts ($p=0.7$). Conversely, it led to drastically decrease the number of residual micronuclei (5 ± 2 ($p < 0.001$)) (Fig. 1). The ZOPRA treatment has no significant effect on the number of micronuclei in radioresistant lung fibroblasts, whether spontaneous or residual ($p > 0.8$).

Treatment to statins and bisphosphonates accelerates the recognition and the repair of DSB managed by NHEJ in rectal fibroblasts

The average number of spontaneous γ H2AX foci observed in rectal fibroblasts were 0.5 ± 0.4 γ H2AX foci per cell (i.e. non-significantly different from the radioresistant fibroblasts: 0.2 ± 0.5 γ H2AX foci; $p=0.1$). Despite an increase of the number of cells without γ H2AX foci, the ZOPRA treatment has no significant effect on the number of

spontaneous γ H2AX foci for the two cell types investigated (Fig 2A). Kinetics of radiation-induced γ H2AX foci are generally composed by two phases: the increase of γ H2AX foci observed in the first hours post-irradiation that reflects DSB recognition on one side, and on the other side the decrease of γ H2AX foci that reflects the DSB repair phase (4). In the radioresistant lung fibroblasts, the number of γ H2AX foci scored immediately after 2 Gy was 74 ± 9 per cell, in very good agreement with the value 37 ± 4 per Gy per cell published previously (2). The number of radiation-induced γ H2AX foci scored immediately after 2 Gy in the rectal fibroblasts was systematically lower than ($46 \pm \text{XXX}$; $p < 0.01$), suggesting an impaired DSB recognition (Fig. 2B). The rectal fibroblasts also showed significantly higher amounts of persistent γ H2AX foci 24 h after irradiation than radioresistant controls (2.8 ± 0.15 and 3.3 ± 0.14 foci per cell, respectively), suggesting an impaired DSB repair rate ($p < 0.01$), as well (Fig. 2B). However, by comparing data with those obtained from hyper-radiosensitive ATM- and LIG4-mutated skin fibroblasts, such an impairment of DSB repair is intermediate, suggesting a significant but moderate radiosensitivity (Fig. 2B). Interestingly, the ZOPRA treatment partially corrected the delay of DSB recognition of the rectal fibroblasts, suggesting that the ZOPRA treatment impacts on the radiation-induced kinase activity of the ATM protein (Fig. 2B).

Treatment to statins and bisphosphonates impacts the radiation-induced ATM nucleo-shuttling in rectal fibroblasts

The kinase activity of ATM was examined by using immunofluorescence with antibodies against the auto-phosphorylation of ATM ($p\text{ATM}^{\text{ser1981}}$) (18). In non-irradiated radioresistant fibroblasts, $p\text{ATM}$ forms were found to be cytoplasmic (Fig

3A). An exposure to 2 Gy resulted in an early formation of pATM foci in nucleus: more than 40 pATM foci were observed at 10 min after irradiation, in agreement with previous observations (5). This number of nuclear foci progressively decreased with repair time. In the rectal fibroblasts, while the localization of the spontaneous pATM forms appeared similar to those of the radioresistant fibroblasts, the number of pATM foci per cell observed 10 min post-irradiation was found significantly lower with a broad intense nuclear staining (23 ± 7 and 43.8 ± 8 pATM foci per cell, respectively; $p < 0.01$). (Fig.3B). Furthermore, the kinetics of appearance/disappearance of pATM foci were found to be significantly different from that of radioresistant fibroblasts with a maximum reached between 1 and 4 h post-irradiation (Fig. 3B). Altogether, these data suggest a delay in the radiation-induced nucleo-shuttling of ATM that may explain the lower yield of early γ H2AX foci described above. Interestingly, like for micronuclei and γ H2AX foci, the ZOPRA treatment led to partially correct the delay of the nucleo-shuttling of ATM (Fig. 3B).

Statin contributes significantly in the radioprotective effect of the ZOPRA treatment

The impact of the ZOPRA treatment was also observed with the same molecular endpoints (γ H2AX or pATM) in other tissues (skin, lung, brain) and cell lines, especially when cells are radiosensitive (data not shown). However, the exact contribution of statin in the ZOPRA combination remained to be investigated. By applying to representative radiosensitive and radioresistant fibroblasts, the most frequently used anti-oxidant agents like N-acetylcysteine, amifostin and statin (pravastatin) and bisphosphonate (zoledronate) separately, we quantified the potential radioprotective effect of these drugs. Again, the impact of the anti-oxidant agents and the ZOPRA components is negligible in radioresistant cells. Conversely

ZOPRA, statin and biphosphonates taken separately appeared to have significant radioprotective properties, especially via a better DSB recognition. However, although the relative contribution of statins is strong, the ZOPRA combination showed the highest radioprotective properties (Fig. 4). Hence, while our radiobiological data are encouraging and since patients undergoing prostate cancer radiotherapy are not necessarily treated by NAC, amifostin or bisphosphonates but rather statin because of eventual hypercholesterolemia, we investigated the radioprotective effect of statin *in vivo*

Clinical features

Clinical study: statistical analysis

For the 66 patients included in the retrospective study, the mean age was 69, the follow up period was 6 to 60 months (median: 2.5 years). Radical treatment was administered to 65% patients with (prescribed dose of 74 Gy to the prostate) and 35% of patients received a radical prostatectomy before irradiation. Among them, 22% were R1 (resections were not in sano); 5% of patients had a transurethral resection. The prescribed postoperative dose was 66 Gy to the prostate bed. This population was divided according to stages T1, T2 and T3 equally and predominantly N + (91%). The most common Gleason score was 7 (in 37% of cases) (Fig. S1 and Table S1). The oncological results at 5 years were characterized by an overall 100% survival as well as a local control rate at 100% and a 98.5% relapse-free survival (only one relapse of a metastatic nature). Among these patients, 21% underwent statin-treatment for hypercholesterolemia and 19% were treated to platelet aggregation inhibitor. One third of the patients received both these treatments simultaneously and 56% were on hormone therapy. In the statin-free group (n = 51),

14 (27.5%) patients elicited proctitis of grade 2 or higher. In the statin-treated group (n = 14), the corresponding number was only 3 (21.4%) patients (Table 1). Interestingly, despite that the low grades were less represented than the higher ones for the statin-free and statin group, the toxicity grade-distribution obeyed a Gaussian law ($p=0.98$ and $p=0.99$, respectively) (Fig. 5A). From data fitting, Gaussian curve predicts an average of 7.1% of patients with grades 1, 2 or 3 for the statin-free group while the corresponding prediction is 11.7% for the statin group, suggesting that statin anti-cholesterol treatment may decrease the number of patients with high-grade proctitis. Statin treatment did not however make totally disappeared the frequency of grade 3 proctitis (Table S2). Furthermore, by dichotomizing the data in two subgroups (grades 0+1 vs 2+3 or grades 0+1+2 vs 3), the number of patients enrolled in the study are not sufficient to render this tendency significant ($p > 0.55$). Nevertheless, by considering each subgroup of grade 1, 2 and 3, to plot the percentage of patients against the corresponding toxicity grade helped point out a continuous decrease of toxicity inversely proportional to the grade : the statin effect not only led to a decrease of the toxicity of proctitis but also changed the final grade-distribution of patients (Fig. 5B). Finally, there was no clinical parameter other than statin treatment that permits to establish a correlation with the decrease of toxicity of the proctitis (Table S3 and S4).

Discussion

The rectal fibroblasts obey our model of nucleo-shuttling of ATM and are made more radioresistant *in vitro* by a ZOPRA treatment

The commonly accepted paradigm is the predominance of nuclear forms of ATM. However, this statement does not explain the radiosensitivity of syndromes caused by mutations of cytoplasmic proteins like Huntington's disease, neurofibromatosis, (5,19). The existence of cytoplasmic forms of ATM was however reported (4,20,21) and we recently provided evidence that some cytoplasmic proteins can sequester ATM inside cytoplasm and limit both DSB recognition and repair (5). To provide a coherent explanation to these statements, we proposed a radiation response model based on 6 steps: 1) irradiation produce DSB in nucleus and monomerization of ATM dimers in cytoplasm via oxidative stress; 2) ATM monomers diffuse into nucleus; 3) ATM monomers in nucleus recognize DSB by phosphorylation of H2AX histone; 4) recognized DSB are repaired; 5) non-recognized DSB and recognized but unrepaired DSB participate to cell lethality (Bodgi and Foray, submitted). By accelerating the ATM nucleo-shuttling, ZOPRA treatment was shown to increase DSB recognition, stimulate DSB repair and increase radioresistance suggesting that this process is required for a normal radiation response (5,6). Even if the action of ZOPRA on nuclear membrane is not excluded, ZOPRA treatment is supposed to dissociate the ATM monomers from their blocking cytoplasmic substrates, which accelerates the nucleo-shuttling of ATM. However, further investigations are still needed to document these hypotheses. The HIF fibroblast data are consistent with our model of ATM nucleo-shuttling and support that gastro-intestinal fibroblasts, like skin or lung ones, also elicit the different steps described above.

Impact of statins on radiosensitive rectal fibroblasts: tissue- or individual-dependent effect?

In our hands, the HIF fibroblasts elicit a marked delay in DSB recognition and a small DSB defect. In our classification of human radiosensitivity defined elsewhere from a collection of human fibroblasts (2,4), the HIF fibroblast cell lines used here would belong to the group II (moderate radiosensitivity and high genomic instability) instead of the group I (radioresistance). From our database, the γ H2AX and pATM data of this cell line are consistent with grade 3-4 reaction post-radiotherapy, which makes this cell line representative of patients suffering from proctitis. However, the question whether such radiosensitivity would be due to an individual factor or to a specificity of the gastro-intestinal cells is raised. Further investigations on much more cell lines are therefore required to reply to this question. Nevertheless, the Gaussian nature of the grade-distribution shown in Fig. 4 suggests that the rectal fibroblasts are not necessarily all radiosensitive.

Applications to the clinic: limits of the study and encouraging perspectives

Our retrospective study clearly shows a statin-dependent decrease of the toxicity of proctitis but did not conclude to a drastic reduction of their number. The difference is 6% in favour of a radioprotective effect of statins regarding grades 2 and 3, but the size of that population, is too small for such a difference to be significant. Nevertheless, this small number of the enrolled patients may be partially counterbalanced by the homogeneity of treated cases and treatments carried out. Indeed, all radiotherapy usual variation elements were minimized in this work: the same center, the same highly experienced practitioner, the same institutional

enrollment and the same very standardized treatment technique. The study was limited to a single technique and stopped during the methodological development of the transition from RT3D to IMRT. This homogeneity seems to be confirmed by the very weak dispersion of the dosimetric parameters (although there are two different indications and therefore two dose levels) and, a priori, permits to consider that the side effects are attributable to individual radiosensitivity rather than technical variations. Lastly, our data allowed considering that statin treatment during pelvic radiotherapy does not affect the oncological results (e.g. reduction or increase of the tumor volume) and does not increase the risk of side effects.

It is noteworthy that this retrospective study is limited to the assumption of potential implication of statin alone in reducing of the severity of proctitis. Such hypothesis is in contradiction with our radiobiological data showing that bisphosphonates combined with statins (ZOPRA) provides the highest radioprotective effect among all the drugs investigated here. Since fibrosis is one of the manifestations during the proctitis process, our data suggest that ZOPRA treatment may be more efficient than statin alone. Further investigations are therefore needed to verify this assumption.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Madame Beaufrère for her assistance in editing English. We thank the Association Pour la Recherche sur l'Ataxie-Telangiectasie (APRAT), the Electricité de France (Comité de Radioprotection), the Plan Cancer/AVIESAN "Micromegas project, the ANR "Hemi-breaks T" project, the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) and the Commissariat Général à l'Investissement (INDIRA project).

REFERENCES

1. Jeggo PA, Lobrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717-7719.
2. Joubert A, Gamo K, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, Favaudon V, Arlett C, Foray N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *International journal of radiation biology* 2008;84:1-19.
3. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:5057-5062.
4. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, Victor JM, Maalouf M, Fares G, Foray N. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol* 2013;333:135-145.
5. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, Vogin G, Pereira S, Foray N. Mutations of the huntington's disease protein impact on the atm-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: Corrective effect of statins and bisphosphonates. *Molecular neurobiology* 2014;49:1200-1211.
6. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, Lopez-Otin C. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 2008;14:767-772.
7. Holler V, Buard V, Gaugler MH, Guipaud O, Baudelin C, Sache A, Perez Mdel R, Squiban C, Tamarat R, Milliat F, Benderitter M. Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *The Journal of investigative dermatology* 2009;129:1280-1291.
8. Haydont V, Gilliot O, Rivera S, Bourgier C, Francois A, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotans MC. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2007;68:1471-1482.
9. Nubel T, Damrot J, Roos WP, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:933-939.
10. Zilli T, Jorcano S, Rouzaud M, Dipasquale G, Nouet P, Toscas JI, Casanova N, Wang H, Escude L, Molla M, Linero D, Weber DC, Miralbell R. Twice-weekly hypofractionated intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer with low-risk nodal involvement: Toxicity and outcome from a dose escalation pilot study. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2011;81:382-389.
11. Zilli T, Rouzaud M, Jorcano S, Dipasquale G, Nouet P, Toscas JI, Casanova N, Wang H, Escude L, Molla M, Linero D, Weber DC, Miralbell R. Dose escalation study with two different hypofractionated intensity modulated radiotherapy techniques for localized prostate cancer: Acute toxicity. *Technology in cancer research & treatment* 2010;9:263-270.
12. Jorcano S, Molla M, Escude L, Sanz S, Hidalgo A, Toscas JI, Linero D, Miralbell R. Hypofractionated extracranial stereotactic radiotherapy boost for gynecologic tumors: A promising alternative to high-dose rate brachytherapy. *Technology in cancer research & treatment* 2010;9:509-514.
13. Nanda A, Chen MH, Moran BJ, Braccioforte MH, D'Amico AV. Cardiovascular comorbidity and mortality in men with prostate cancer treated with brachytherapy-based radiation with or without hormonal therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2013;85:e209-215.

14. 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. *International journal of radiation biology* 1997;72:271-283.
15. 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. *The EMBO journal* 2003;22:2860-2871.
16. Renier W, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Massart C, Foray N. Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *International journal of radiation biology* 2007;83:543-549.
17. Grote SJ, Joshi GP, Revell SH, Shaw CA. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981;39:395-408.
18. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003;421:499-506.
19. Deschavanne PJ, Debieu D, Fertil B, Malaise EP. Re-evaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of different genetic origins. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986;50:279-293.
20. Yang DQ, Halaby MJ, Li Y, Hibma JC, Burn P. Cytoplasmic atm protein kinase: An emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration. *Drug discovery today* 2011;16:332-338.
21. Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB. Atm binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:10146-10151.

Legends to figures

Fig. 1: Number of micronuclei per 100 cells assessed on HIF (white bars) or HF19 fibroblasts treated to ZOPRA treatment (or not), irradiated at 2 Gy and subjected to immunofluorescence (DAPI counterstaining). Each data point represents the mean of at least 3 independent replicates +/- SEM.

Fig. 2: γ H2AX foci **A:** Representative photo of cells subjected to γ -H2AX immunofluorescence. **B:** Number of γ H2AX foci per cell assessed on HIF fibroblasts treated to ZOPRA treatment (white circles) or not (black squares), irradiated at 2 Gy and subjected to immunofluorescence. As control, the corresponding non-treated HF19 data were shown as black losanges. ZOPRA treated HF19 cells provided similar data (data not shown). Each data point represents the mean of at least 3 independent replicates +/- SEM.

Fig. 3: pATM foci **A:** Representative photo of cells subjected to pATM immunofluorescence. **B:** Number of pATM foci per cell assessed on HIF fibroblasts treated to ZOPRA treatment (white circles) or not (black squares), irradiated at 2 Gy and subjected to immunofluorescence. As control, the corresponding non-treated HF19 data were shown as black losanges. ZOPRA treated HF19 cells provided similar data (data not shown). Each data point represents the mean of at least 3 independent replicates +/- SEM.

Fig. 4: Effect of different radioprotective treatment. Number of γ H2AX foci per cell assessed on HF19 (radioresistant) and 9CLB (radiosensitive) fibroblasts treated to the indicated radioprotective treatment after 2 Gy followed by 10 min (panel A) or 24 h (panel B). Each data point represents the mean of at least 3 independent replicates +/- SEM.

Fig. 5 : A. Distribution of the number of patients included in the retrospective study as a function of the grade of their proctitis. Data for patients with (black bars) or without (white bars) anti-cholesterol statin treatment were detailed. **B.** Similar data as shown in panel A but reduced to only the patients with proctitis. The dotted lines are the results of linear regression of data.

Table 1: Numbers of patients showing proctitis and their grade of severity

Severity grades of proctitis	Without statin	With statin	Totals
0	33 (64.7)	11 (78.6)	44
1	4 (7.8)	0 (0.0)	4
2	6 (11.8)	1 (7.1)	7
3	8 (15.7)	2 (14.3)	10
	51 (100)	14 (100)	65

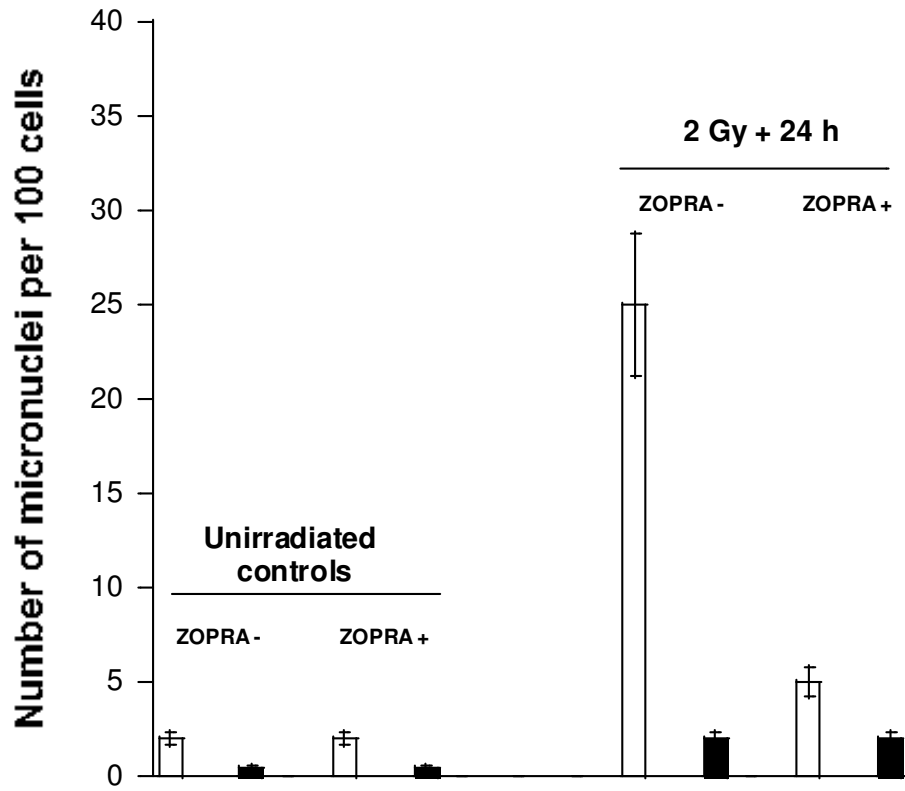


Fig.1

Fig.2A gH2AX foci distribution (photos)

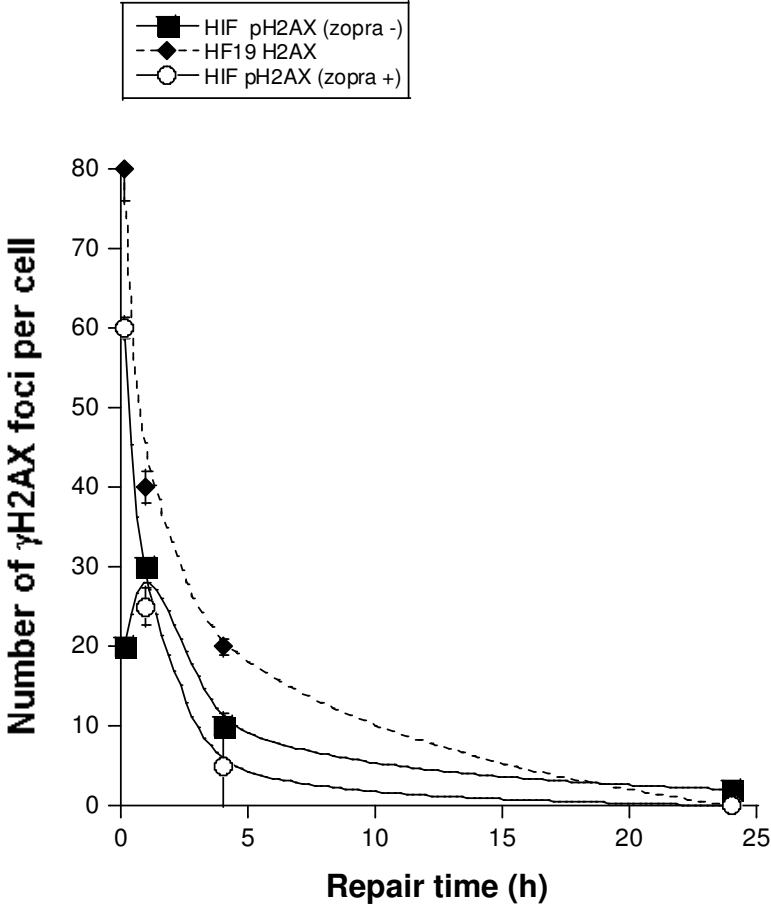


Fig. 2B gH2AX kinetics

Fig 3A pATMfoci (photos)

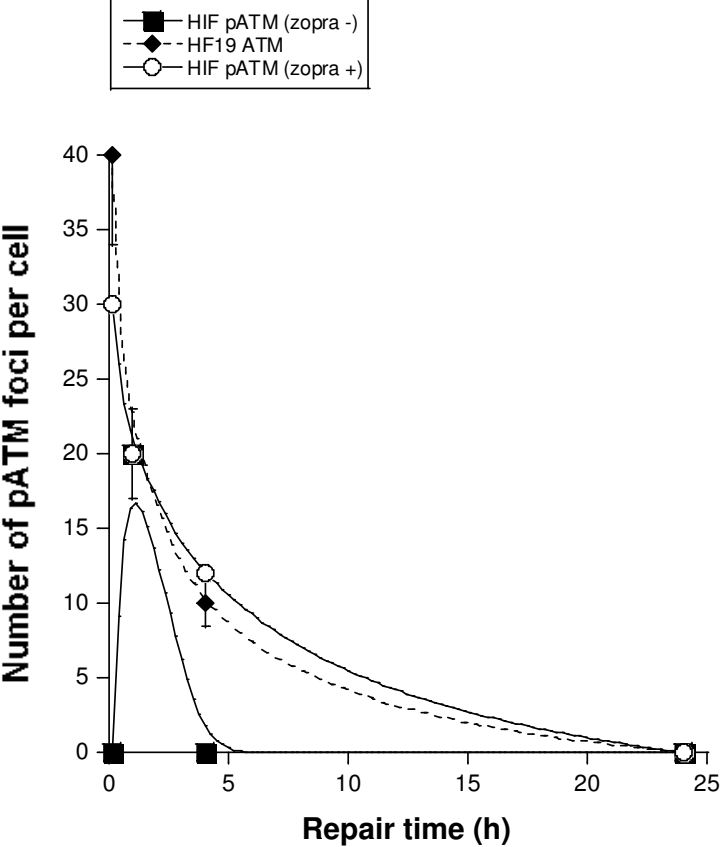


Fig 3B pATM foci kinetics

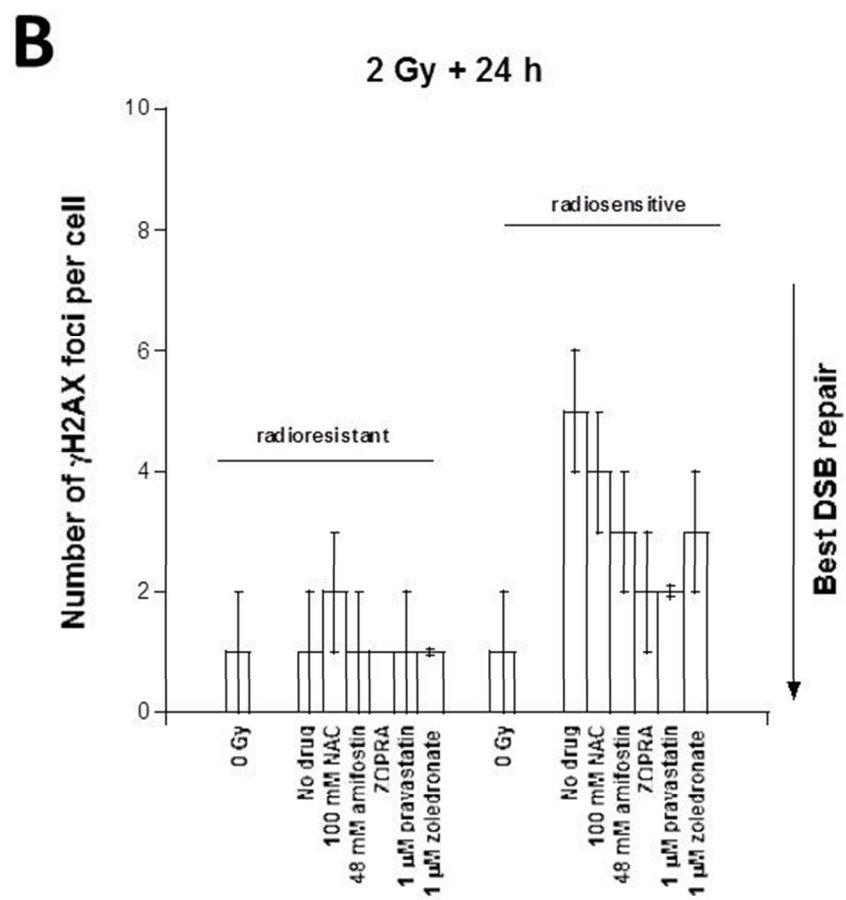
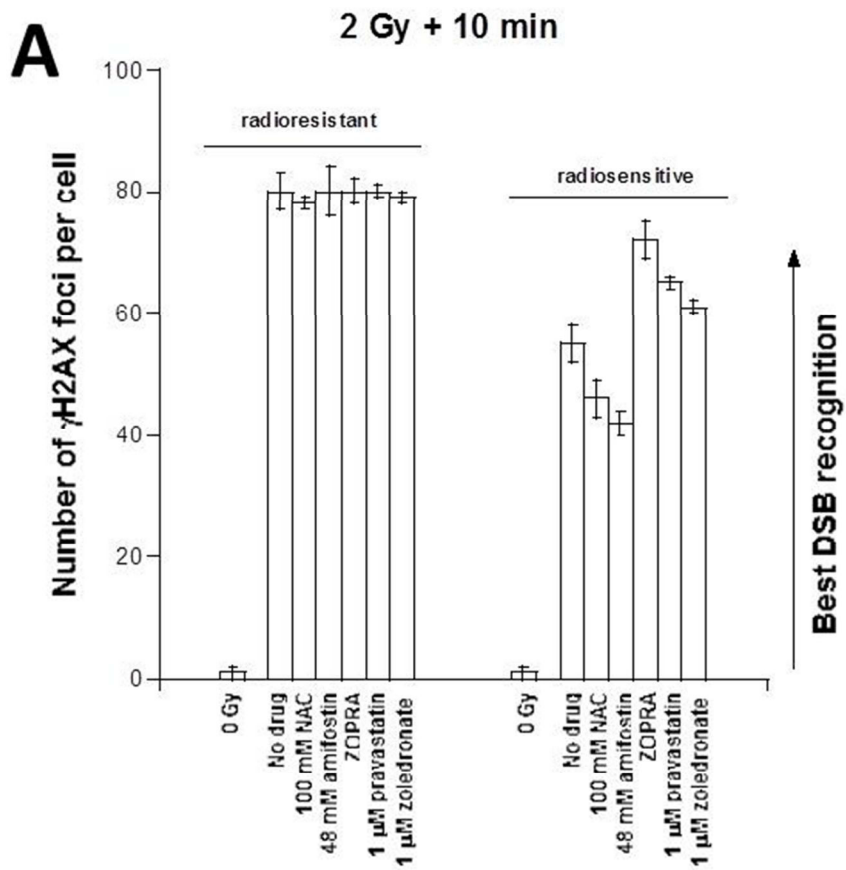


Fig 4

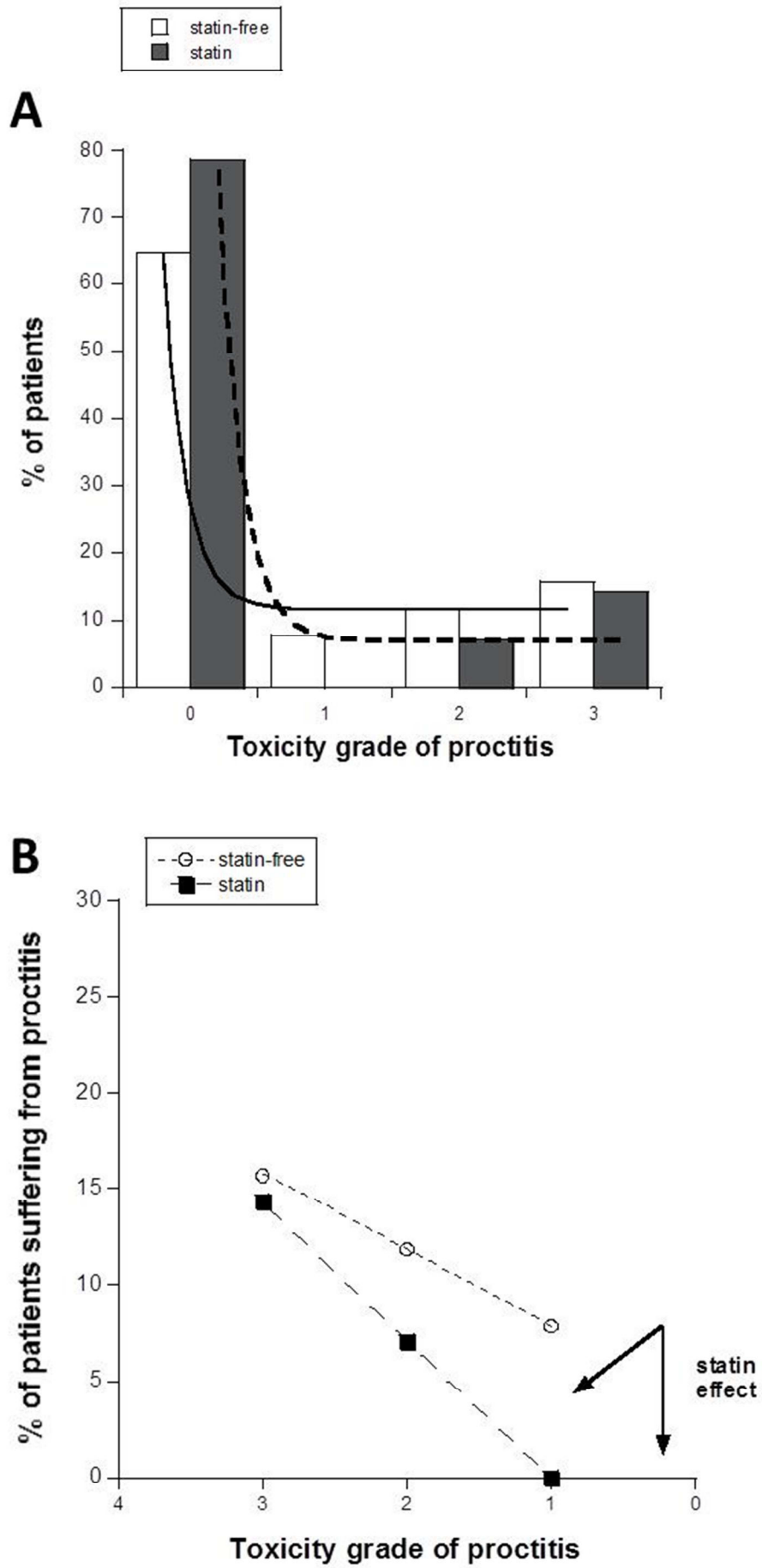


Fig 5

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1 : Characteristics and dose-volume statistics of the studied population. The dispersion of dosimetric values pertaining to the rectum is low and shows that these population treatment procedures are very homogeneous.

	age	DoseRT (Gy)	Rectum vol_ (mL)	Rectal diameter (cm)	V50Gy rectum (mL)	V25Gy rectum (mL)	Follow up (Months)
n	64	66	64	41	65	64	66
Average	69. 13	70. 8015	100. 7186	6. 0390	46. 8187	60. 0515	35. 9242
Median	70. 00	71. 3750	76. 0550	6. 0000	46. 3000	62. 9400	36. 0000
Mode	72	64. 00 ^{has}	62. 50 ^a	5. 60	47. 00	70. 00 ^{has}	36. 00
Standard deviation	6. 888	5. 24692	69. 34626	1. 12046	27. 02519	10. 60819	11. 05276

Table S2: Cases of grade ≥ 2 proctitis for each subgroup treated with or without statin. The incidence of severe proctitis is a little lower in the statin-treated group, + 6%. The confidence intervals show that this difference is not significant for these reduced numbers of patients.

	Proctitis G \geq 2 (n)	No proctitis (n)	Proctitis percentages	IC 95%
Statins	3	11	21.4%	1 to 43%
No Statin	14	37	2 .5%	15 to 40%

Table S3 : Correlation analysis between anatomico-dosimetric parameters by multimodal regression

		Total dose	Rectal vol	Rectal diameter	V50 Gy	V25 Gy
Total dose	Pearson Corr.	1	- 031	160	- 020	389
	p (bilateral)		808	317	875	.001
	n	66	64	41	65	64
Rectal vol	Pearson Corr.		1	934	- 185	- 634
	p (bilateral)			, 000	144	, 000
	n			41	64	63
Rectal diameter	Pearson Corr.			1	- ,116	- ,489
	p (bilateral)				472	.001
	n				41	40
V50 Gy	Pearson Corr.				1	173
	p (bilateral)					170
	n					64
V25 Gy	Pearson Corr.					1

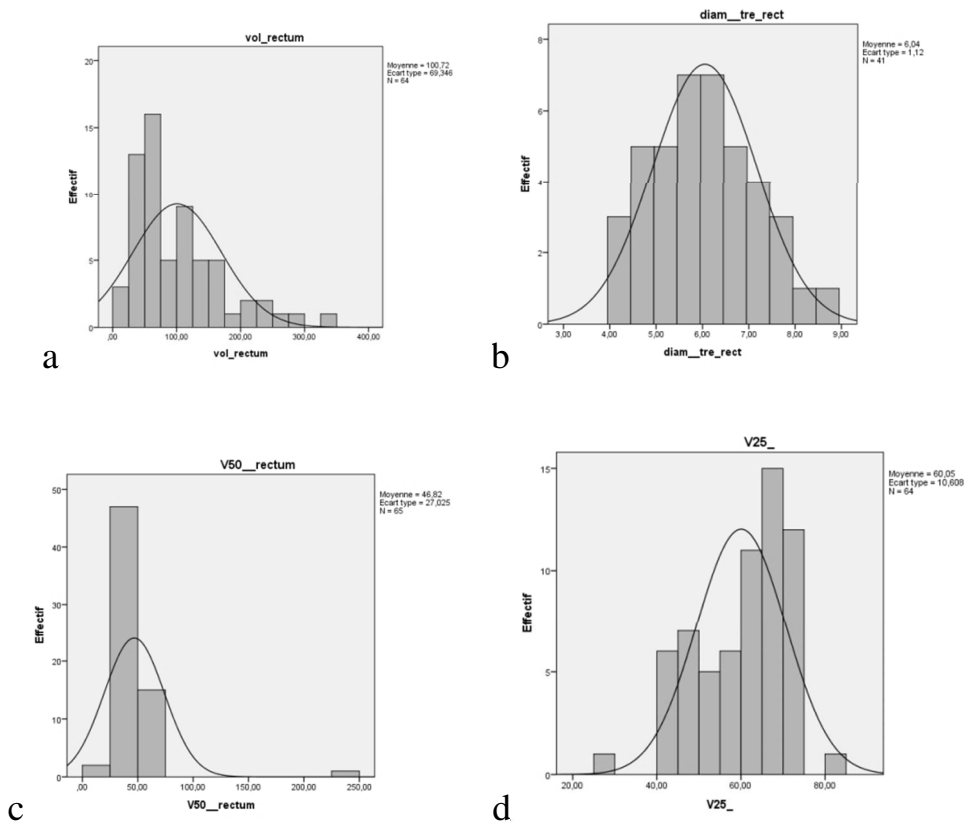


Figure S1 a to d: Gaussian Modeling distribution of rectal volume values (a), rectal diameter (b), V50Gy (c) and V25Gy (d).

PROCEDURE PRATIQUE POUR LA REALISATION D'UNE BIOPSIE CUTANEE A FIN D'ETUDE DE LA REPARATION DES LESIONS RADIO-INDUITES ET DE LA RECHERCHE D'UNE RADIO-SENSIBILITE ANORMALE

Précautions préalables obligatoires :

Vérification sérologique HIV, HVC, HVB et coagulation.
Informé le patient (lettre d'information et consentement éclairé écrit).

Matériel :

Chlorexidine Hibiscrub 4% (solution moussante)
Gluconate de chlorexidine alcoolique à 0,5%

Set de pansement

- Champ imperméable
- Pince kocher verte
- Pince à mors fins
- Tampons en gaze
- Compresse en non tissé

Punch à biopsie cutanée
Diamètre 4mm

Pieu BD Microlance 3
1,2*40 mm

Seringue
0,5*16 mm

Xylocaïne : lidocaïne, adrénaline Astrazenaca
1% adrénaline

Fil et porte-aiguille
Nylon (polyamide) 36'' 90 cm non résorbable

Pansement adhésif imperméable Tegaderm

Précautions pour la réalisation de la biopsie :

Pratiquer la biopsie en conditions d'asepsie totale.
Mains propres, port de gants stériles ainsi que d'une blouse.

Réalisation de la biopsie :

Préparer sur une tablette stable, dans des conditions d'asepsie soigneuses, les divers matériels nécessaires et le flacon de milieu (fourni dans le kit) destiné à accueillir la biopsie de peau (disposer d'un support adapté lors de l'utilisation pour éviter de le renverser).

Au niveau de la zone de peau concernée (zone non irradiée, non soumise à des tensions lors des mouvements : haut de la fesse, intérieur avant-bras), procéder aux étapes suivantes :

- Laver avec Chlorexidine Hibiscrub 4%, rincer, et sécher la peau.
- Désinfecter avec Gluconate de chlorexidine alcoolique à 0,5%.
- Planter le pieu muni de la seringue dans le flacon de xylocaïne, prélever 0,5 à 1mL.
- Remplacer le pieu par la seringue pour faire l'injection.
- Attendre 2 à 3 min après l'injection, le temps que l'anesthésiant fasse effet.
- Pour réaliser la biopsie, en conditions de grande asepsie locale, planter le punch Dermatologique et tourner jusqu'à la garde.
- Retirer le punch.
- Soulever le morceau de peau à l'aide de la pince à mors.
- Couper à l'aide de la lame.
- Placer le morceau de peau ainsi prélevé dans le flacon contenant le milieu de culture (Bien vérifier que la biopsie soit noyée dans le milieu), revisser serré et mettre du Parafilm.
- Faire un point de suture.
- Nettoyer la plaie à l'aide de chlorohexidine alcoolique.
- Appliquer un pansement adhésif imperméable.

Replacer le flacon contenant la biopsie à son emplacement dans le kit ainsi que les documents suivants :

- une copie non anonyme des sérologies
- une copie du consentement éclairé
- un bref résumé de l'histoire clinique
- les coordonnées du ou des praticiens à tenir au courant

Sceller le carton chrono médical et apposer le bordereau autocollant de retour pré-rempli.
Transmettre le paquet au vaguemestre ou à la personne mandatée par chronomédical si enlèvement sur demande.

REFERENCES DU MATERIEL UTILISE AU CHU MICHILLON, LA TRONCHE

Chlorexidine Hibiscrub 4% (solution moussante)
Gluconate de chlorexidine alcoolique à 0,5%

Mediset Hartmann

REF : 470299

Set de pansement 5857

Champ imperméable 38*45 cm

Pince Kocher verte

Pince à mors fins

5 tampons en gaze

5 compresses en non tissé 7,5*7,5 cm

Biopsy punch Stiefel

Diameter 4mm

Pieu BD Microlance 3

18G 1^{1/2}''

1,2*40 mm

REF : 304622

Seringue

BD Microlance 3

25G 3/8''

0,5*16 mm

REF 300600

Xylocaïne : lidocaïne, adrénaline Astrazenaca

1% adrénaline

Fil et porte-aiguille

4-0 SN644

MONOSOF*

Nylon (polyamide) 36'' 90 cm non résorbable

Pansement adhésif imperméable Tegaderm