



HAL
open science

Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés en radiothérapie

Valentin Calugaru

► **To cite this version:**

Valentin Calugaru. Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés en radiothérapie. Ingénierie biomédicale. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T064 . tel-00769946

HAL Id: tel-00769946

<https://theses.hal.science/tel-00769946>

Submitted on 4 Jan 2013

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.

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

2011

Numéro attribué par la bibliothèque

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Champ disciplinaire : Radiobiologie

École doctorale de rattachement : Cancérologie Biologie-Médecine-Santé (ED 418)

présentée et soutenue publiquement par

Valentin CALUGARU

le 24 octobre 2011

Titre

Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés en radiothérapie

Directeurs de thèse : M. le Dr FAVAUDON Vincent
et Mme le Dr MEGNIN-CHANET Frédérique

JURY

Président	M. le Pr	DEUTSCH	Eric
Rapporteur	M. le Dr	BISCHOFF	Pierre
Examineur	M. le Pr	NOËL	Georges
Examineur	M. le Dr	FOURQUET	Alain
Directeur de thèse	M. le Dr	FAVAUDON	Vincent
Directeur de thèse	Mme le Dr	MEGNIN-CHANET	Frédérique

« Si nul ne peut aujourd'hui nier que les problèmes que pose la Technique, que les moyens d'investigations puissants qu'elle met à la disposition de la Science, fécondent et stimulent la Recherche fondamentale, il est juste de dire que presque toutes les grandes innovations techniques ont eu leur origine dans les connaissances acquises et les découvertes effectuées dans les laboratoires de recherche fondamentale. En bref, la Science et la Technique se fécondent mutuellement et des liaisons les stimulant toutes deux doivent s'établir entre elles. »

Frédéric Joliot-Curie (1958)

Je dédie ce manuscrit

à mes filles Paula et Maria,

à mon épouse Corina,

pour leur soutien et parce que ce sont elles qui ont subi les contraintes de mon emploi du temps dû en partie à la réalisation de ce projet,

à mes parents.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Vincent FAVAUDON pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir guidé mes travaux sur un sujet qui me tient à cœur. Un grand merci pour sa disponibilité et pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences et de ses qualités scientifiques et humaines.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Madame le Docteur Frédérique MEGNIN-CHANET pour son aide précieuse, pour le temps passé à la paillasse à côté de moi et sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Eric DEUTSCH qui me fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur Jacques BALOSSO et à Monsieur le Docteur Pierre BISCHOFF pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour l'intérêt témoigné vis-à-vis de mon travail.

Un grand merci à Monsieur le Professeur Georges NOËL pour son grand cœur et parce que c'est lui qui m'a donné le goût pour la recherche et parce qu'il a été à l'origine de ce projet. Merci aussi d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Pierre BEY, à Monsieur le Docteur Alain FOURQUET et à Monsieur le Docteur Rémi DENDALE pour leur permanent soutien et pour avoir aménagé mon emploi du temps qui m'a permis de réaliser ce projet. Merci encore à Monsieur le Docteur Alain FOURQUET pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Un très grand merci à Madame le Docteur Catherine NAURAYE pour sa disponibilité et ses compétences et sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie Madame le Docteur Janet HALL de m'avoir permis de continuer mes travaux dans le laboratoire qu'elle dirige maintenant, pour tous ses conseils, pour son soutien dans mes moments difficiles.

Je remercie aussi Monsieur le Docteur Fabrice CORDELIÈRES pour son savoir-faire et pour son aide précieuse à la réalisation des macros qui m'ont permis d'interpréter mes résultats d'imagerie.

Je remercie aussi Monsieur le Docteur Denis BIARD pour sa gentillesse, pour avoir créé et avoir accepté de me fournir ses clones HeLa-KD utilisés dans cette étude.

Un grand merci à Marie VIDAL pour l'aide au calcul de la fluence ainsi que pour les discussions enrichissantes à propos de mes résultats.

Merci à Frédéric POUZOULET pour tous ses conseils, ainsi que pour les discussions enrichissantes autour des protons.

Je tiens à remercier Nicole GIOCANTI qui a dirigé mes premiers pas dans la recherche. J'ai été ravi de travailler avec toi, j'ai apprécié ta gentillesse et ta disponibilité.

J'exprime ma plus profonde gratitude à l'équipe de physique et à l'équipe technique de l'ICPO, ainsi qu'à toute l'équipe INSERM U612 pour l'aide apportée à ce projet, pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Je ne peux pas les remercier nominativement car j'ai peur de faire des oublis, et je m'en voudrais car nombreuses sont ces personnes pour lesquelles je garde beaucoup d'estime et une profonde reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BER	Réparation par excision de base (<i>Base Excision Repair</i>)
BET	Bromure d'éthidium
BLM	Hélicase Bloom
B-NHEJ	<i>Back-up NHEJ</i>
BRCA	<i>Breast cancer associated protein</i>
BSA	Sérumalbumine bovine
CDB	Cassure double-brin
CHEF	<i>Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis</i>
Chk 1/2	Checkpoint kinase 1/2
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CSB	Cassure simple-brin
D ₃₇	Dose pour laquelle la survie est égale à 1/e ≈ 0,37
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phénylindole
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
D-NHEJ	<i>DNA-PK dependent NHEJ</i>
EBR	Efficacité Biologique Relative
EBV	Epstein-Barr Virus
ECP	Electrophorèse en champs pulsés
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ERCC	<i>Excision Repair Cross-Complementing</i>
eV	Electron Volt
FAR	<i>Fraction of Activity Released</i>
Fpg	Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gy	Gray
HBSS	Solution tamponée saline de Hank (<i>Hank's Balanced Salt Solutions</i>)
HMG	<i>High-Mobility Group Protein 1</i>
HPV	Virus du papillome humain (<i>Human papillomavirus</i>)
ICPO	Institut Curie – Centre de Protonthérapie d'Orsay
ICRU	<i>International Committee on Radiological Units</i>

KD	<i>Knock-Down</i>
LEM	<i>Local Effect Model</i>
LMDS	<i>Locally Multiply Damaged Sites</i>
LPR	<i>Long patch repair</i>
MMR	Réparation des mésappariements de bases (<i>Mismatch Repair</i>)
MMS	Méthyl-méthanesulfonate
MRN	Complexe Mre11-Rad50-NBS1
NER	Réparation par excision de nucléotide (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NHEJ	Réparation par suture non-homologue (<i>Non Homologous End-Joining</i>)
Nth	Endonucléase III
Ogg1	8-oxoguanine-DNA glycosylase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase – Like Protein Kinase</i>
PNK	Polynucléotide kinase
PS	Phosphatidylsérine
RH	Recombinaison homologue
RI	Radiations ionisantes
RPA	<i>Replication Protein A</i>
rpm	Rotation par minute
SCGE	<i>Single-Cell Gel Electrophoresis</i>
SDS	Lauryl sulfate
SF2/SF3	Fraction des cellules survivantes après une exposition à la dose de 2 Gy/ 3 Gy
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SOBP	<i>Spread-Out Bragg Peak</i>
SPR	<i>Short patch repair</i>
SSA	<i>Single-strand annealing</i>
SSBR	<i>Single-strand break repair</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TEL	Transfert d'énergie linéaire
V(D)J	Système de réarrangement des gènes V (<i>Variable</i>), D (<i>Diversity</i>) et J (<i>Joining</i>)
WRN	Hélicase Werner
XLF	XRCC4-Like factor
XRCC	<i>X-ray cross complementing protein</i>

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
SOMMAIRE	8
1. OBJECTIFS DE LA THESE.....	11
2. INTRODUCTION	15
2.1. Les différents types de rayonnements ionisants	16
2.1.1. Les rayonnements électromagnétiques	16
2.1.2. Les rayonnements particuliers	18
(i) Les rayonnements α	18
(ii) Les rayonnements β	18
(iii) Les électrons.....	19
(iv) Les neutrons	20
(v) Les ions accélérés	20
2.2. Les Protons et le Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie à Orsay (ICPO)	22
2.2.1 Le Centre de Protonthérapie d'Orsay – Historique (à lieu unique, histoire unique)	22
2.2.2 Intérêt des protons en radiothérapie	25
2.2.3 Génération des faisceaux de protons	25
2.2.4 Indications cliniques.....	26
(i) Mélanomes de l'iris et de la choroïde et hémangiomes de la choroïde	26
(ii) Tumeurs de la base du crâne	27
(iii) Pédiatrie	29
2.3. Définition de l'Efficacité Biologique Relative (EBR)	31
2.4. Transfert d'énergie linéique (TEL)	34
2.4.1 Définition.....	34
2.4.2 Lésions caractéristiques des rayonnements de TEL élevé	35
2.5. Les effets chimiques et biologiques des RI	36
2.5.1 Les réactions chimiques	36
2.5.2 Effets des RI sur l'ADN.....	37
(i) Dommages de bases (DB).....	38
(ii) Cassures simple-brin (CSB).....	38
(iii) Cassures double-brin (CDB).....	39
(iv) Pontages de l'ADN	39
(v) Dommages multiples localisés (<i>Locally Multiply Damaged Sites</i> , LMDS).....	40
2.5.3 Effets des RI au niveau cellulaire	40
2.6. Les différents systèmes de réparation de l'ADN chez les eucaryotes	42

2.6.1	Réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)	44
(i)	Réparation des CDB par suture non-homologue (NHEJ)	45
(ii)	Réparation des CDB par recombinaison homologue (RH)	47
3.	MATERIELS ET METHODES	53
3.1.	Lignées cellulaires	54
3.2.	Culture de cellules	56
3.3.	Protocoles d'irradiation	56
3.3.1	Irradiation gamma	56
3.3.2	Irradiation par les protons - Montage et constitution des faisceaux	57
3.4	Détermination de la survie clonogénique	63
3.4.1	Courbes de survie cellulaire in vitro:	65
3.5	Electrophorèse en champs pulsés (ECP).....	66
3.5.1	Principe.....	66
3.5.2	Méthode utilisée.....	66
3.6	Electrophorèse de l'ADN en microgel (Comet assay).....	71
3.6.1	Méthode utilisée.....	73
(i)	Préparation des lames	73
(ii)	Préparation des cellules dans l'agarose.....	73
(iii)	Etape de lyse.....	73
(iv)	Digestion enzymatique	73
(v)	Electrophorèse.....	73
(vi)	Révélation.....	74
(vii)	Lecture sous microscope	74
3.7	Elution alcaline de l'ADN sur filtre.....	74
3.7.1	Généralités	74
3.7.2	Matériel pour l'élution alcaline	75
3.7.3	Tampons utilisés pour l'élution alcaline	76
3.7.4	Protocole	76
3.8	Immunofluorescence.....	77
3.8.1	Culture des cellules, traitements.....	77
3.8.2	Fixation	77
3.8.3	Perméabilisation	78
3.8.4	Immunomarquage	78
3.8.5	Montage	78
3.8.6	Observation	78
4.	RESULTATS - DISCUSSION.....	79
4.1	1^{ère} PARTIE	80
	Efficacité biologique relative (EBR) des deux faisceaux de protons de 76 MeV et 201 MeV du Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie à Orsay (ICPO)	80

4.1.1	Introduction.....	81
4.1.2	Résultats - Article.....	83
4.1.3	Discussion – Conclusions 1ère partie.....	92
(i)	EBR pour la survie cellulaire.....	92
(ii)	Considérations microdosimétriques.....	93
(iii)	Dommages de l’ADN.....	94
4.2	2^{ème} PARTIE.....	96
	Analyse de la nature et des mécanismes de réparation des lésions induites par les protons	96
4.2.1	Introduction.....	97
4.2.2	Résultats.....	98
(i)	Détermination des CSB par électrophorèse en microgel (<i>Comet assay</i>).....	98
(ii)	Etude des CSB par la méthode d’élution alcaline sur filtre.....	100
(iii)	Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes.....	103
(iv)	Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes pour le BER.....	105
(v)	Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes pour le NHEJ.....	107
(vi)	Etude des foci de pATM, γ H2AX et pArtemis par immunofluorescence.....	113
4.2.3	Discussion 2 ^{ème} partie.....	117
(i)	Etude des CSB.....	117
(ii)	Analyse des mécanismes de réparation des lésions radio-induites par les protons.....	118
(iii)	Interprétation en termes de microdosimétrie.....	119
5.	CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES	124
	BIBLIOGRAPHIE	127
	ANNEXES.....	141

1. OBJECTIFS DE LA THESE

Dans une certaine mesure, on pourrait dire que la radiothérapie est née avec la découverte quasi concomitante des rayons X et de la radioactivité. Il a néanmoins fallu expérimenter l'effet des rayonnements sur les tissus (rayonnements émis par les tubes ou « curiethérapie » par radium, par exemple) pour que la radiothérapie prenne son essor, par une association entre médecins « pionniers » et physiciens, le couple le plus célèbre étant celui formé autour des années 20 par Marie Curie et Claudius Regaud.

L'essor de la radiothérapie est lié à une double évolution:

- Dans le domaine médical, la compréhension approfondie de l'effet des rayonnements sur les tissus, le fractionnement, l'étalement ainsi que l'accumulation d'expérience clinique dans les traitements (doses curatives pour certaines tumeurs, doses limites pour les organes critiques).
- Dans le domaine de la physique et de la technologie, l'évolution des machines produisant des rayons : l'apparition du cobalt, les premiers accélérateurs de particules (électrons et rayons de haute énergie), le développement des bras isocentriques (rotation du faisceau autour du patient) et bien sûr les progrès considérables de la dosimétrie prévisionnelle (simulation du traitement) et expérimentale (mesure de la dose et contrôle du traitement).

La radiothérapie traite aujourd'hui annuellement plusieurs millions de personnes dans le monde et reste une modalité majeure dans le traitement du cancer (60 % des patients reçoivent une radiothérapie en France, soit environ 180.000 patients, et elle permet 40 % des guérisons, seule ou en association). Elle est actuellement en expansion, sous l'effet des progrès importants dans l'imagerie et dans les techniques de délivrance de la dose.

Au sein de la radiothérapie, la radiothérapie externe a connu ces dernières années une évolution majeure. L'amélioration de la précision balistique et ainsi de la distribution de la dose physique grâce au développement de nouvelles technologies a fait office de pierre angulaire au succès de la radiothérapie moderne. La dose peut désormais être délivrée au millimètre près grâce à la radiochirurgie ou se conformer à des cibles de géométrie complexe via la modulation d'intensité classique et la tomothérapie, ou encore s'adapter aux mouvements du patient et des organes internes (asservissement à la respiration, radiothérapie guidée par l'image).

L'utilisation des propriétés balistiques et biologiques de certaines particules (protons, ions carbonés etc.) a pu accroître encore l'effet différentiel tumeur-tissus sains. Ainsi une nouvelle branche de la radiothérapie est née, l'hadronthérapie. Celle-ci ouvre des nouvelles possibilités de traitement mais soulève aussi beaucoup de questions sur les propriétés biologiques de ces particules, sur leur effet à court et à long terme sur les tissus tumoraux et sur les tissus sains.

Depuis maintenant une décennie, l'équipe de l'U612 Inserm a fait de l'étude de l'efficacité biologique des faisceaux de protons et de la caractérisation des lésions induites par les protons un de ses principaux axes de recherche.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de thèse.

L'équipe de *Radiobiologie Moléculaire et Cellulaire* du Dr. Vincent Favaudon au sein de l'U350 Inserm a commencé à s'intéresser en 2001 à la variation de l'efficacité biologique relative (EBR) en fonction de la profondeur dans le SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*). Lorsque je suis arrivé au laboratoire, une première série de mesures de la survie clonogénique avait été réalisée avec le Pr Georges Noël sur des cellules V79 et HeLa irradiées à différentes positions dans le SOBP du faisceau médical de 76 MeV du Centre de protonthérapie d'Orsay, montrant une augmentation significative de l'EBR dans la région distale du SOBP.

Le sujet qui m'a été proposé portait de ces observations.

Dans la pratique clinique, les différents centres de protonthérapie à travers le monde utilisent une efficacité biologique relative générique (EBR) des faisceaux de protons de haute énergie estimée à 1,10 (c'est à dire 10% supérieure à celle des photons du Cobalt-60). Cette valeur a été déterminée par la mesure de la régénération des cryptes intestinales chez la souris après exposition à une dose unique de l'ordre de 15 Gy [80]. Cette méthode est contestable en raison du modèle et de la non-linéarité de la réponse en fonction de la dose. Dans mon étude je présente les variations de l'EBR avec la profondeur dans le SOBP en fonction de l'énergie des faisceaux médicaux utilisés à l'Institut Curie – Centre de Protonthérapie d'Orsay (ICPO).

Afin de reprendre le problème à la base, j'ai analysé sur des lignées cellulaires humaines normales (IMR90) et tumorales (SQ20B et HeLa) l'effet des protons mis en œuvre dans les deux faisceaux (76 et 201 MeV) du Centre de protonthérapie de l'Institut Curie. Les expériences ont porté sur deux points :

- La comparaison de la survie au rayonnement de différentes lignées cellulaires en fonction de la dose et de la nature du rayonnement (photons *vs.* protons) aux mêmes positions.
- L'incidence des cassures double-brin radio-induites de l'ADN en fonction de la position dans le SOBP pour les deux faisceaux de 76 et 201 MeV.

Les résultats ont fait apparaître une différence inattendue de la valeur de l'EBR relative à la survie au rayonnement dans la partie distale du SOBP en fonction de l'énergie incidente. De manière tout aussi inattendue, les données ont montré l'absence de corrélation entre l'EBR pour la survie et l'incidence des cassures double-brin de l'ADN mesurées par électrophorèse en champs pulsés, ce qui pose la question de la nature des lésions létales dans ces conditions.

Les résultats s'éclairent à la lumière des études de microdosimétrie développées, notamment, par une équipe de l'Université de Pavie [18]. Basés sur un modèle de la structure de la chromatine, les calculs effectués par les auteurs ont permis de préciser le concept de *dommages multiples localisés* de l'ADN (*LMDS*).

La première approche que nous avons mise en œuvre pour l'étude des *LMDS* a consisté en la détermination par immunofluorescence des cinétiques de recrutement aux sites de dommages des protéines (pATM, γ H2AX, Artemis) effectrices de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par la voie du NHEJ. On sait que la détection des CDB arme

une cascade de signalisation qui se traduit par la phosphorylation d'un ensemble de protéines dont les plus typiques sont pATM et γ H2AX. Les formes phosphorylées de ces protéines s'agrègent en *foci* détectables par immunofluorescence et dont les cinétiques de formation et de déclin dépendent de la structure des lésions de l'ADN [45]. Cette propriété nous donne des informations sur la nature des lésions de l'ADN dans les régions de plus fort transfert d'énergie linéique (TEL), c'est à dire dans la partie distale du SOBP. J'ai étudié également la réponse de lignées dans lesquelles des défauts de réparation ont été introduits par répression spécifique de gènes de réparation au moyen d'une approche par interférence ARN.

Les données expérimentales montrent que la fluence des particules est un paramètre dont il faut tenir compte dans la région distale du SOBP. L'intégration de ces données dans les logiciels de dosimétrie, qui ne prennent en considération pour le moment que la dose physique moyenne, pourrait permettre de prévenir les surdosages dans les zones situées à proximité de la partie distale des faisceaux, et surtout d'anticiper les effets liés au changement à venir de la méthodologie de construction des faisceaux (*pencil beam scanning, ou spot scanning*).

2. INTRODUCTION

2.1. Les différents types de rayonnements ionisants

Le noyau d'un certain nombre d'éléments naturels ou artificiels est instable. Il se transforme en émettant des particules ou des photons pour donner un nouveau noyau qui est le plus souvent stable. Ce phénomène constitue la désintégration radioactive. On distingue parmi les radioéléments (radionucléides) naturels ceux dont la période (demi-vie) est supérieure à l'âge de la terre (^{232}Th , ^{235}U , ^{238}U), ceux qui dérivent des précédents par filiation (ex. ^{226}Ra) et ceux, à période plus courte, qui sont formés par interaction entre les molécules de la haute atmosphère et les rayonnements cosmiques, les plus importants étant ^3H et ^{14}C .

Les radiations ionisantes (RI) sont des rayonnements qui possèdent une énergie associée supérieure à 30 électron-volt (eV), seuil au-dessus duquel ils peuvent arracher un électron aux atomes qui constituent le matériau. Les RI comprennent :

- Des particules chargées (α (^4_2He), β^+ (positrons), β^- (électrons), électrons relativistes, ions) ou non chargées (neutrons). Ces particules peuvent être animées d'une vitesse élevée, du même ordre de grandeur que celle de la lumière dans le cas des β^+ ou β^- .

- Les rayonnements électromagnétiques (photons) de haute énergie (rayons X et γ).

Les radiations d'énergie inférieure à 10 eV ne provoquent pas d'ionisations. Elles sont cependant capables de transférer leur énergie au cortège électronique des atomes du milieu pour les porter dans un état excité. Les rayonnements ultra-violetts appartiennent à cette catégorie.

L'interaction des rayonnements avec la matière est caractérisée par leur libre parcours moyen et leur transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL représente, en un point de la trajectoire d'une particule ionisante, la densité d'énergie absorbée par le milieu rapportée à l'unité de longueur de la trajectoire : on l'exprime usuellement en keV/ μm . Le TEL dépend du type de rayonnement et de son énergie. Par exemple, les rayonnements particuliers ont un TEL plus élevé que les rayonnements électromagnétiques, mais le TEL d'électrons d'énergie > 2 MeV ($\approx 0,2$ keV/ μm) est très voisin de celui des photons de même énergie. L'énergie déposée par le rayonnement dans la matière est exprimée en Gray (1 Gy = 1 Joule/kg = 100 rad).

Nous allons décrire plus en détail chaque type de RI, ainsi que leurs principales caractéristiques.

2.1.1. Les rayonnements électromagnétiques

On distingue deux types de rayonnements électromagnétiques : les rayons γ et les rayons X. Les rayons γ sont émis lors de la désintégration de certains noyaux atomiques, tandis que les rayons X proviennent du cortège électronique des atomes. Les faisceaux de rayons X sont produits par collision d'électrons accélérés avec une cible (Bremsstrahlung) ou lorsque des faisceaux d'électrons relativistes se voient imposer un changement de direction par l'action d'un champ magnétique (rayonnement synchrotron). Les rayons X de faible

énergie (< 450 keV) produits par des tubes de Crookes sont utilisés en radiodiagnostic. Les rayons X de haute énergie (5-20 MeV) produits par des accélérateurs linéaires d'électrons sont utilisés en radiothérapie. Certains accélérateurs utilisés en physique procurent des énergies de plusieurs GeV.

Les rayonnements électromagnétiques sont dotés d'un TEL faible et à peu près constant entre 30 MV (0,28 keV/μm) et 1 MV (0,36 keV/μm) mais qui augmente rapidement aux basses énergies (2,6 keV/μm à 200 kV). Avec les photons on ne parle pas de parcours dans la matière, mais d'atténuation. En effet, le photon, contrairement à la particule, ne cède pratiquement pas d'énergie le long de sa trajectoire : il interagit avec la matière et y est absorbé quantitativement avec une probabilité qui dépend du numéro atomique et de la densité du matériau. C'est pourquoi chaque matériau possède un pouvoir atténuateur qui lui est propre.

Lors de l'interaction entre un photon et la matière, trois effets majeurs peuvent se produire. Leur proportion dépend du matériau traversé et de l'énergie du photon incident.

- **L'effet photoélectrique** : l'énergie du photon est absorbée par un électron de la couche interne d'un atome, qui va être éjecté [39,87]. Il s'ensuit une réorganisation du cortège électronique de l'atome, avec éventuellement la production d'électrons Auger.

- **L'effet Compton** : l'énergie du photon est transférée en partie à un électron des couches périphériques de l'atome cible, avec émission d'un électron secondaire possédant l'énergie échangée dans l'interaction. La diffusion Compton domine dans le domaine des énergies intermédiaires (quelques dixièmes de MeV à quelques MeV).

- **L'effet de production de paire** : le photon interagit avec le noyau des atomes, créant ainsi l'émission d'une paire positon/négaton (émission β^+/β^-). Le positon s'annihile ensuite en créant deux photons de 511 keV. L'énergie du photon incident doit être supérieure à 1,022 MeV pour que ce phénomène se produise. La production de paire d'électron/positron est le mécanisme dominant pour des énergies au-delà de 5 MeV.

Deux autres mécanismes secondaires peuvent se produire suite à la l'interaction entre les photons et la matière :

- la production photonucléaire,
- la diffusion Rayleigh

Les interactions photonucléaires interviennent entre un photon d'énergie d'au moins quelques MeV et le noyau. Le résultat est la production d'un proton et d'un neutron. La contribution aux doses déposées, due aux réactions de photoproduction (γ, n), est négligeable pour des photons d'énergie inférieure à 10 MeV et pour des éléments de faible numéro atomique Z .

La diffusion cohérente Rayleigh est une diffusion élastique du photon sur un électron atomique. L'énergie du photon reste inchangée du fait que le photon est diffusé par l'ensemble de l'atome sans transfert d'énergie.

Lors de mon travail de thèse, les cellules ont été irradiées au moyen d'une source ^{137}Cs délivrant des rayons γ monochromatiques à une énergie nominale de 662 keV (TEL 0,91 keV/μm) à une profondeur équivalent eau de 3,5 mm assurant l'équilibre électronique. L'EBR

de ce rayonnement est égale à 1,07 par rapport à l'émission du rayonnement photonique de référence (Cobalt-60) [58].

2.1.2. Les rayonnements particuliers

(i) Les rayonnements α

Les rayonnements α sont des particules d'hélium (${}^4_2\text{He}$) éjectées de noyaux instables ou accélérés dans des cyclotrons. On peut résumer la désintégration α comme une fission nucléaire où le noyau père se scinde en deux noyaux fils dont l'un est un noyau d'hélium. On peut prendre comme exemple la désintégration de l'uranium 238 : ${}^{238}_{92}\text{U} \rightarrow {}^{234}_{90}\text{Th} + \alpha$.

Les particules α issues de la désintégration de noyaux radioactifs possèdent en général une énergie < 10 MeV. Ces particules ont un fort TEL mais une pénétration faible (quelques centimètres dans l'air). Elles sont donc très vite arrêtées par la matière, une simple feuille de papier ou la couche cornée de la peau y suffisent. Ainsi les particules α ne présentent pas de danger lors d'une exposition externe. En revanche, elles sont fortement délétères en cas de contamination interne, c'est à dire lorsqu'une particule radioactive émettrice α est intégrée dans l'organisme, car une seule particule α peut créer des lésions majeures dans le noyau d'une cellule. On peut citer à cet égard les contaminations par inhalation de radon, responsables de cancers pulmonaires au terme d'une exposition chronique prolongée.

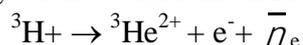
(ii) Les rayonnements β

La radioactivité β est un type de désintégration dans laquelle une particule β est émise. On parle de désintégration β^- ou β^+ selon que la particule émise est un électron ou un positron (antiparticule de l'électron).

Désintégration β^-

Un neutron est converti en proton par l'intermédiaire de la force nucléaire faible avec émission d'une particule β^- et d'un anti-neutrino : $n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}_e$.

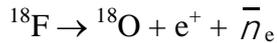
Le spectre d'énergie des β^- est continu (0-3 MeV) en raison du partage de l'énergie entre les trois corps. Il n'y a pas d'énergie minimale. On peut prendre comme exemple la désintégration du Tritium en Hélium-3 :



Désintégration β^+

Un proton est converti en neutron par l'intermédiaire de la force nucléaire faible avec émission d'une particule β^+ (un positron) et d'un neutrino : $p \rightarrow n + e^+ + \nu_e$.

Le spectre d'énergie est continu pour les mêmes raisons que les β^- . Il y a cependant une vitesse minimale des positrons due à la répulsion coulombienne avec le noyau. On peut prendre comme exemple la désintégration du ^{18}F :



Le parcours des β^+ est très limité en raison de leur annihilation par rencontre avec les électrons présents dans le milieu. Cette annihilation produit deux photons colinéaires d'énergie 511 keV. La détection en coïncidence spatio-temporelle de ces deux photons est à la base de la tomographie par émission positron.

(iii) Les électrons

Un électron qui traverse un milieu matériel perd progressivement son énergie cinétique au cours d'interactions avec les noyaux des atomes qui constituent ce milieu et avec leur cortège électronique. Cette perte d'énergie s'accompagne d'un ralentissement, d'une diffusion et d'un transfert d'énergie aux atomes du milieu. La collision entre un électron en mouvement et un électron périphérique d'un atome se traduit en effet par un partage entre les deux électrons de l'énergie E du premier. Les électrons du milieu sont ainsi mis en mouvement, laissant un atome ionisé, et créent à leur tour des ionisations en cascade.

Les électrons relativistes (5-20 MeV) produits par des accélérateurs linéaires d'électrons sont parfois utilisés en radiothérapie. Lorsque la cible est constituée d'un matériau de numéro atomique élevé, le transfert d'énergie se fait par freinage (Bremsstrahlung) et donne lieu à la génération de photons X. Les électrons cèdent progressivement leur énergie à la matière. A très haute énergie (> 10 MeV), le processus dominant est le rayonnement de freinage (Bremsstrahlung). Le phénomène, négligeable pour les particules lourdes, ne l'est plus pour les électrons compte tenu de leur faible masse. La contribution relative du Bremsstrahlung au ralentissement est ainsi de l'ordre de 0.3% pour des énergies de 1 MeV pour atteindre 3% pour des énergies de 10 MeV. Ce principe est appliqué dans les tubes cathodiques aussi bien que dans les accélérateurs utilisés en radiothérapie X.

A plus faibles énergies, la perte d'énergie est due principalement aux interactions avec les électrons de la cible.

On peut répertorier les interactions entre l'électron incident et les électrons de la cible en deux grandes catégories:

- les interactions inélastiques au cours desquelles une partie de l'énergie initiale est transférée à la cible. Selon la quantité d'énergie transférée, il peut en résulter soit une ionisation d'un atome en lui arrachant un ou plusieurs électrons, soit une excitation d'un atome qui pour se désexciter peut s'ioniser ou émettre un photon. Le photon créé peut ensuite arracher un électron plus loin par effet photoélectrique.

- les interactions élastiques au cours desquelles le transfert est exclusivement angulaire, l'énergie perdue étant dans ce cas extrêmement faible.

D'autre part, les électrons d'énergie < 10 eV, donc en-dessous de l'énergie nécessaire pour produire une ionisation, peuvent interagir avec les bases de l'ADN ou le

squelette sucre-phosphate par un processus d'attachement dissociatif [28,127] pour former des anions, susceptibles d'évoluer vers la formation de dommages chimiques irréversibles.

(iv) Les neutrons

Un neutron n'a pas de charge et sa masse est de 1.674×10^{-27} kg. Les neutrons, à la différence des particules chargées, ne peuvent être accélérés mais peuvent être ralentis par chocs successifs sur les noyaux de la matière traversée.

Les neutrons sont souvent classés selon leur énergie. On appelle:

- Neutrons rapides, les neutrons dont l'énergie est supérieure à 0.8 MeV.
- Neutrons épithermiques : $1\text{eV} \leq E_n \leq 0.8\text{ MeV}$.
- Neutrons thermiques les neutrons dont l'énergie est inférieure à 1 eV.

La plupart des interactions des neutrons rapides, avec les atomes du milieu sont des diffusions élastiques et des diffusions inélastiques. Pour les neutrons moins énergétiques, les captures radiatives et les réactions de fission et de fusion nucléaires deviennent dominantes.

Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes constituant le matériau traversé. Il en résulte deux types d'interactions :

- Capture : le neutron est absorbé par le noyau lui faisant gagner une unité de masse. Si le noyau résultant est instable, il va émettre un rayonnement particulaire ou électromagnétique pour revenir à un état stable.

- Diffusion : le neutron perd de l'énergie en la transférant à des protons de recul par un processus de collision dite élastique lorsque le noyau n'est pas modifié, ou inélastique lorsque l'état interne du noyau est modifié. Le retour à l'équilibre se fait par émission de plusieurs photons.

Dans une réaction de diffusion inélastique, la quantité de mouvement et l'énergie totale sont conservées, mais l'énergie cinétique, par contre, ne l'est pas. En effet, une partie de l'énergie cinétique du neutron incident est transformée en énergie d'excitation du noyau résiduel. La diffusion inélastique est donc une réaction à seuil: le neutron doit posséder une énergie cinétique suffisante pour exciter le noyau au moins jusqu'au premier niveau. Signalons enfin que la section efficace de diffusion inélastique augmente généralement avec l'énergie du neutron incident et avec la masse du noyau cible.

Dans la matière biologique, où l'eau est le constituant majeur, la plupart des interactions des neutrons produisent des protons de recul dans le milieu. Les ions de recul sont caractérisés par une haute valeur du TEL et de l'EBR. Cette propriété rend les neutrons redoutables du point de vue de la radioprotection.

(v) Les ions accélérés

Hormis l'électron ou le positron, les particules chargées sont des noyaux atomiques. On peut citer comme exemple l'hydrogène (protons H^+), le carbone (C^{6+}), le néon (Ne^{10+}).

Ces ions peuvent être accélérés par divers types d'accélérateurs : cyclotrons, synchrotrons, synchro-cyclotrons, accélérateurs linéaires.

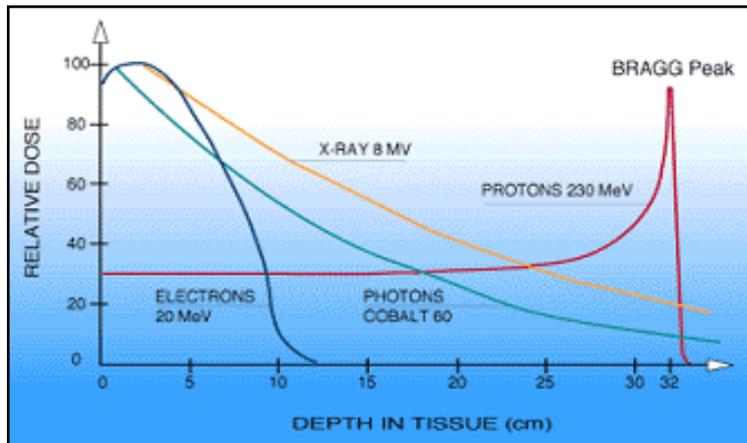


Fig. 1. Distribution de dose de différents types de rayonnement dans la profondeur d'un tissu [93].

Le proton est 1836 fois plus lourd que l'électron. A haute vitesse, il interagit peu avec la matière (peu d'influence des électrons rencontrés) et donc diffuse peu, ce qui explique que la pénombre latérale d'un faisceau de protons soit beaucoup plus faible que celle d'un faisceau de photons ou d'électrons. En revanche, à faible vitesse, le proton interagit fortement et perd toute son énergie résiduelle sur un faible parcours. Cette propriété génère une courbe de rendement en profondeur d'allure caractéristique (Fig. 1) connue sous le nom du "Pic de Bragg" par référence au physicien anglais William Bragg (1862-1942) qui l'a décrite en 1904 [30]. Les autres ions (ions carbone par exemple) génèrent également un pic de Bragg. La profondeur à laquelle celui-ci se forme est liée à la masse et à l'énergie de la particule incidente.

C'est le physicien américain Robert R. Wilson qui, en 1946, formula en premier l'idée d'utiliser les particules légères à des fins thérapeutiques [51,205] (on ne devrait parler d'ions lourds qu'au-delà de la troisième période du tableau de Mendeleïev). De fait, les faisceaux d'ions présentent des propriétés intéressantes pour le traitement de certains cancers. Dans le cas des protons, l'absence de dose en arrière du pic de Bragg permet d'éviter l'irradiation d'organes à risque (par exemple le tronc cérébral ou le chiasma optique) situés en arrière de la tumeur par rapport au port d'entrée du faisceau. Ceci permet de mieux cibler des tumeurs difficilement traitables en radiothérapie conventionnelle. C'est ainsi que le Centre de Protonthérapie d'Orsay-Institut Curie traite des mélanomes de la choroïde et des tumeurs du cerveau, notamment des tumeurs de la base du crâne. Par ailleurs, des centres anti-cancéreux d'hadronthérapie (traitement des cancers par faisceaux d'ions légers, essentiellement des ions carbone) ont vu le jour durant ces dernières décennies en Allemagne ou au Japon et plusieurs centres sont en projet ou en cours de construction.

2.2. Les Protons et le Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie à Orsay (ICPO)

2.2.1 Le Centre de Protonthérapie d'Orsay – Historique (à lieu unique, histoire unique)

Situé sur le campus universitaire de l'Université Paris XI à Orsay (Essonne), le Centre de Protonthérapie est à deux pas des laboratoires du Centre de Recherche de l'Institut Curie.

C'est un long chemin de près d'une quarantaine d'années qui a permis à ce fleuron de la physique nucléaire de se transformer en une machine de radiothérapie de pointe destinée aux patients.

L'histoire du centre de Protonthérapie prend sa source avec la construction du premier cyclotron français débutée en 1937 par Frédéric Joliot-Curie lors de son arrivée au Collège de France. Dans les années 50, pour équiper de moyens modernes les laboratoires de physique nucléaire de la Faculté des Sciences de Paris, un centre s'édifie sur le site d'Orsay à l'initiative de Frédéric et Irène Joliot-Curie. C'est ainsi que le Laboratoire de Physique et Chimie Nucléaire du Collège de France, que dirige Frédéric Joliot-Curie, y est transporté avec la plus grande partie de ses installations dont le fameux cyclotron.

En 1954, sur l'initiative d'Irène Joliot-Curie, la Faculté des Sciences de Paris commande à la société Philips pour le campus universitaire de Paris Sud un accélérateur de particules : le synchrocyclotron de 156 MeV qui entre en fonction le 4 juin 1958. Après de nombreuses années de bons et loyaux services en physique nucléaire, ce synchrocyclotron va être totalement restructuré à l'initiative du CNRS en 1975 et 1978. Et les changements ne s'arrêtent pas là pour cet accélérateur de particules, puisque devenu inutilisable pour la physique nucléaire moderne, désormais habituée à des machines plus puissantes, il sera (ré)adapté entre 1989 et 1991 à des fins d'utilisations médicales.

En 1990, le Centre de Protonthérapie d'Orsay est créé. Il est assimilé à une entité hospitalière et exploite désormais à 100 % le synchrocyclotron (Synchrocyclotron SC200). Cette création est le fruit de la concertation de quatre partenaires : l'Institut Curie, l'Institut Gustave Roussy (IGR), le centre René Huguenin et les Hôpitaux de l'Assistance Publique de Paris (APHP).

En avril 1991, le CPO réalise son premier traitement ophtalmologique, et en 1994, le premier traitement intracrânien est réalisé. L'accélérateur est désormais utilisé à une énergie de 201 MeV pour la protonthérapie des lésions intracrâniennes, et le faisceau est ralenti à une énergie de 76 MeV pour celle des mélanomes oculaires. L'instrumentation des salles de traitement permet de conserver au maximum la précision balistique du faisceau et des accessoires placés sur la ligne du faisceau permettant de conformer le faisceau à la forme des tumeurs à traiter.

En 1998, l'ouverture d'une seconde salle de traitement permet d'élargir les applications en rendant possible les traitements des patients en position couchée.

En 2002 à lieu l'accréditation du centre par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation des Etablissements de Santé

En 2003, les chiffres font état de 3000 patients traités. Le CPO se place alors au troisième rang mondial des centres de protonthérapie, et au premier rang européen.

En 2004, le syndicat inter-hospitalier est dissous. Le CPO est administrativement rattaché à l'Institut Curie et devient l'ICPO. Depuis, l'ICPO accueille toujours des patients provenant des hôpitaux partenaires du projet, à savoir l'Assistance Publique de Paris, l'Institut Curie, l'Institut Gustave Roussy, et le Centre René Huguenin.

L'installation du dispositif d'alternance rapide en 2005 a permis de réorienter le faisceau de protons d'une salle de traitement à une autre en moins de 2 minutes contre 20 minutes auparavant.

La mise en place de l'anesthésie générale en 2006 a permis de traiter les très jeunes enfants qui jusque-là devaient être envoyés à Villigen en Suisse ou à Boston aux Etats-Unis.

Entre 2007 et l'été 2010 ont lieu les travaux du nouveau centre de protonthérapie avec l'installation d'un accélérateur de protons de nouvelle génération (cyclotron C230 d'IBA - 230 MeV) (Fig. 2) et d'une nouvelle salle de traitement avec un bras isocentrique, en plus des deux salles existantes avec un faisceau fixe. L'acquisition d'un bras isocentrique permet actuellement d'orienter le faisceau autour du patient selon toutes les incidences pour traiter de nouvelles indications jusqu'à présent inaccessibles, notamment chez l'enfant. Cette structure mesure quelques 10 m de diamètre et pèse plus de 100 tonnes, mais elle permet un positionnement du faisceau avec une précision infra-millimétrique (Fig. 3).

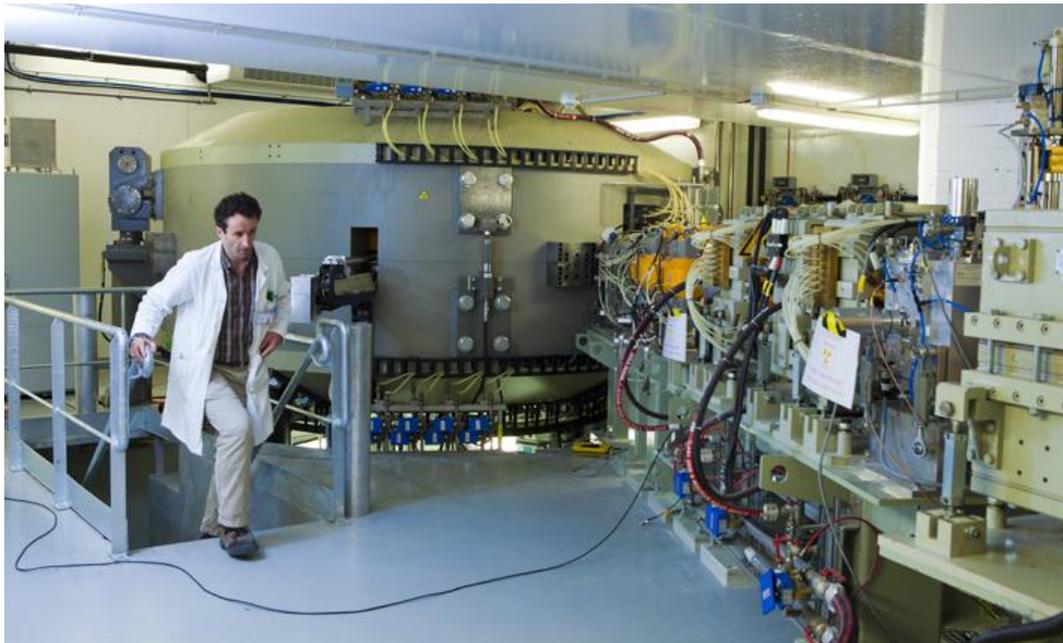


Fig. 2. Nouvel accélérateur de protons - le cyclotron C230 d'IBA (230 MeV)- © Noak/Le Bar Floréal/Institut Curie [93].

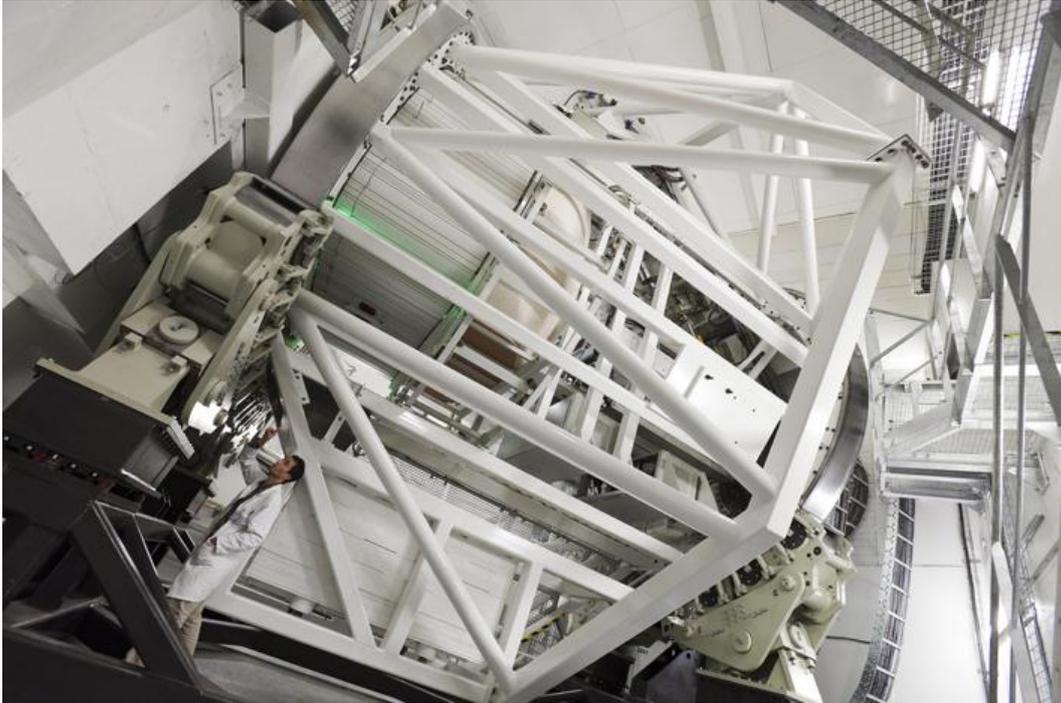


Fig. 3. Bras isocentrique - © Noak/Le Bar Floréal/Institut Curie [93].

L'ancien syncrocyclotron installé à partir de 1975 est toujours présent sur le site et pour l'instant conservé en état, mais il n'est plus utilisé depuis le 6 mai 2010 (Fig. 4 [93]).

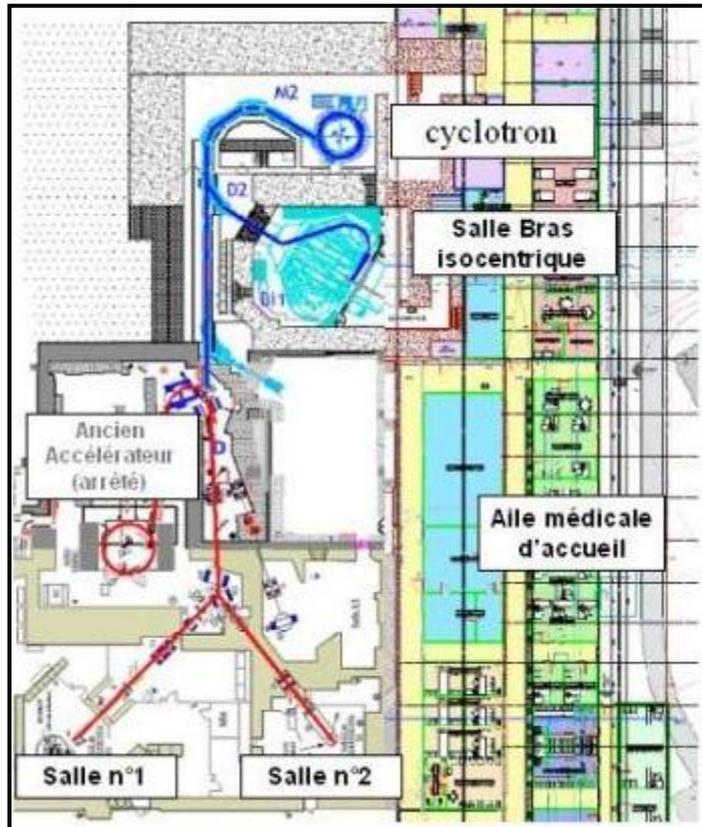


Fig. 4. Plan de l'ICPO en 2011 [93].

2.2.2 Intérêt des protons en radiothérapie

La protonthérapie exploite deux propriétés balistiques liées à l'interaction des faisceaux de protons avec la matière :

- Une faible dispersion latérale, conséquence de la diffusion limitée des protons au cours de leur trajectoire, conférant une pénombre réduite.

- Un dépôt d'énergie présentant un pic de Bragg, secondaire au dépôt d'énergie des protons en fin de parcours entraînant la chute distale de la dose au-delà du pic, de sorte que les tissus situés en arrière du pic de Bragg ne sont pas irradiés (Fig. 1). La profondeur du pic est parfaitement contrôlable en adaptant l'énergie des particules incidentes.

La précision balistique permet d'adapter chaque faisceau de protons pour conformer en trois dimensions la distribution de dose à la forme du volume-cible à irradier. Cette propriété permet d'augmenter les doses dans les volumes traités tout en minimisant la dose dans les tissus sains avoisinants et donc en diminuant le risque de complications.

La protonthérapie est donc une technique de choix dans la radiothérapie conformationnelle, tout particulièrement dans les cas où :

- La tumeur traitée est située au voisinage immédiat de structures critiques radiosensibles (voies optiques, moelle épinière etc.) [29,122,141].

- Il est important de minimiser la dose intégrale résiduelle dans l'ensemble des tissus sains environnants. Ceci est particulièrement important en pédiatrie, où il a été démontré que des doses considérées comme modérées dans les tissus sains pouvaient générer des séquelles à long terme [83,100,130,178].

2.2.3 Génération des faisceaux de protons

La masse élevée des protons (par rapport aux photons et aux électrons), leur charge, leur type d'interaction avec la matière leur confèrent des caractéristiques spécifiques biologiques et balistiques avantageuses en radiothérapie.

Un proton est produit par ionisation d'un atome d'hydrogène au moyen d'un arc électrique (induction d'un plasma à partir d'hydrogène gazeux). L'ionisation produit un proton et un électron. Grâce à un champ électrique, l'électron est capté par l'anode. Le faisceau de protons, convenablement focalisé, est introduit dans l'entrefer d'un puissant électro-aimant où il est accéléré par un champ électrique alternatif jusqu'à l'énergie souhaitée, puis extrait et véhiculé sous vide jusqu'à la cible choisie (appareils de mesure, patient, etc.).

Dans la pratique, deux grandes familles d'accélérateurs - cyclotrons ou synchro-cyclotrons - sont utilisées pour générer des faisceaux médicaux de protons. Deux fenêtres énergétiques sont utilisées en protonthérapie: une énergie de 65 MeV environ (parcours 35 mm dans l'eau), pour le traitement des tumeurs oculaires, et une énergie supérieure à 200 MeV (idéalement 235 MeV, permettant un parcours dans l'eau de 320 mm) pour le traitement de tumeurs profondes [139]. L'ICPO dispose de deux faisceaux d'énergie nominale 76 et 230

MeV, mais les résultats décrits ici ont pour la plupart été obtenus avec l'ancien synchro-cyclotron (76 et 201 MeV).

Le pic de Bragg (voir Fig. 1), qui caractérise le dépôt d'énergie par les protons, présente un gradient de dose très élevé en fin de parcours et un rapport dose-pic/dose-entrée important. Le pic de Bragg étant très étroit, il est nécessaire de l'élargir afin d'irradier la tumeur cible dans toute son épaisseur axiale et avec une dose bien définie dans tout le volume considéré. On y parvient en modulant l'énergie du faisceau pour créer un pic de Bragg dit "étalé" ou "modulé", plus souvent désigné par son acronyme anglais SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*). La manière dont on s'y prend pour constituer ce faisceau étalé sera décrite en détail au chapitre 3.3.2. On retiendra pour le moment que la géométrie du dispositif dépend de la largeur du champ d'irradiation et de l'énergie maximale nécessaire au volume cible à traiter. Deux indications cliniques ont été sélectionnées :

- Traitement des tumeurs ophtalmiques (diamètre maximal du champ d'irradiation 30 mm, profondeur maximale de traitement 32 mm équivalent eau).
- Traitement des tumeurs intracrâniennes (diamètre maximal du champ d'irradiation 120 mm, profondeur maximale de traitement 210 mm équivalent eau).

2.2.4 *Indications cliniques*

(i) **Mélanomes de l'iris et de la choroïde et hémangiomes de la choroïde**

La protonthérapie a été développée au Harvard Cyclotron Laboratory à Boston à partir de 1961. Fin 1995, 2000 patients y avaient été traités pour une tumeur ophtalmique avec un contrôle local de 96% et une conservation de l'œil dans 90% des cas [134].

Entre 1984 et 2007, plus de 4800 cas de mélanome oculaire ont été traités au Paul Scherrer Institute, à Villigen (Suisse), avec un contrôle local de 98% et 90% de conservation oculaire [94].

Dans la période de 1991 à 2001, 1406 patients présentant un mélanome de la choroïde ont été traités par protonthérapie au CPO avec un contrôle local de 96% à cinq ans. La probabilité de survie sans rechute locale ni métastases est de 80,6% à 5 ans [52]. Ces résultats excellents font que l'énucléation est devenue un traitement difficilement justifiable. Au mois de mars 2011, le nombre de patients ayant bénéficié à l'ICPO d'un traitement pour une tumeur oculaire s'élevait à 4347 (Fig. 5).

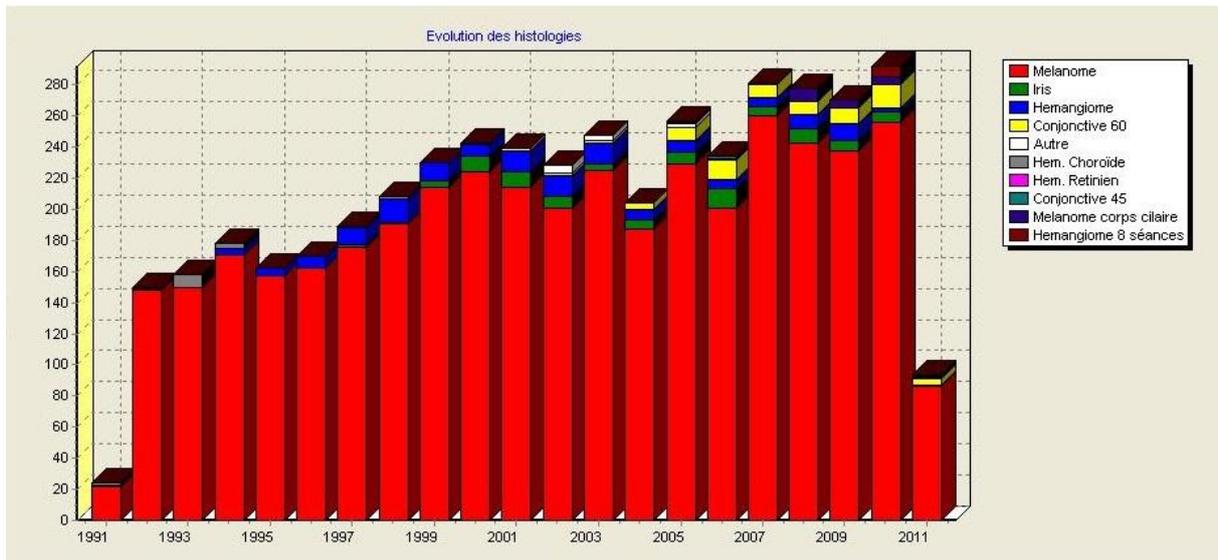


Fig. 5. Statistique des patients traités pour des tumeurs ophtalmiques à l'ICPO (jusqu'en mars 2011).

(ii) Tumeurs de la base du crâne

Le traitement de plusieurs types de tumeurs intracrâniennes prises en charge à l'ICPO a été validé par des essais thérapeutiques antérieurs (nationaux ou internationaux). D'autres sont en cours de validation. Dans la plupart des cas, la protonthérapie est la pierre angulaire du traitement.

Les tumeurs traitées actuellement sont les suivantes : chordomes, chondrosarcomes, certaines tumeurs osseuses rares, méningiomes ou tumeurs apparentées, récidives ou nouvelles tumeurs dans un lieu déjà irradié antérieurement, tumeurs du nasopharynx avec invasion de la base du crâne (classés T4N0M0), carcinomes adénoïdes kystiques des sinus envahissants la base de crâne, carcinomes adénoïdes kystiques de la glande lacrymale, et certaines autres tumeurs orbitaires. Prochainement, avec l'installation de la nouvelle machine et le bras isocentrique, de nouvelles pathologies pourront être prises en charge à l'ICPO comme les tumeurs de la fosse postérieure (médulloblastome).

De décembre 1993 à mars 2011, 1004 patients souffrant de chordome (390), chondrosarcome (139) ou méningiome (180) ont été traités à l'ICPO (Fig. 6).

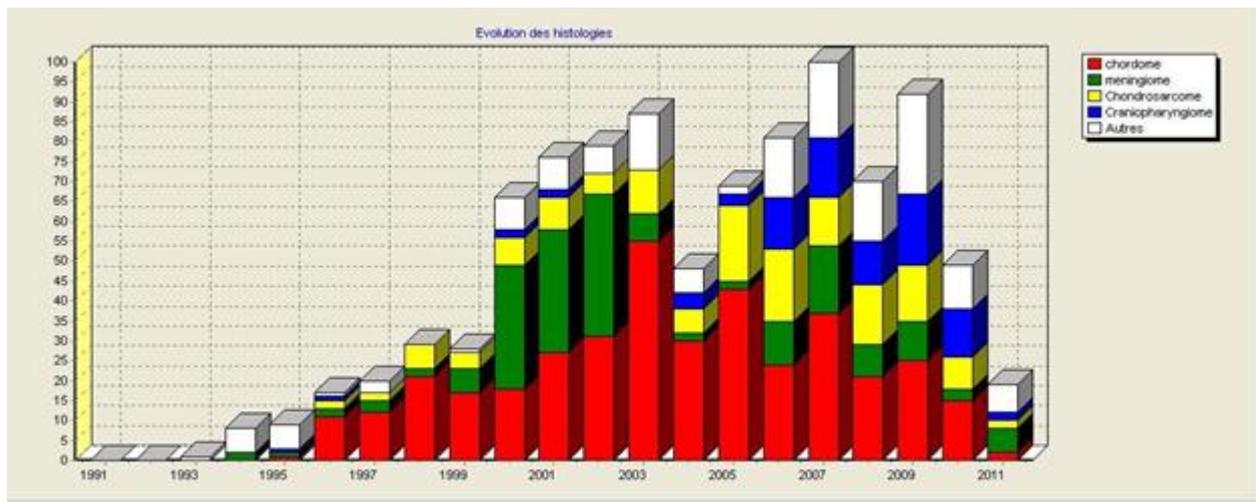


Fig. 6. Statistique des patients traités pour des tumeurs de la base du crâne à l'ICPO (jusqu'en mars 2011).

La juxtaposition de chondrosarcomes et chordomes à des structures anatomiques radiosensibles adjacentes (tronc cérébral, nerfs crâniens, hypophyse, chiasma) limite le niveau de la dose délivrée dans la tumeur à une dose tolérable pour ces organes à risque de complication. La dose acceptable dans ces organes est considérée classiquement comme étant de l'ordre de 55 Gy alors que la dose nécessaire à la stérilisation des tumeurs sus-citées est supérieure à 60-65 Gy. Avec une dose d'environ 55 Gy le contrôle local est très faible (< 40%). La précision de la technique d'irradiation par protons permet de délivrer une forte dose d'irradiation dans la tumeur avec une décroissance rapide de celle-ci au-delà du volume cible (de l'ordre de 10% par mm, Fig. 7). Avec l'augmentation de dose à la tumeur permise par la protonthérapie, le taux de contrôle local à 3 ans pour les chordomes et les chondrosarcomes, tumeurs réputées radiorésistantes est, respectivement de 69 et 92%. Les taux de survie globale à 3 ans sont, respectivement, de 90 et 96%. Ces résultats se comparent favorablement à ceux de la littérature [50,89,137,138,142,143].

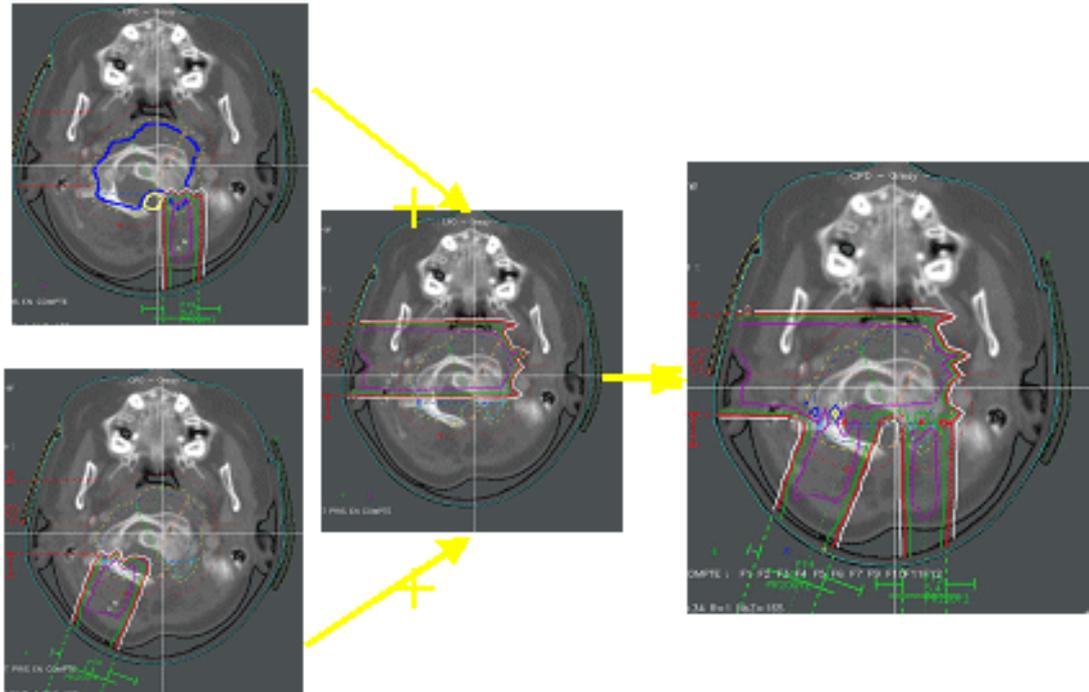


Fig. 7. Technique d'irradiation d'un chordome avec protection du tronc cérébral [93].

En ce qui concerne les méningiomes cérébraux, une étude faite sur 51 patients atteints de méningiomes bénins irradiés au CPO entre 1994 et 2002 indique des taux de contrôle local et de survie globale à 4 ans, respectivement, de 98% et 100% [136]. Entre 1999 et 2006, 24 méningiomes malins ont été traités à l'ICPO avec un taux de contrôle local et une survie globale à 4 ans de 61,3% et 65,3% [26].

(iii) Pédiatrie

La protection des organes critiques est primordiale chez les enfants. En effet, il est largement reconnu que le risque de complications est majeur lors de l'irradiation de tissus sains de l'enfant. Ce risque de complication dépend aussi de la dose et du volume irradié.

La radiothérapie pédiatrique est perçue comme une arme à double tranchant. La plupart du temps apte au contrôle local des tumeurs, elle laisse malheureusement planer une menace à long terme sur l'enfant : de nombreuses études soulignent sa responsabilité dans les retards de croissance, les déficits neurosensoriels, les perturbations cognitives, esthétiques, endocrines et l'atteinte de la fertilité [74,83,149,168]. La protonthérapie présente un intérêt potentiel considérable fondé sur un concept simple : par comparaison avec les photons, la balistique dosimétrique des protons est presque invariablement améliorée. L'impact le plus attendu en est une diminution des complications et séquelles tardives. La protection des cochlées et de l'hypophyse est particulièrement frappante dans le cas de tumeurs intéressant la fosse postérieure, telles que les médulloblastomes et les épédyomes [82]. On parvient à une protection satisfaisante de ces structures pour des tumeurs de voisinage, gliomes de la

voie optique [65] et crâniopharyngiomes [126] ; le parenchyme cérébral est également protégé, notamment les lobes temporaux dont la D50 (dose délivrée à 50 % du volume) diminue de 40 % [65], et le volume irradié de 20 à 40 Gy, de moitié [126]. Miralbell *et al.* ont estimé que le risque de perte du QI à huit ans (de l'ordre de dix points), passe ainsi de 30 à 2%, voire moins [129].

Les tumeurs intraorbitaires, essentiellement les rétinoblastomes et rhabdomyosarcomes, sont tout aussi délicates à traiter étant donné la multitude des structures à protéger et la nécessité d'une mise en place de l'enfant sous anesthésie générale dans la plupart des cas. S'y ajoutent des problèmes d'immobilisation de l'œil encore imparfaitement maîtrisés et de positionnement de certains faisceaux lorsque l'on ne dispose pas d'une source isocentrique. Une récente étude de Boston [209] a montré une réduction d'environ 20 à 40 % de la dose pour les structures homolatérales de proximité (rétine, nerf optique, cadre osseux, cristallin, glande lacrymale), ce qui devrait faire apparaître un bénéfice clinique majeur à long terme. Le résultat est encore plus spectaculaire pour les structures orbitaires contralatérales, mais à des niveaux de doses nettement plus faibles.

Dans un même temps, la diminution des faibles et moyennes doses dans les organes des enfants atténue le risque d'induction des seconds cancers, dits radio-induits. Les données cliniques rétrospectives récemment présentées par l'équipe de Boston, portant sur plus de 20 années d'expérience (chez l'adulte essentiellement), confirment une réduction du risque d'un second cancer de 50 % par rapport aux photons [42].

Principalement depuis les années 2000, le traitement par protonthérapie des tumeurs de l'enfant a pris une place de plus en plus importante parmi les indications retenues à l'ICPO. Le nouveau projet lié à l'installation de la nouvelle machine a fait de la pédiatrie un de ses axes principaux dans les années à venir. Actuellement les tumeurs de l'enfant prises en charge à l'ICPO sont : les craniopharyngiomes, les chordomes, les épendymomes, certains gliomes de bas grade (par exemple le gliome des nerfs optiques), les rhabdomyosarcomes orbitaires et prochainement les médulloblastomes. Fait important à partir de 2005 : pour améliorer la protection des tissus sains, les enfants ont bénéficié, dans la mesure du possible, de la totalité de leur traitement par protons.

Dans une série de 108 enfants toutes pathologies confondues traités au centre de protonthérapie d'Orsay entre 1994 et 2007, Habrand *et al.* a publié une survie globale à 5 ans de 88% et une survie sans récurrence de 74%. Dans la série de 34 enfants traités à forte dose (médiane de 68 CGE) pour sarcomes osseux à cinq ans, la probabilité selon Kaplan-Meier de ne pas développer de séquelles neurologiques ou sensorielles sévères était de 89 %. En revanche, 65 % des enfants ayant bénéficié de bilans hypophysaires réguliers ont eu ou aggravé un déficit hormonal, conséquence de l'impossibilité d'épargner la région hypophysaire lors de l'irradiation de l'étage moyen de la base du crâne. Ce déficit était également présent chez 90 % des enfants atteints de crâniopharyngiome mais, dans ce cas, une insuffisance hypophysaire au moins partielle était presque toujours observée avant l'irradiation [82].

En définitive, jusqu'au mois de mars 2011, 190 enfants ont été traités à l'ICPO dont 84 crâniopharyngiomes, 21 rhabdomyosarcomes et 15 gliomes de bas grade de nerfs optiques (Fig. 8).

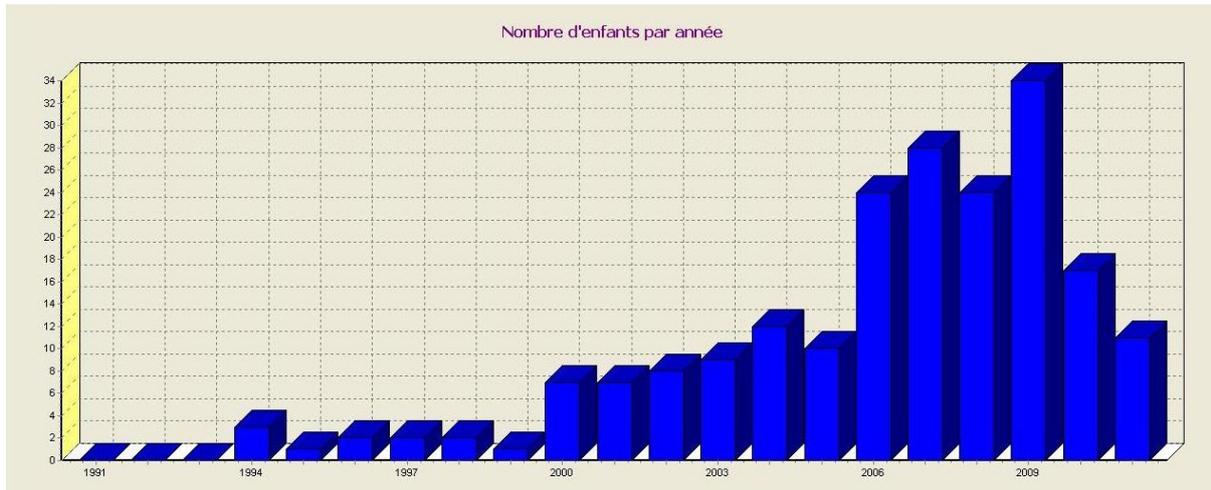


Fig. 8. Nombre des enfants traités par an à l'ICPO

2.3. Définition de l'Efficacité Biologique Relative (EBR)

La dose absorbée mesurée en Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$) est une grandeur physique valable quelle que soit la nature du rayonnement et celle de la matière absorbante. Elle est cependant insuffisante pour prédire les effets biologiques produits (mort cellulaire, mutation, régression d'une masse tumorale) car à dose absorbée égale, ces effets varient en fonction d'un certain nombre de facteurs. En fonction de la nature du rayonnement (α , β , γ , protons, neutrons etc.), les faisceaux peuvent être plus ou moins efficaces pour produire une lésion. Il est nécessaire de spécifier la qualité du rayonnement ainsi que les conditions d'irradiation comme le débit de dose et le fractionnement. En outre, l'efficacité biologique dépend de la sensibilité du tissu absorbant et du critère biologique examiné (par exemple effet tardif ou réponse précoce).

L'efficacité biologique relative (EBR) permet de mieux apprécier l'aptitude d'un rayonnement donné à produire un effet biologique ou pathologique précis.

Le rapport 40 de l'ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) a établi en 1986 la définition de l'EBR [92] comme le rapport de la dose du rayonnement de référence (D_{ref}) et de la dose (D_{test}) du rayonnement étudié :

$$\text{EBR} = D_{\text{ref}} / D_{\text{test}}$$

produisant le même effet biologique. Il s'agit donc d'un concept isoeffet.

Comme je l'ai déjà mentionné, l'EBR dépend de multiples facteurs, à savoir : la dose absorbée, le système biologique étudié, les conditions d'irradiation (débit de dose et

fractionnement), l'environnement (oxygénation) et la valeur du TEL (Transfert d'Énergie Linéique).

L'I.C.R.U. recommande les rayonnements γ du ^{60}Co comme rayonnement de référence, mais cette recommandation ne peut pas être toujours respectée et le choix doit être clairement signalé [91]. D'une manière générale, on peut déterminer l'EBR d'un rayonnement donné par rapport à n'importe quel autre type de rayonnement.

Dans mes expériences j'ai utilisé comme rayonnement de référence les rayonnements γ du ^{137}Cs . Dans toutes les comparaisons de nos résultats avec les données de la littérature nous avons tenu compte du fait que l'EBR du ^{137}Cs par rapport au ^{60}Co est égale à 1,07 [64].

Plusieurs systèmes biologiques ont été proposés pour déterminer l'EBR. Un grand nombre des études *in vitro* ont utilisé comme système la survie clonogénique de différentes lignées cellulaires, les paramètres comparés étant le plus souvent la SF2 (survie à 2 Gy), la survie réduite à 50% (SF=0,5) mais aussi les paramètres α et β des courbes de survie. Pour les faisceaux de protons de 62–85 MeV utilisés pour le traitement des tumeurs oculaires, les auteurs ont trouvé des valeurs d'EBR très variables allant pour le milieu du SOBP de 1,12 à 2,08 en fonction de la lignée cellulaire utilisée [24,46,78,157,187,207]. Dans ce domaine d'énergie plusieurs auteurs ont montré une augmentation de l'EBR avec la profondeur dans le SOBP, le rapport entre l'EBR distal et l'EBR proximal étant en général > 1 (min 1 – max 2,84) (Tableau 1).

Energie (MeV)	Rayonnement de référence	Lignée cellulaire	Paramètre mesuré	Largeur du SOBP (mm)	EBR			EBR distal/proximal	Référence
					SOBP proximal	SOBP milieu	SOBP distal		
85	^{60}Co	CHO	SF=0,5	30	0,94	1,22	1,16	1,23	Gueulette et al. (1996) [78]
70	^{60}Co	V79	SF=0,5	24	1,28	1,30	1,38	1,07	Wouters et al. (1996) [207]
67	^{60}Co	V79 379A	SF=0,5	20	1,63	1,63	1,63	1	Blomquist et al. (1993) [24]
65	^{60}Co	SCC25	SF2	14	1,05		1,22	1,16	Bettega et al. (2000) [16]
65	^{137}Cs	CHO	SF=0,67	18	1,19	1,23	1,37	1,15	Tang et al. (1997) [187]
65	^{137}Cs	V79	SF=0,5	14		1,35	1,34	1	Matsumura et al. (1999) [121]

65	L'entrée du faisceau de protons	CAL4	SF=0,01	28	1,09	1,12	1,27	1,16	Courdi et al. (1994) [46]
62	⁶⁰ Co	HTB140	SF2	15	1,68	2,08	2,84	1,69	Petrovic et al. (2010) [157]

Tableau 1. Valeurs de l'EBR (*in vitro*) en fonction de la profondeur dans le SOBP pour les faisceaux de protons de 62–85 MeV.

Concernant les faisceaux de protons de 155 à 250 MeV utilisés pour l'irradiation des tumeurs de la base du crâne, les différentes études *in vitro* ne trouvent pas de valeurs de l'EBR supérieures à 1,15. Les auteurs ne trouvent pas non plus de variation de l'EBR avec la profondeur dans le SOBP [47,164,166].

La variété des systèmes *in vivo* est très grande, les tissus animaux et les organes étudiés incluant : la peau (les réactions aiguës et la fibrose en tant que réaction tardive), le poumon, la queue, les testicules, le cristallin, les cryptes intestinales, les vertèbres et la moelle osseuse [91]. Gueulette *et al.* ont imposé depuis les années 1980 un modèle basé sur la régénération des cryptes intestinales de souris après une irradiation de 10 à 15 Gy en une seule ou plusieurs fractions. Ce modèle a été utilisé pour mesurer l'EBR des faisceaux de protons de divers centres de protonthérapie à travers le monde entier. Des valeurs d'EBR variant entre 1 et 1,30 ont été rapportées, avec une tendance à l'augmentation dans la partie distale du SOBP, que les auteurs ont généralement considérées comme étant non significatives. En définitive, une valeur moyenne de 1,1. a été proposée pour servir de référence pour les calculs dosimétriques [77-80,99].

Les compilations publiées sur la base des différents travaux ont renforcé l'idée qu'une valeur moyenne de l'EBR de 1,1 peut être utilisée en clinique [68,151]. Le rapport 78 de l'ICRU publié en 2007 propose également l'utilisation en clinique d'une valeur « générique » de l'EBR de 1,10. Toutefois, ce rapport suggère qu'il faudrait tenir compte de l'augmentation de l'EBR dans la partie distale du SOBP pour les plans de traitement, surtout quand les organes à risque peuvent se retrouver en fin de parcours d'un faisceau [91]. En tenant compte de cette recommandation et aussi de notre propre expérience, à l'ICPO, pour nos plans de traitement on évite toujours qu'un faisceau d'irradiation se termine dans un organe critique comme la moelle épinière, le tronc cérébral, le chiasma ou les nerfs optiques.

L'EBR dépend du TEL, et il est bien connu que la forme des courbes de survie dépend du TEL du rayonnement utilisé. En effet, lorsque le TEL augmente l'épaule des courbes de survie s'atténue et la courbe tend à devenir exponentielle. Autrement dit, le paramètre β tend vers zéro dans les domaines de TEL élevé. Le sens de cette observation est que les lésions deviennent létales d'emblée suggérant que les dommages générés au niveau des trajectoires des particules ionisantes ne peuvent être réparés [192]. Classiquement l'EBR augmente avec le TEL selon une courbe en cloche présentant un maximum autour de 100 keV. μm^{-1} (Fig. 9) [11].

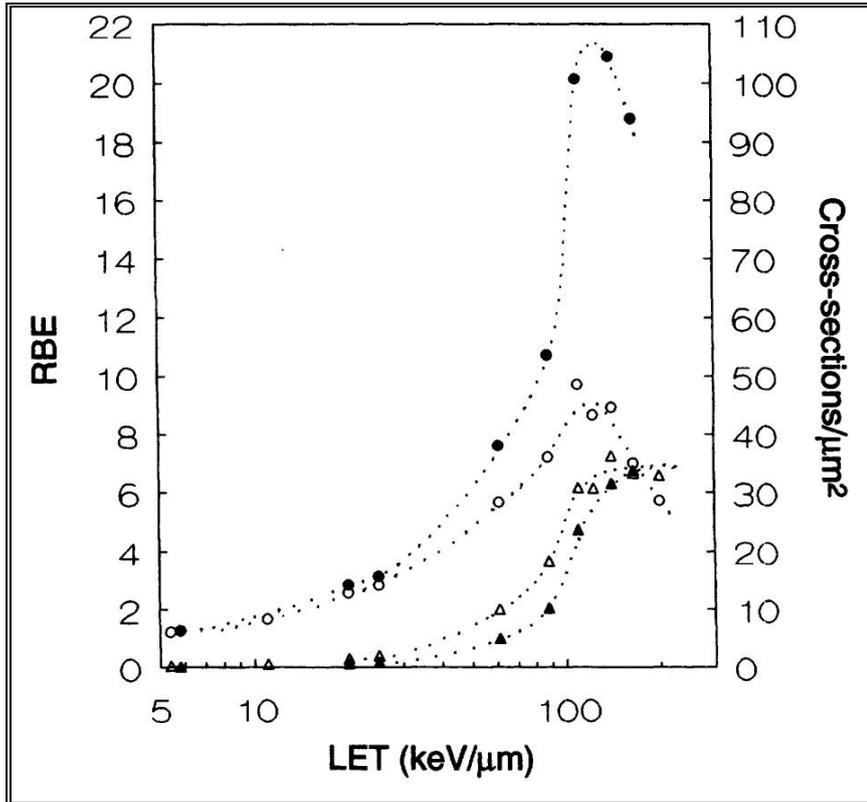


Fig. 9. Relation TEL-EBR (d'après Barendsen [11]).

2.4. Transfert d'énergie linéique (TEL)

2.4.1 Définition

Pour les particules chargées, le transfert d'énergie linéique (TEL) L_{Δ} propre à une particule traversant un matériau est le quotient dE_{Δ}/dl , dans lequel dE_{Δ} est l'énergie perdue par une particule chargée due aux collisions électroniques en parcourant une distance dl de ce matériau, moins la somme des énergies cinétiques de tous les électrons mis en mouvement et pour lesquels les énergies cinétiques sont supérieures à Δ .

$$L_{\Delta} = dE_{\Delta}/dl$$

E peut être exprimé en eV, d'où L_{Δ} peut être exprimé en $eV \cdot \mu m^{-1}$, multiples ou sous-multiples commodes, comme $keV \cdot \mu m^{-1}$.

Le TEL dérive du pouvoir de ralentissement et il représente une grandeur moyenne qui ne prend pas en compte le caractère discontinu des transferts d'énergie [192]. Il n'est pas accessible à la mesure mais seulement au calcul. Ce calcul nécessite une détermination du spectre des particules qui est généralement difficile à établir. Notons que le TEL moyen pour les faisceaux médicaux du Centre de protonthérapie de l'ICPO est d'environ une dizaine de $keV \cdot \mu m^{-1}$.

La microdosimétrie, méthode expérimentale, apporte des informations complémentaires et peut pallier les insuffisances du concept de TEL pour caractériser la distribution de l'énergie à l'échelle microscopique [198].

2.4.2 *Lésions caractéristiques des rayonnements de TEL élevé*

Les cassures de l'ADN non réparées peuvent être à l'origine de réarrangements chromosomiques. Certains de ces dommages semblent être caractéristiques aux particules à TEL élevé. Plusieurs auteurs ont ainsi observé des échanges de chromatides sœurs après irradiation de cellules de hamster par des particules α , alors que ce type de réarrangement est rarement induit après irradiation par des rayonnements de faible TEL [1,75]. On sait également que les radiations de TEL élevé peuvent induire la formation de petits fragments d'ADN (1000 paires de bases), résultant de la distribution des cassures double-brin de l'ADN [116]. Les radiations de TEL élevé provoquent aussi la formation d'aberrations chromosomiques plus complexes [25]. Le tableau 2 présente une comparaison du nombre des lésions suivant le TEL du rayonnement.

La cytotoxicité des radiations ionisantes est la résultante de la production de lésions réparables et de lésions non-réparables. De nombreuses études ont comparé les relations existant entre lésions et sensibilité aux radiations ionisantes et il apparaît clairement que le nombre de cassures double-brin non ou mal réparées est parfaitement corrélé à la radiosensibilité [146]. On pense également que la présence de sites de dommages multiples localisés (LMDS) détermine la radiosensibilité [201] [203] et on admet que la complexité des LMDS dépend du TEL du rayonnement. Le tableau 3 illustre la relation entre le TEL et la réparation des cassures double-brin de l'ADN déterminées par la méthode de CHEF sur des fibroblastes normaux humains (GM38) [169,170].

Par cellule et par Gy	TEL faible	TEL élevé
Nombre de particules traversant le noyau	1 000	2
Dommages physiques		
Ionisations nucléaires	100 000	100 000
Ionisations de l'ADN	1 500-2 000	1 500
Excitation de l'ADN	1 500 - 2 000	1 500
Dommages biochimiques		
Cassure simple brin	1 000	500
Cassure double brin	40	
Pontage ADN-Protéine	150	
Effets cellulaires		
Aberrations chromosomiques	0 - 3	1 - 5

Mutation complexe	10 %	45 %
Inactivation cellulaire	30 %	85 %

Tableau 2. Comparaison des effets des radiations à faible et fort T.E.L. par Gy et par cellule [160].

Type de radiations	TEL (keV/ μm)	CDB non réparées	CDB mal réparées
Rayons X	0,2	2	30
He	7	2	37
He	71	7	40
N	97	10	40
He	125	18	47
Fe	150	10	38

Tableau 3. Réparabilité des cassures doubles brin en fonction du TEL (d'après Rydberg et al. [169,170]).

2.5. Les effets chimiques et biologiques des RI

2.5.1 Les réactions chimiques

Les effets biologiques des RI résultent des réactions chimiques consécutives à l'ionisation des molécules du milieu irradié, et plus précisément à la formation de radicaux. On distingue des effets directs et indirects (Fig. 10). L'effet direct résulte de l'ionisation d'une molécule d'intérêt (par exemple une molécule d'ADN). L'effet indirect procède de l'interaction des produits de la radiolyse de l'eau avec les molécules contenues dans les cellules. L'effet direct est important pour les rayonnements de type α , mais il a une importance négligeable dans le cas des électrons, des protons et des photons X ou γ . L'effet indirect est largement majoritaire dans les conditions habituelles car les milieux biologiques sont à 70% constitués d'eau; la probabilité que les RI interagissent avec l'eau plutôt qu'avec des macromolécules (comme les molécules d'ADN) est donc beaucoup plus importante.

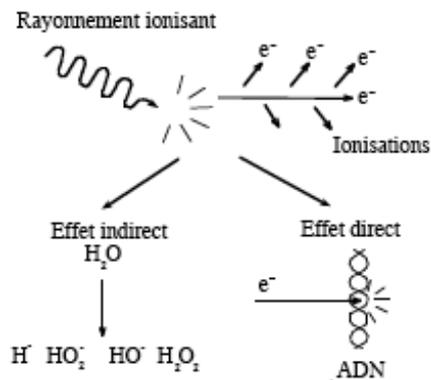
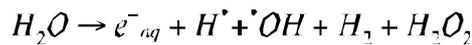


Fig. 10. Effets directs et indirects des RI [12].

La radiolyse de l'eau génère des radicaux libres et des produits de recombinaison qui diffusent dans la solution :



Les radicaux libres réagissent sur les molécules de soluté, entraînant leur modification chimique. Le radical OH• est un oxydant extrêmement puissant, qui réagit avec la plupart des molécules rencontrées à des vitesses proches de la limite imposée par la diffusion. Les électrons hydratés (e_{aq}^-) sont pour leur part des réducteurs puissants. Les radicaux H• peuvent être alternativement oxydants ou réducteurs, selon les conditions. Leur rendement de formation dans l'eau est bien connu : $G(OH^\bullet) = G(e_{aq}^-) = 0.28 \mu\text{mol/J}$, $G(H^\bullet) = 0.062 \mu\text{mol/J}$.

Les principales cibles biologiques des radicaux issus de la radiolyse de l'eau sont les constituants des acides nucléiques (désoxyribose, bases), les lipides insaturés des membranes cellulaires, et certains acides aminés. Nous ne nous préoccupons dans ce qui suit que des dommages produits sur les molécules d'ADN.

2.5.2 Effets des RI sur l'ADN

Les radicaux libres, principalement les radicaux OH• issus de la radiolyse de l'eau présente dans l'environnement de la molécule d'ADN, réagissent avec les différents éléments qui composent l'ADN : les groupements phosphate, le cycle désoxyribolactone ou les bases puriques ou pyrimidiques. Les principaux produits finaux de ces réactions sont des cassures de la chaîne polynucléotidique (simples ou doubles), des sites abasiques, éventuellement oxydés, et des dommages de bases. On trouve également des pontages ADN-ADN et ADN-protéines ainsi que des lésions multiples localisées. Ces différentes lésions (Fig. 11) se produisent quotidiennement dans l'ADN des cellules non irradiées sous l'effet des radicaux issus du métabolisme de l'oxygène (Tableau 4).

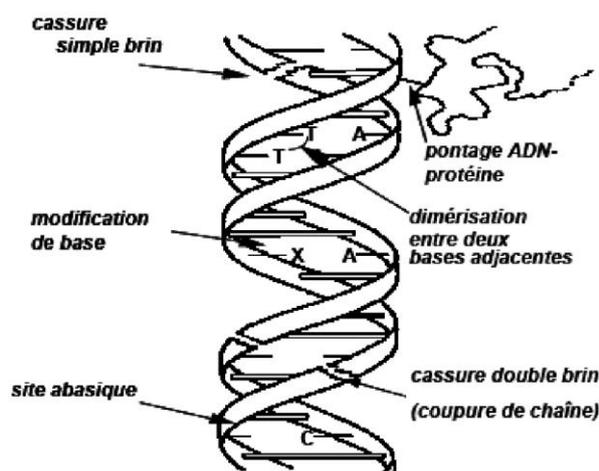


Fig. 11. Schéma des lésions radio-induites de l'ADN (d'après Tubiana [192]).

Type de dommage	Nombre moyen de lésions spontanées par cellule par jour	Nombre moyen de lésions radio-induites par cellule et par Gy
Cassures simple-brin	10.000 – 55.000	1.000
Cassures double-brin	8	40
Dommages de bases	3.200	2.000
Pontage ADN-ADN	8	30
Pontage ADN-Protéine	≥ 10	150
Lésions multiples localisées	Non déterminé	Non déterminé

Tableau 4. Dommages endogènes et radio-induits de l'ADN (d'après Ward [202]).

(i) Dommages de bases (DB)

Les réactions chimiques d'oxydation produites par les radicaux libres de la radiolyse de l'eau engendrent une multitude de modifications chimiques des bases puriques et pyrimidiques. Les différents composés qui en résultent ont été identifiés par des techniques de chromatographie. Les deux produits majeurs sont la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydroxythymidine (ThdGly) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG). ThdGly est la plus abondante [33] mais 8-oxodG a été la plus étudiée et reste pour cette raison la lésion de référence comme marqueur des lésions oxydatives de l'ADN. On notera que le rendement radiolytique est plus faible à haut TEL ($^{12}\text{C}^{6+}$) qu'après irradiation à faible TEL (γ) [159].

(ii) Cassures simple-brin (CSB)

Le métabolisme de l'oxygène produit des intermédiaires réactifs qui sont responsables de l'accumulation spontanée d'un grand nombre de CSB (Tableau 4). La rupture simple chaîne de l'ADN peut survenir au niveau de la liaison phosphodiester 3' ou 5'. Elle

peut aussi résulter de l'attaque de la liaison base-désoxyribose. La plupart des CSB radio-induites sont produites par les radicaux OH[•] qui attaquent le désoxyribose, principalement en 4'. Cette attaque est suivie de réarrangements qui aboutissent à la rupture de la liaison phosphodiester en β [58]. Les études *in vitro* sur de l'ADN plasmidique ont montré que les CSB radio-induites présentent en grande majorité une extrémité 3'-phosphate ou phosphoglycolate [15] dont la réparation nécessite l'action d'une nucléase.

Nous avons choisi les techniques du test des Comètes (*Comet assay*) et d'éluion alcaline sur membrane de polycarbonate en vue de quantifier les CSB radio-induites.

(iii) Cassures double-brin (CDB)

Une cassure double-brin est une rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de quelques nucléotides. Dans la très grande majorité des cas, une CDB est formée par les radicaux produits lors du dépôt d'énergie d'une seule particule. La probabilité de formation d'une CDB dans le noyau d'une cellule par conjonction de CSB produites le long de deux trajectoires d'électrons distinctes est inférieure à 10⁻⁸. Une CDB est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, hétérologue dans le cas contraire. Les CDB hétérologues sont les plus fréquentes.

Le nombre de CDB représente un faible pourcentage des lésions de l'ADN spontanées ou radio-induites (Tableau 4). Cependant, une fraction non négligeable des CDB radio-induites est difficilement réparable. Les CDB étant des lésions particulièrement létales [9], il existe de ce fait une excellente corrélation entre la probabilité de mort cellulaire et le taux de CDB non réparées 24 h post-irradiation. L'étude des CDB s'est longtemps heurtée à la difficulté de leur détection et de leur quantification. Cette difficulté a été surmontée par les techniques d'éluion sur filtre [106], puis par l'électrophorèse en champs pulsés [23].

(iv) Pontages de l'ADN

On connaît trois types de pontages (*cross links*) radio-induits impliquant l'ADN : ADN-ADN intrachaînes, ADN-ADN interchaînes et ADN-protéines. Ces derniers se forment par liaison covalente de protéines à l'ADN. C'est le cas par exemple des histones.

Quelques articles ont décrit la formation de pontages ADN-ADN par les RI [32,197]. Ces dommages restent cependant peu étudiés. Cela tient en grande partie à la difficulté technique de leur mise en évidence et de leur quantification. On pourrait cependant penser qu'ils sont très néfastes pour les cellules car ils sont susceptibles d'interrompre différents mécanismes vitaux comme la réplication et la transcription. De même on reconnaît aujourd'hui que la réparation des pontages ADN-ADN inter-chaînes est complexe et pourrait représenter pour la cellule un challenge difficile à surmonter. En effet, la réparation de ces lésions requiert la formation d'une CDB de part et d'autre du pontage avant que cette rupture double-chaîne ne soit prise en charge par les systèmes de réparation classique des CDB.

(v) **Dommmages multiples localisés (*Locally Multiply Damaged Sites, LMDS*)**

Le concept de LMDS est issu de la microdosimétrie. Il est basé sur les modèles microdosimétriques décrivant le dépôt d'énergie des électrons en fin de parcours. Dans le modèle théorique en vigueur, les LMDS sont constituées par l'accumulation (*clusters*) de dommages localisés sur un fragment d'ADN de 10 à 20 paires de bases et pouvant contenir la plupart des lésions de l'ADN décrites précédemment : dommages de bases, CSB, CDB. Les LMDS peuvent être induits à partir d'une seule trace de particule en interaction avec l'ADN. La microdosimétrie prévoit que la fréquence de ce phénomène doit augmenter avec le TEL du rayonnement incident [72,135]. La mise en évidence de ces lésions est très indirecte. La méthode la plus répandue, bien que non exempte d'artefacts et susceptible de conduire à une surestimation de l'incidence des lésions [27], fait appel à la transformation des "clusters" de lésions en CDB sous l'action des nucléases [84]. En définitive, les LMDS, si elles existent, seraient caractéristiques des RI car elles ne seraient pas formées spontanément dans le cours du métabolisme oxydatif [182] ni en réponse à une exposition aux UV [176].

2.5.3 *Effets des RI au niveau cellulaire*

Nous avons vu dans ce qui précède que les radiations ionisantes engendrent une grande diversité de lésions dans l'ensemble des compartiments subcellulaires, celles qui affectent l'ADN étant les plus importantes. La réponse des cellules à ces dommages se traduit par :

- l'apparition d'un stress oxydatif et une chute du potentiel redox mitochondrial ;
- l'activation de voies de signalisation modifiant l'expression des gènes ou la phosphorylation d'un grand nombre de protéines ;
- une altération du cycle cellulaire ;
- des mutations et des aberrations chromosomiques, souvent une aneuploidie ;
- une modification du phénotype ;
- la mort cellulaire (mort clonogénique) ou perte de la capacité proliférative, qui constitue l'effet recherché pour la stérilisation des tumeurs en radiothérapie.

L'ampleur de ces diverses manifestations dépend de la dose de rayonnement absorbée par les cellules cibles, et leurs effets sont échelonnés dans le temps (Fig. 12). On peut ainsi distinguer :

- la reconnaissance précoce des dommages (quelques secondes) ;
- la signalisation (quelques minutes) et la réparation des lésions (quelques dizaines de minutes) ;
- l'induction, ou la répression de l'expression de certains gènes (quelques heures) ;
- la mort cellulaire (quelques heures à quelques jours) ;
- l'instabilité génomique (quelques jours à plusieurs années).

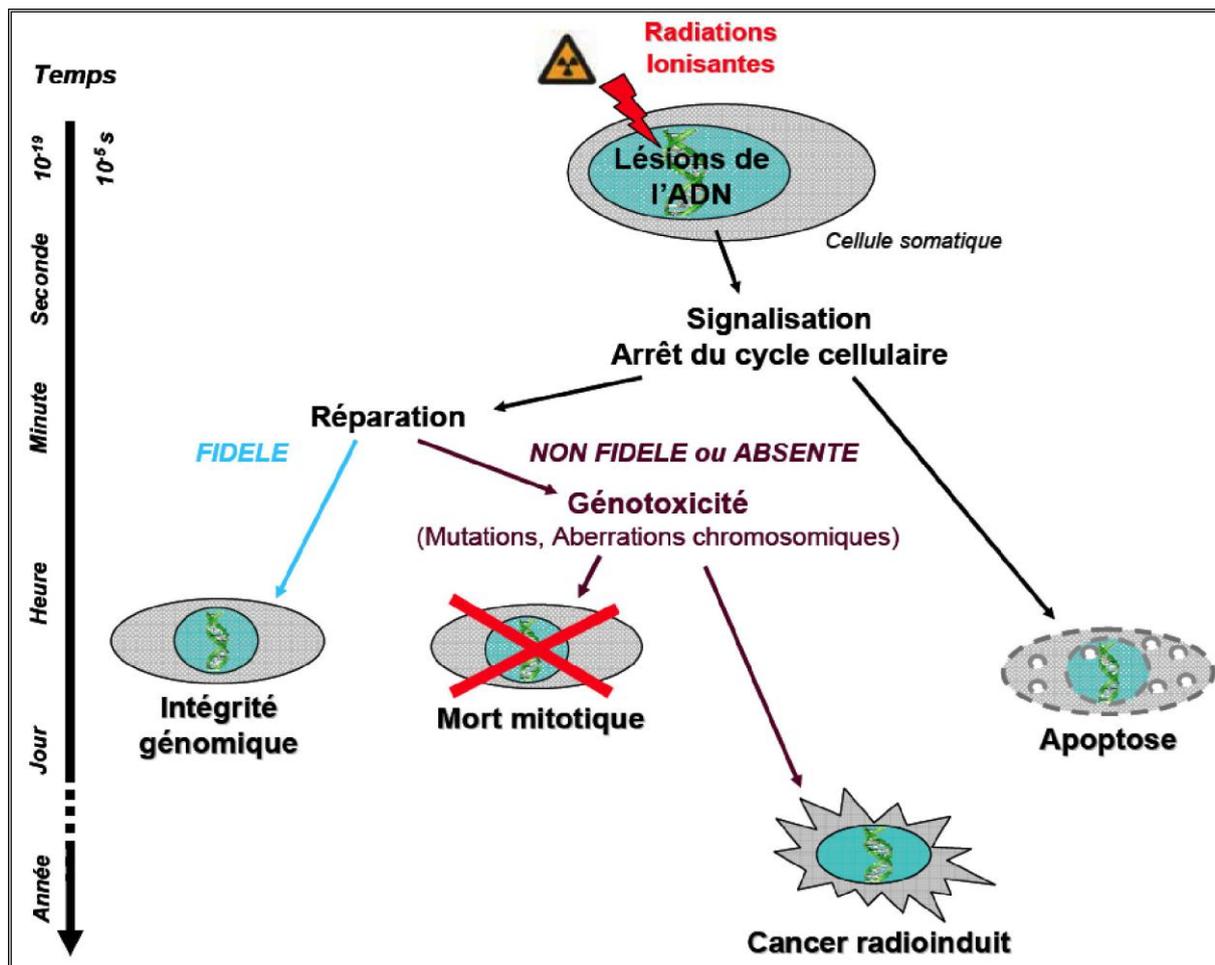


Fig. 12. Schéma de l'effet des RI sur les cellules. Si la nature et le taux des dommages sont compatibles avec une réparation fidèle, la cellule peut restaurer l'intégrité de son génome. Lorsque la nature et le taux de dommages radio-induits dépassent les capacités de réparation, la cellule s'oriente vers la mort cellulaire (apoptose, mort mitotique). Une réparation infidèle peut permettre la survie mais être à l'origine de mutations ou de remaniements pouvant évoluer à long terme vers des cancers radioinduits [69,90].

Les tests clonogéniques *in vitro*, qui mesurent la survie des cellules au rayonnement, ont été établis vers le milieu des années 1950. Ils ont permis de décrire la réponse au rayonnement des cellules saines et tumorales, et de mettre en évidence des différences de radiosensibilité d'une lignée cellulaire à l'autre. Ces observations sont à l'origine de la radiobiologie quantitative et ont donné naissance à la notion de radiosensibilité intrinsèque, définie comme la probabilité de mort cellulaire par unité de dose. Parallèlement, la caractérisation de mutants de radiosensibilité chez les levures et les rongeurs, l'identification chez l'homme de maladies génétiques caractérisées par un syndrome d'hyper-radiosensibilité, et l'analyse du devenir des lésions radio-induites de l'ADN ont fait émerger le concept de réparation et permis d'en comprendre les mécanismes. On retiendra dans le contexte de cette thèse que la radiosensibilité des cellules dépend de leur équipement génétique et d'un certain

nombre de facteurs comme la pression partielle d'oxygène ou la phase du cycle cellulaire, la phase S étant la plus radiorésistante en raison des capacités de réparation qui y sont exprimées. Cette observation suggère la possibilité de tirer parti d'effets de coopération dans les associations chimio-radiothérapeutiques en radiosensibilisant, grâce à des drogues, les cellules situées dans la phase S.

Il existe cinq modes de mort cellulaire. Dans les lignées épithéliales, en particulier dans les lignées tumorales où l'expression (fonction) de la protéine p53^{wt} est perdue, la mort mitotique est le mécanisme prépondérant. Celle-ci peut revêtir des aspects très divers, dont les principaux sont l'oncose (nécrose), la formation et l'éjection (exocytose) de micronoyaux et la mort cellulaire différée. La mort mitotique s'exprime lors d'une tentative de passage en mitose. L'irradiation des cellules peut également induire l'apoptose, ou mort cellulaire programmée. La sénescence, observée chez les fibroblastes irradiés, doit aussi être considérée comme un mécanisme de mort programmée. Il faut mettre à part le phénomène de mort immédiate et l'autophagie.

2.6. Les différents systèmes de réparation de l'ADN chez les eucaryotes

La cellule eucaryote a développé au cours de l'évolution des mécanismes de réparation spécifiques de chaque type de lésion de l'ADN [40,88]. Les principaux mécanismes de réparation sont:

- Réparation par excision de base (*Base Excision Repair*, BER),
- Réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*, NER),
- Réparation des mésappariements de bases (*Mismatch Repair*, MMR),
- Réparation des CDB par suture non-homologue (*Non Homologous End-Joining*, NHEJ),
- Réparation des CDB par recombinaison homologue (RH),

La réparation permise par ces différents mécanismes peut-être fidèle (*error-free*), c'est à dire qu'elle restaure parfaitement la séquence d'ADN originelle, soit infidèle (*error-prone*) c'est à dire qu'une partie de la séquence nucléotidique aura perdu une partie de son information, ou que la nouvelle séquence synthétisée diffèrera de la séquence avant lésion.

Les principales caractéristiques des différentes voies de réparation, hors synthèse translésionnelle, sont résumées dans le Tableau 5.

Voie de réparation	Lésions induites par	Types de lésions réparées	Fidélité de la réparation
Excision de base (BER)	Radiations ionisantes Espèces activées de l'oxygène Agents alkylants	Dommages de base Sites abasiques CSB	Fidèle

Excision de nucléotide (NER)	CisPlatine Rayons UV Mitomycine C	Pontages Adduits Dimères de pyrimidine	Fidèle
Réparation des mésappariements (MMR)	Erreurs de réplication CisPlatine Agents alkylants	Bases mésappariées Insertion Délétion	Fidèle
Suture non-homologue (NHEJ)	Radiations ionisantes Ene-diynes, bléomycine Poisons topoisomérase I & II	CDB	Principalement infidèle
Recombinaison Homologue (RH)	Radiations ionisantes Enes-diynes, bléomycine Poisons topoisomérase I & II	CDB	Principalement fidèle

Tableau 5. Principales caractéristiques des mécanismes de réparation de l'ADN hors synthèse translésionnelle. La liste des inducteurs de lésions n'est pas exhaustive.

Il faut noter que plusieurs syndromes de prédisposition aux cancers sont liés à la perte de fonction ou à la délétion de gènes de réparation. Ces défauts sont également responsables de réactions aiguës d'hypersensibilité aux RI (Fig. 13). L'inactivation de ces voies au moyen d'inhibiteurs appropriés peut potentialiser la réponse aux agents clastogènes, mais il n'est pas certain qu'elle puisse être utilisée en clinique anti-cancéreuse sans manifestations d'hyper-toxicité conduisant à l'échec des traitements [119].

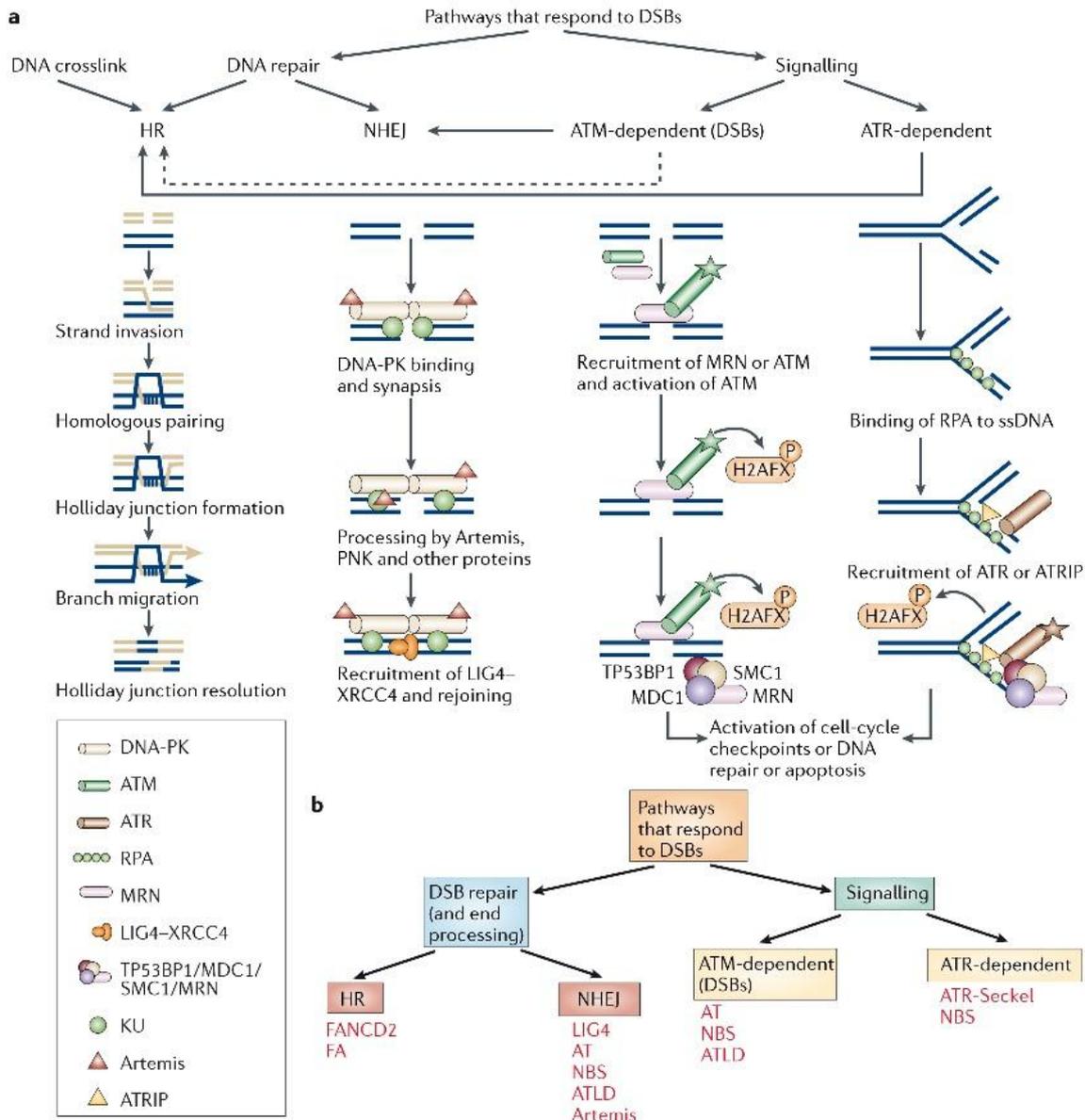


Fig. 13. Principales voies de réparation des CDB (d'après O'Driscoll et al. [144]).

2.6.1 Réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)

Chaque cellule humaine subit en moyenne 8 CDB par jour. Ces cassures sont la conséquence d'erreurs qui se produisent au cours de la réplication, par exemple par collision de CSB non réparées avec les fourches de réplication, ou lors d'un dysfonctionnement du mécanisme enzymatique des endonucléases ou des topoisomérases. Elles sont également induites par les RI (environ 40 CDB par Gy dans une cellule diploïde) ou par des drogues antitumorales telles que les ène-diynes (néocarzinostatine, calichéamycine), la bléomycine et les poisons de topoisomérase I (camptothécine et dérivés) ou II (étoposide). Notons que certains bioflavonoïdes (génistéine, quercétine) qui peuvent se trouver dans l'alimentation

sont des poisons de topoisomérase II et qu'on leur attribue un pouvoir leucémogène élevé. Une CDB non réparée se transforme en cassure chromosomique, recombinogène et hautement toxique pour la cellule. Les cellules de mammifères possèdent deux mécanismes principaux pour la réparation des CDB, à savoir la suture non-homologue des extrémités clivées (*Non Homologous End Joining, NHEJ*) et la réparation par recombinaison homologue (RH).

(i) Réparation des CDB par suture non-homologue (NHEJ)

Le NHEJ est le mécanisme de réparation des CDB majoritaire dans les cellules humaines. Il peut intervenir tout au long du cycle cellulaire, ce qui n'est pas le cas de la recombinaison homologue. Le NHEJ "classique" ou D-NHEJ (*DNA-PK dépendante NHEJ*) nécessite le complexe DNA-PK (Fig. 14). Une voie alternative, le B-NHEJ (*Back-up NHEJ*), a été identifiée récemment.

1) Le D-NHEJ

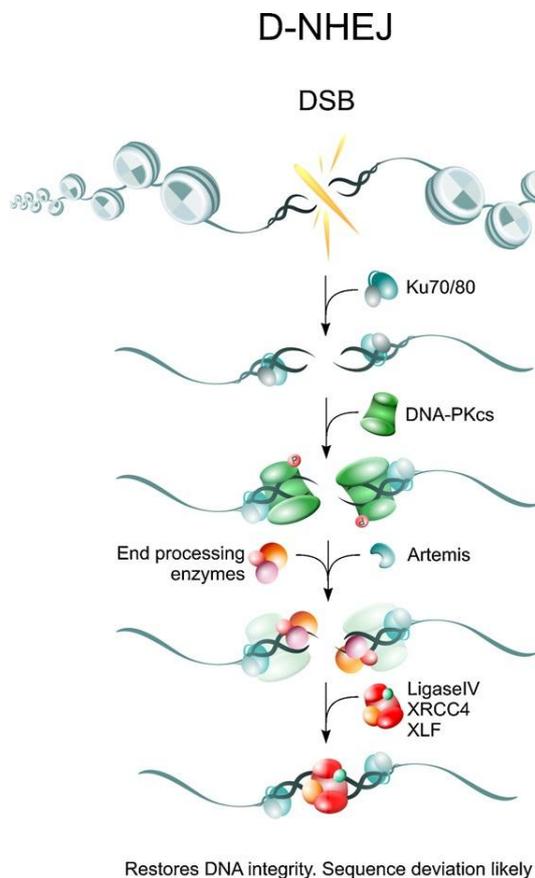


Figure 14. Réparation des CDB par suture non-homologue DNA-PK dépendante (D-NHEJ) (d'après Mladenov et al, [131]).

Les ruptures double-chaîne sont détectées par les protéines Ku qui s'y fixent et recrutent la sous-unité DNA-PKcs. Après résection des extrémités par la protéine Artemis, la CDB est reliquée par l'ADN ligase IV associée à XRCC4 et XLF.

La reconnaissance de la CDB est assurée par le complexe DNA-PK. Celui-ci se compose de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de la protéine DNA-PKcs (*DNA-PK catalytic*

subunit). Le complexe recrute la nucléase Artemis, activée par les kinases ATM et DNA-PK [71,131,158]. Artemis provoque la résection des oligonucléotides simple-brin situés aux extrémités de la brèche double-brin [117,200]. Les extrémités résultantes, dites “franches”, sont reliées par l’ADN ligase IV associée aux protéines XRCC4 et XLF (XRCC4-Like Factor) [199]. La protéine XLF, également appelée Cernunnos [34], est indispensable au bon fonctionnement du NHEJ en permettant la localisation du complexe XRCC4-Ligase IV aux sites des CDB [2].

L’étape de résection effectuée par Artemis est nécessaire au remodelage précédant la suture mais implique une perte d’information génétique. C’est pourquoi le mécanisme de réparation NHEJ est généralement infidèle.

Le D-NHEJ joue un rôle important dans la formation des clones qui constituent le répertoire d’antigènes. Ce répertoire est établi par le système V(D)J de réarrangement des gènes V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) codant les immunoglobulines. Le système V(D)J est un mécanisme de formation de coupure et de religation d’ADN double-brin permettant le réarrangement des exons codant les parties variables des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T. Les cassures sont générées par le complexe RAG (constitué des enzymes RAG1 et RAG2, associées à HMG1) et sont ensuite transformées en épingles à cheveux (structure stable de l’ADN car résistante aux exonucléases) [112]. Ces ADN double-brin codants sont ensuite reliés entre eux par le NHEJ [163], l’ouverture des structures en épingle à cheveux étant assuré par la protéine Artemis [117]. Ce mécanisme permet de générer différentes séquences protéiques de reconnaissance des antigènes à partir des 3 gènes V, D et J, et d’assurer ainsi la polyclonogénicité pour un système immunitaire efficace. Des mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans le NHEJ (notamment Artemis et Ligase IV) sont responsables d’importants déficits immunitaires [112] et prédisposent à l’apparition de lymphomes et de leucémies [144].

2) *Le B-NHEJ*

Les tests *in vitro* d’extraits cellulaires en présence de plasmides linéarisés par des enzymes de restriction, faisant office de substrats des système de réparation des CDB, ont permis de mettre en évidence l’existence d’un NHEJ indépendant de DNA-PK [38,60,96,108]. Ce mécanisme est présent chez les mammifères [196].

Audebert *et al.* [8] ont montré que cette voie alternative implique les effecteurs de la voie du BER (short patch repair) : PARP-1, XRCC1/Ligase III [7] et plus récemment PNK (Fig. 15).

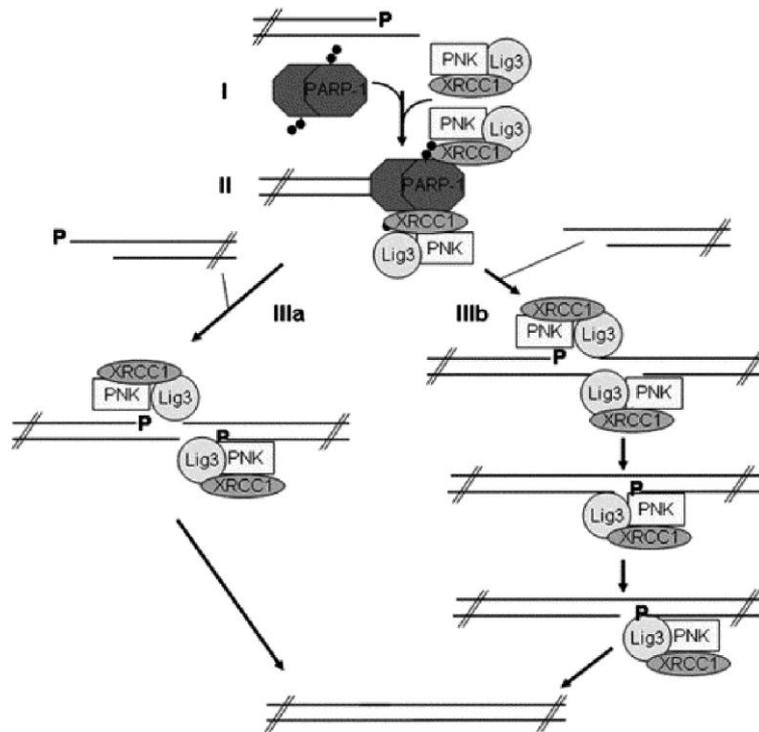


Fig. 15. Mécanisme de réparation des CDB par suture non-homologue indépendante du complexe DNA-PK : le back-up NHEJ (B-NHEJ) (d'après Audebert et al., [8]).

Dans le schéma proposé par Audebert *et al.* [8] la réaction est initiée par la fixation et l'homodimérisation de PARP-1 aux sites de cassure. Cette homodimérisation permettrait le rapprochement et la stabilisation des 2 extrémités 5' et 3' de la brèche double-brin. Comme dans le SPR, la synthèse de poly(ADP-ribose) par l'homodimère de PARP-1 permettrait le recrutement du complexe XRCC1/Ligase III α et de PNK aux sites de dommages. PNK phosphoryle l'extrémité 5' de la brèche, permettant ainsi la ligation de la CDB par la Ligase III.

Les partenaires du SPR ne prendraient donc pas uniquement en charge la réparation des CSB, mais ils pourraient également pallier des déficiences du D-NHEJ dans la réparation des CDB. Toutefois, la suppression de PARP-1 n'a pas d'incidence sur la vitesse de réparation des CDB ni sur la survie des cellules exposés à la néocarzinostatine [140].

(ii) Réparation des CDB par recombinaison homologue (RH)

Le second mécanisme de réparation des CDB est la recombinaison homologue (Fig. 16). Cette voie de réparation est dite fidèle car la séquence d'ADN lésée est resynthétisée à partir de la chromatide sœur ou du chromosome homologue. La RH se produit uniquement

dans les phases du cycle cellulaire où la chromatine peut être remaniée pour rapprocher les chromosomes homologues, c'est à dire durant la phase S et en phase G2 [171].

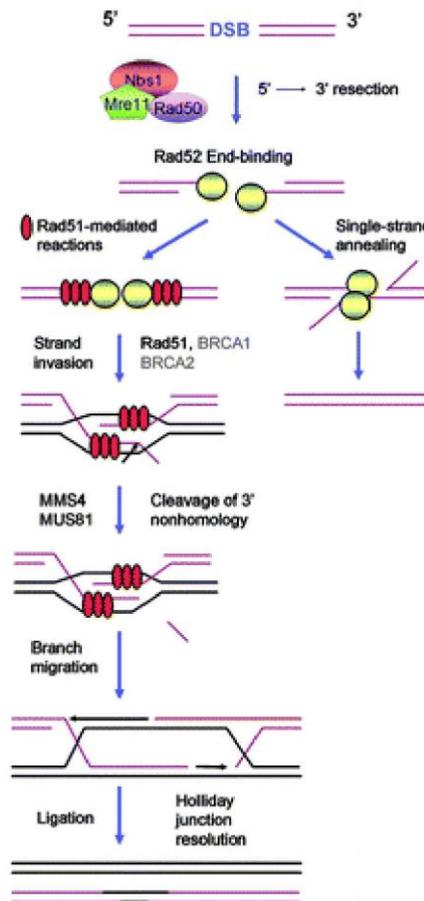


Fig. 16. Réparation des CDB par recombinaison homologue et single-strand annealing (d'après Sancar et al. [172]). Après détection de la CDB par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1, la protéine Rad52 est recrutée pour digérer les extrémités avant une recherche de la séquence homologue par Rad51. La formation de la jonction de Holliday permet de synthétiser la séquence d'ADN lésée par recopie sur le brin homologue. Si la CDB se trouve dans une séquence de microhomologie de l'ADN, la protéine Rad52 peut rapprocher les deux extrémités avant résolution de la brèche.

La reconnaissance de la CDB est assurée par le complexe Mre11-Rad50-NBS1 (complexe MRN) (Figure 13). L'activité nucléase de Mre11 [48] effectue la résection des extrémités de la CDB de 5' vers 3'. Les protéines RPA et Rad52 viennent alors se fixer sur les extrémités 3' sortantes afin d'éviter leur dégradation par les exonucléases et pour permettre le recrutement de la protéine Rad51, acteur principal de la RH, en collaboration avec ses paralogues (Rad51B, C, D, XRCC2 et XRCC3) [195]. Rad52 a ainsi une fonction équivalente à celle des protéines Ku70/Ku80 dans le NHEJ, à savoir la protection des extrémités et le recrutement des différents partenaires. On pense qu'il existe une compétition entre ces

protéines pour orienter le choix du mécanisme de réparation des CDB. Cependant, le complexe Ku se fixe préférentiellement sur les extrémités de CDB, tandis que le recrutement de Rad52 nécessite une séquence d'ADN simple-brin [165].

La protéine Rad51, sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2 (ou FancD1) [95,155], va ensuite rechercher les séquences homologues sur la chromatide sœur appariée après une invasion de brins par synthèse de nucléofilaments. Les protéines Rad52 et Rad54 participent à ce processus [123,186]. Cette invasion des brins endommagés dans les brins de la chromatide sœur appariée forme une structure appelée jonction de Holliday. Ces jonctions sont résolues par des endonucléases (résolvases) qui reconnaissent ces structures spécifiques : chez l'homme MUS81 et MMS4 [145]. La séquence d'ADN lésée est alors synthétisée par les polymérase en prenant comme matrice la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur. La polymérase responsable de cette synthèse serait la polymérase η [98,124], mais il semble que les polymérase répliquatives puissent également accomplir cette fonction [120]. Une fois cette étape achevée, les extrémités franches formées peuvent être liguées.

La RH nécessite également l'intervention des hélicases Werner (WRN) et Bloom (BLM) pour ouvrir la chromatine et permettre l'invasion réciproque des brins [88].

La réparation par RH est fidèle et permet de conserver l'intégrité du génome. C'est pourquoi des mutations hétérozygotes affectant les gènes *Brca1* et *Brca2* constituent un facteur de prédisposition aux cancers du sein ou des ovaires. En effet si des cellules deviennent homozygotes pour la mutation de ces gènes accompagnée de la perte/diminution de fonction des protéines BRCA1/2, il en résulte une RH inefficace qui peut alors devenir infidèle et être à l'origine de processus de cancérogenèse.

1) Reconnaissance et signalisation des CDB par ATM (*Ataxia teleangiectasia mutated*)

La détection des CDB requiert également l'activation de la protéine ATM [110,111,156], une sérine-thréonine kinase de la famille des "*phosphatidylinositol 3-kinase – like protein kinase* " (PIKK) [53]. Il semble qu'ATM soit recrutée aux sites de CDB par le complexe MRN [35]. En tout état de cause ATM s'associe étroitement à l'ADN en réponse aux CDB induites par des radiomimétiques tels que la néocarzinostatine [5]. *In vitro*, ATM présente une affinité élevée pour les extrémités d'ADN [175].

On pense qu'en absence de dommages ATM est séquestrée sous forme d'un dimère dans lequel le domaine kinase d'une molécule ATM interagit avec un domaine de l'autre protéine ATM contenant le résidu Ser-1981 [10]. Lors de la détection d'une CDB, ce résidu serait phosphorylé par la molécule ATM partenaire au sein du dimère. Cette phosphorylation aurait pour effet de permettre la dissociation du dimère, rendant la kinase ATM libre de phosphoryler d'autres substrats de la cellule.

Certains auteurs ont suggéré que l'activation d'ATM peut être déclenchée en réponse à des changements de structure de la chromatine produits par les CDB, plutôt que par une reconnaissance directe de la cassure [10]. Dans tous les cas, ATM détecte les CDB et active leur réparation par phosphorylation des protéines impliquées dans la RH ou le SSA, telles que

Nbs1 (protéine du complexe MRN) [66], BRCA1 [67], l'hélicase BLM [13], l'histone H2AX [31] etc...

Il est utile de rappeler que la protéine ATM a été identifiée à partir du syndrome d'*Ataxia telegiectasia* (AT) [185], qui se caractérise par une ataxie, une dégénérescence cérébelleuse, une immunodéficience, une forte radiosensibilité ainsi qu'une prédisposition aux cancers [41,181]. Les lignées AT montrent également une forte radiosensibilité liée à des défauts de réparation des CDB [62,63], témoignant ainsi du rôle clé d'ATM au niveau de la surveillance du génome et de la réponse aux RI, en particulier après induction de CDB.

2) Réparation des CDB par Single-Strand Annealing (SSA)

Parallèlement à la RH, un autre mécanisme, dont plusieurs effecteurs sont communs à la RH, peut également réparer les CDB. Il s'agit du système dit de *single-strand annealing* (SSA) (Figure 17). Ce mécanisme intervient dans la réparation de régions de microhomologie de séquences répétées de l'ADN par soudure des extrémités simple-brin.

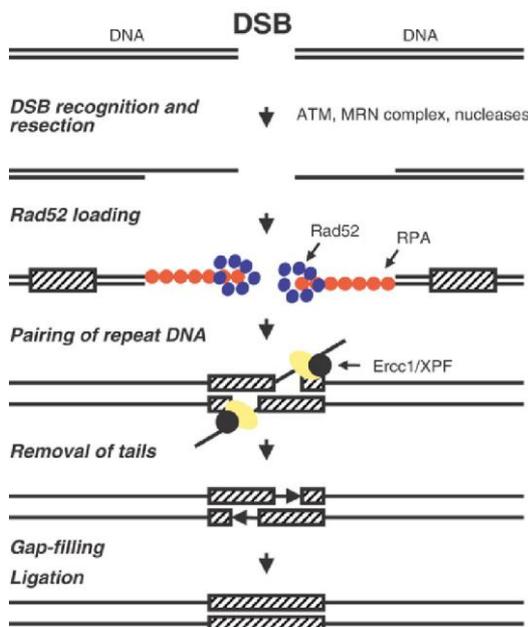


Fig. 17. Mécanisme de réparation des CDB par single-strand annealing (d'après Valerie et al. [194]).

Rad52 intervient, après reconnaissance de la CDB par le complexe MRN et ATM, pour permettre le rapprochement des extrémités. Celles-ci seront excisées par les protéines du NER, et les séquences manquantes seront synthétisées puis ligées, afin de restaurer une séquence répétée complète.

Après reconnaissance de la rupture double chaîne d'ADN par le complexe MRN et la protéine ATM, les extrémités subissent une résection par une exonucléase. Comme dans la RH, la protéine Mre11 serait impliquée dans cette étape grâce à sa capacité à aligner deux extrémités d'ADN et à en exciser une dans le sens 3'→5' [153]. Son activité nucléase s'arrêterait lorsqu'une séquence homologue entre les deux extrémités 5' sortantes serait identifiée [194]. Dans le complexe MRN, Rad50 possède une activité ATPase qui pourrait faciliter le déroulement de l'ADN, rendant la lésion accessible aux protéines de réparation [154]. La sous-unité Nbs1 semble, pour sa part, impliquée dans le transport nucléaire du complexe MRN et la transduction et l'amplification du signal de CDB entre les protéines

senseurs des dommages de l'ADN (principalement la kinase ATM) et le complexe MRN [54,66,113,208].

Après résection de la CDB par le complexe MRN, la protéine RPA se fixe sur les fragments d'ADN simple-brin sortants en 3' afin de les protéger des nucléases. La protéine Rad52 se fixe ensuite aux extrémités, permettant leur rapprochement. Les protéines du NER, ERCC1 et XPF, interviennent ensuite pour exciser les oligonucléotides 3' sortants. Les brèches entre les extrémités sont comblées par une polymérase avant d'être soudées par une ligase (par exemple l'ADN ligase I)[194].

La réparation par SSA est infidèle car une partie de l'information génétique est perdue lors des étapes de résection et d'excision.

3) *Cassures double-brin : toutes les mêmes ?*

Nos connaissances des mécanismes de réparation, toujours plus fines, nous permettent aujourd'hui de fournir quelques explications moléculaires concernant leur impact sur la radiosensibilité. Parmi les lésions radioinduites, seules les CDB [1] provoquent l'activation d'ATM et la cascade des événements associés :

- phosphorylation de H2Ax,
- phosphorylation des médiateurs BRCA1, 53BP1, MDC1
- phosphorylation de Chk2 et activation des checkpoints

Or, l'extrême radiosensibilité des cellules A-T [2] ne peut s'expliquer par les seuls défauts des checkpoints. Il a été démontré que des cassures non-réparées persistent longtemps après l'irradiation. Ces lésions réfractaires ne représentent qu'une petite partie (environ 10%) des dommages générés par l'irradiation, quantifiés par les foyers de γ -H2Ax (Fig. 18).

Un rapprochement a été fait avec les dommages à l'origine de la légère radiosensibilisation en cas d'inactivation du gène *Artemis*, qui intervient dans les réarrangements V(D)J et qui est responsable d'un syndrome d'immunodéficience sévère. Bien que son rôle rapproche Artemis plutôt du NHEJ, la protéine est phosphorylable de manière ATM-dépendante et acquiert ainsi une activité 5'-3' exonucléase, nécessaire à la digestion des extrémités endommagées. Le modèle, encore quelque peu hypothétique, comprend deux phases :

- La majorité des CDB est réparée relativement rapidement par NHEJ.
- Les lésions plus difficilement réparables (bases ou sucres endommagés), seront réservées à la voie ATM - Artemis, de cinétique plus lente. Cette distinction se justifie par le fait que la digestion des extrémités par Artemis peut occasionner une perte d'information génétique et représente donc un risque pour la cellule.

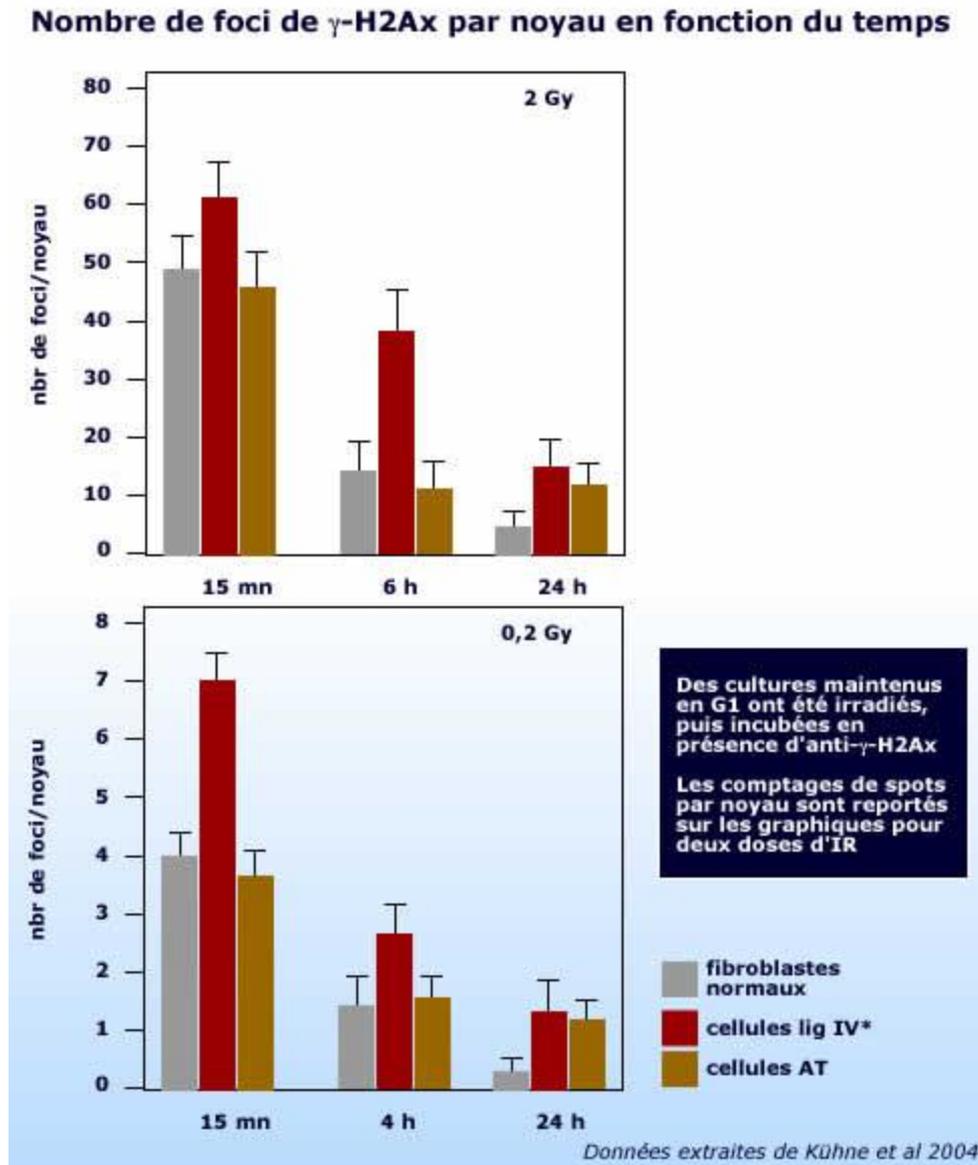


Fig. 18. Nombre de foci de H2Ax par noyau en fonction du temps (d'après Kühne et al., [107]). Trois types cellulaires sont irradiés à 2 doses. Des fibroblastes témoins, des fibroblastes d'ataxie-télangiectasie et d'autres porteurs d'une mutation hypomorphe de la ligase IV qui occasionne un déficit de la NHEJ. Malgré le déficit, les cellules lig IV* continuent à réparer au-delà de 24 heures post-irradiation. Les cellules AT réparent rapidement les CDB, aussi efficacement que les cellules normales, mais conservent 10% à long terme.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Lignées cellulaires

Nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires humaine, tumorales (SQ20B, HeLa) et non-tumorales (IMR90).

Pour étudier les mécanismes impliqués dans la réparation des lésions radio-induites par les protons, nous avons mesuré la survie de clones de cellules HeLa défectifs pour différentes voies de signalisation et de réparation des lésions de l'ADN. Ces clones, établis par le Dr. Denis Biard (CEA-DSV-IRCM/ INSERM U 935, Villejuif) ont été obtenus par transfection d'un vecteur répliatif pEBV siRNA portant une cassette de sélection à l'hygromycine B et codant des shRNA (short hairpin RNA). Ces shRNA contiennent des séquences siRNA (*small interfering RNA*) spécifique d'un ARN donné. Leur expression a pour effet d'empêcher la traduction d'un gène cible par dégradation de son ARNm. Les lignées cellulaires établies en culture sous pression de sélection à l'hygromycine B, sont dites « knock-down » (KD) pour les protéines d'intérêt.

Lignées	Type et origine	Condition de culture	Temps de doublement	Caryotype	p53
SQ20B	Cellules épithéliales squameuses humaines, carcinome tête et cou (J.B. Little, Harvard School of Public Health, Boston).	Cellules adhérentes, DMEM + SVF10% + PS + Hydrocortisone 0,4 µg/ml, 5% CO ₂ , repiquage tous les 7 jours	23 ± 2 h	59 ± 4 chromosomes	p53 mutée, non fonctionnelle, p21 nul ou taux réduit, c-raf 1 délété
IMR90	Fibroblastes humains normaux embryonnaires poumon (ATCC CCL-186)	Cellules adhérentes, DMEM + SVF15% + PS, 5% CO ₂ , repiquage tous les 7 jours	24 à 36 h	46 chromosomes, stable	wt/wt
HeLa	Cellules épithéliales humaines, carcinome épidermoïde du col utérin (J. Coppey, Institut Curie, Paris)	Cellules adhérentes, DMEM + SVF15% + PS, 5% CO ₂ , repiquage tous les 7 jours	22 ± 1 h	Aneuploïdie marquée 72 ± 2 chromosomes	p53 sauvage, inactivée par HPV16-E6

HeLa-KD* voir ci-dessous	Cellules épithéliales humaines, carcinome épidermoïde du col utérin (D. Biard, Villejuif, Paris)	Cellules adhérentes, DMEM + SVF15% + PS, 5% CO ₂ , +125 µg/ml hygromycine B repiquage tous les 7 jours	22 ± 1 h	Aneuploïdie marquée 72 ± 2 chromosomes	p53 sauvage, faiblement exprimée inactivée par HPV16-E6
---	--	---	----------	---	---

Tableau 6a : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées dans notre étude.

Clone HeLa ^{KD}	Gène cible	GeneBank accession number	pEBVsiRNA plasmid	Nucleotides ciblés
Vecteur contrôle	-	-	pEBVsiBD650	-
PARP1-KD 1011/12	PARP1	NM_001618	pEBVsiPARP1-2068	2068-2086
XRCC1-KD 1065/11	XRCC1	NM_006297	pEBVsiXRCC1-1832	1832-1850
OGG1-KD 784/27	OGG1	NM_0016819	pEBVsiOGG1-177	177-195
ATM-KD 1177/10	ATM	NM_000051	pEBVsiATM-1236	1236-1254
XRCC4-KD 694/9	XRCC4	NM_022550	pEBVsiXRCC4-674	674-692
DNA-PKcs-KD 743/1	DNA-PKcs	NM_006904	pEBVsiDNA-PKcs-5980	5980-5998
Artemis-KD 1514/3	Artemis	NM_001033855	pEBVsiArtemis-678	678-696
Artemis-KD 1514/12	Artemis	NM_001033855	pEBVsiArtemis-678	678-696

Tableau 6b : Liste des différents clones HeLa-KD utilisés dans cette étude.

Le choix des lignées a été guidé par d'une part par leurs paramètres radiobiologiques (radiosensibilité ou radiorésistance) comparables à ceux des tumeurs traitées au CPO (chordome, chondrosarcomes, mélanomes...), comme dans le cas des cellules SQ20B, d'autre part par la possibilité d'étudier des lignées dans lesquelles des défauts de réparation ont été introduits, comme dans le cas des cellules HeLa-KD (Tableau 6b).

3.2. Culture de cellules

La conservation des lignées s'effectue par congélation dans l'azote liquide, dans le milieu de culture additionné de 10% de DMSO. Toutes les lignées ont été cultivées en flacons de 25 cm² ventilés, en monocouche et maintenues en phase de croissance exponentielle dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂ sous humidité relative de 100%. Lorsque les cellules atteignent la confluence, les flacons sont rincés deux fois avec de l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) préchauffé à 37°C et les cellules sont isolées par trypsinisation (0,05% trypsine, 0,02% EDTA) suivie d'une centrifugation (4 min, 1500 rpm, 22°C) puis réensemencées dans du milieu préchauffé, après comptage en chambre de Malassez. Le nombre de passage a toujours été inférieur à 10 pour éviter une altération des caractéristiques génétiques de la lignée.

Le milieu de culture pour toutes les lignées utilisées dans ce travail était du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) à 4,5 g.l⁻¹ de glucose, additionné de l-Alanyl-L-Glutamine (Glutamax I, 0,86 g.l⁻¹), de pyruvate (0,1 g.l⁻¹), d'antibiotiques (pénicilline 10⁵ UI.l⁻¹ et streptomycine à 0,1 g.l⁻¹) plus 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour les SQ20B, et HeLa ou 15% SVF pour les IMR90. Pour la lignée SQ20B, de l'hydrocortisone 0,4 µg/ml a été ajoutée au milieu.

3.3. Protocoles d'irradiation

3.3.1 Irradiation gamma

La source de rayonnement gamma que nous avons utilisée est un irradiateur IBL-637 (Cis-Bio international) chargé à 6000 Ci de ¹³⁷Cs (Fig. 19). Les cellules ont généralement été irradiées à température ambiante (21-24°C) dans le milieu de culture. Lorsque la réparation doit être bloquée, l'irradiation se fait à 0°C (glace). Le débit de dose utilisé pour les études de survie était de 0,045 Gy/s (2,69 Gy/min) pour comparaison avec le faisceau de protons de 201 MeV et de 0,129 Gy/s (7,77 Gy/min) pour comparaison avec le faisceau de protons de 76 MeV. La dosimétrie de l'IBL-637 a été réalisée par la méthode à l'alanine par le Laboratoire National Henri Becquerel et corrélée au dosimètre de Fricke et à la réponse d'un électromètre.



Fig. 19. Irradiateur IBL-637.

3.3.2 Irradiation par les protons - Montage et constitution des faisceaux

L'étude sous protons a été réalisée en utilisant la ligne médicale de l'ancien synchrocyclotron de l'ICPO. Nous avons utilisé les faisceaux d'énergie modulée de 201 MeV (utilisé pour l'irradiation des tumeurs de la base du crâne) et de 76 MeV (utilisé pour l'irradiation des tumeurs oculaires).

Une ligne de transport horizontale maintenue sous vide poussé et constituée d'une succession de dipôles et quadripôles permet d'acheminer le faisceau de protons depuis le synchrocyclotron jusqu'à l'entrée de la salle de traitement. Le faisceau subit ensuite une mise en forme afin que les distributions de dose transverses et axiales répondent aux critères d'homogénéité requis pour l'irradiation d'un volume clinique. La technique utilisée à l'ICPO est une technique dite passive, car elle utilise les propriétés de diffusion et de ralentissement des protons dans la matière.

La profondeur maximale de traitement, déterminée par le parcours maximal des protons et en conséquence par l'énergie incidente est adaptée au moyen d'un absorbeur. L'énergie initiale des protons 201 MeV est dégradée jusqu'à une énergie de 76 MeV pour les applications ophtalmologiques. On interpose un absorbeur en graphite dans la ligne de transport avant le dernier dipôle de déviation afin d'augmenter la qualité du spectre énergétique du faisceau débouchant en salle de traitement. On obtient ainsi une pénombre distale réduite et une plus faible largeur du pic de Bragg.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, le pic de Bragg (Fig. 1), qui caractérise le dépôt d'énergie par les protons, présente un gradient de dose très élevé en fin de parcours et un rapport dose-pic/dose-entrée important. Il est nécessaire d'élargir le pic de Bragg afin d'irradier la tumeur cible dans toute son épaisseur axiale et avec une dose physique bien définie dans tout le volume considéré. On y parvient en modulant l'énergie du faisceau pour créer un pic de Bragg dit "étalé" ou "modulé", que nous désignerons dans ce qui suit par son acronyme anglais SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*).

Le SOBP est obtenu par la superposition de courbes de Bragg associées à des protons de différentes énergies (Fig. 23). Cette superposition s'obtient en interposant entre l'entrée du faisceau et le patient un secteur rotatif appelée modulateur (Fig. 20). Le modulateur d'énergie est constitué de 8 paliers divisés chacun en plusieurs secteurs angulaires d'épaisseurs variables. Le ralentissement des protons est fonction de l'épaisseur du secteur rencontré par le faisceau. La rotation du modulateur pendant la durée du traitement permet la superposition d'un grand nombre de pics de Bragg décalés en profondeur. La distribution de dose physique en profondeur présente au final une zone homogène appelée "plateau modulé" qui correspond à la plus grande largeur de la cible à traiter. Le nombre de secteurs, par conséquent l'épaisseur du modulateur dépend du volume à traiter. Pour des raisons d'encombrement, on adapte le

matériau du modulateur en fonction de l'énergie nominale (aluminium pour le faisceau 201 MeV, polyméthylméthacrylate pour le faisceau 76 MeV). Une bibliothèque de différents modulateurs est disponible à l'ICPO pour créer les largeurs exigées (distance entre les deux niveaux 90% du maximum).



Fig. 20. Modulateur avec 4 secteurs de 2 sous-secteurs. Cette pièce tourne à 2000 tours/minute. Durant le temps d'irradiation (en moyenne 1 min) la tumeur est balayée 16.000 fois par les différents pics dont la superposition constitue le pic de Bragg modulé.

Le désavantage de la modulation est un rapport moins favorable entre la dose du plateau en amont du pic de Bragg modulé et la dose du plateau modulé lui-même. Les tissus sains traversés en amont du pic de Bragg reçoivent ainsi une dose plus importante que dans le cas d'un faisceau direct.

Les caractéristiques physiques du faisceau étant très différentes pour les deux énergies utilisées, on adapte le dispositif de mise en forme du faisceau dans la salle de traitement pour chaque énergie. La géométrie d'ensemble de la ligne de faisceau est conservée (Fig. 21). On retrouve les mêmes éléments tels que le modulateur d'énergie, les absorbeurs, le diffuseur et les collimateurs, chacun assurant une action bien précise sur le faisceau. Seules la nature et la forme de certains d'entre eux sont modifiées.

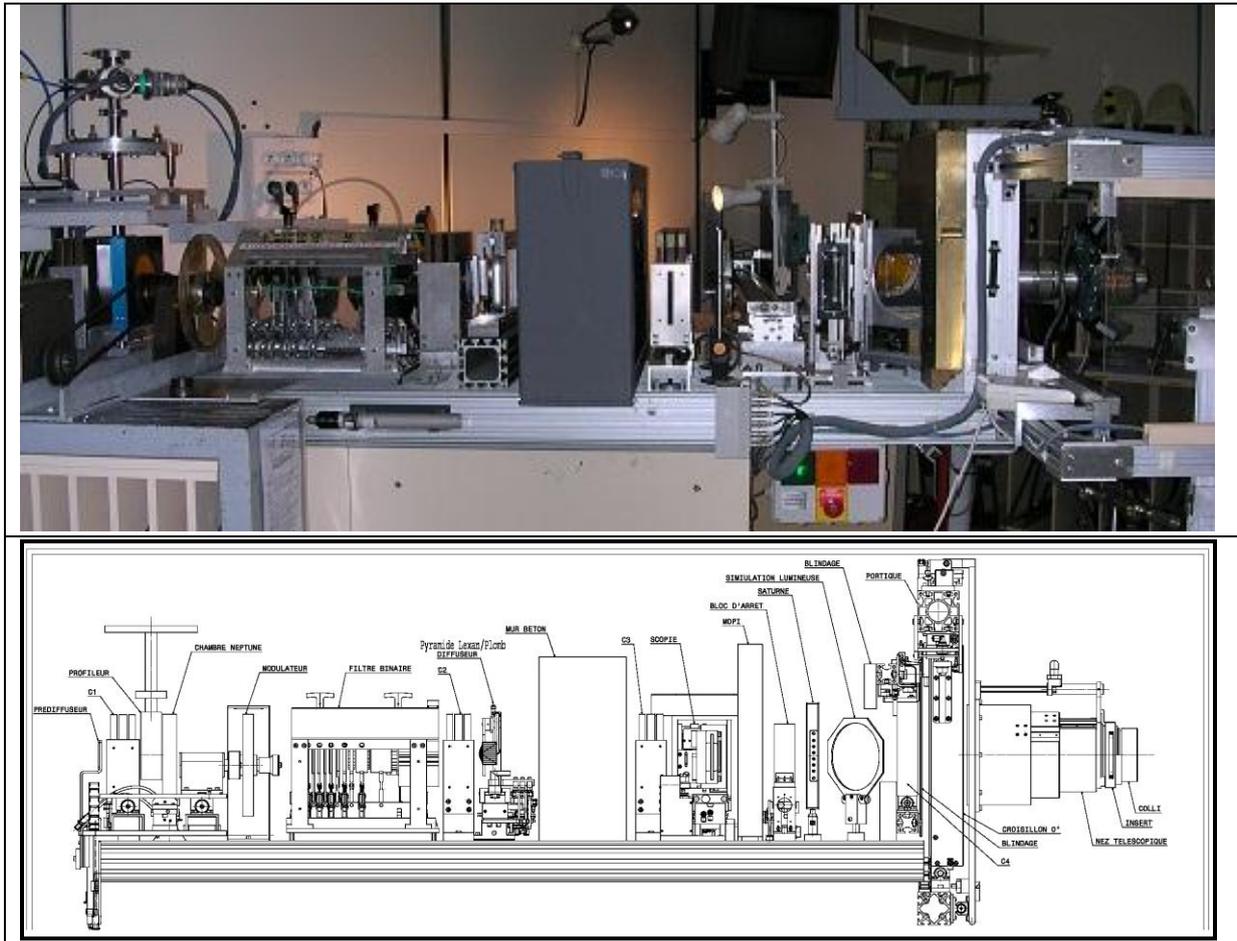


Fig. 21. – Ligne thérapeutique du faisceau de protons à l'ICPO.

- Un « absorbeur » ou « filtre binaire », en plexiglas, dégrade l'énergie pour adapter le parcours maximal des protons à la profondeur de pénétration du faisceau. Les absorbeurs sont constitués d'une série de plaques de polycarbonate dont chaque épaisseur correspond au double de la plaque précédente ce qui correspond à un filtre binaire. En fonction des plaques sélectionnées mises en place dans la ligne, les protons sont plus ou moins ralentis. Ce système permet d'ajuster le parcours des protons à la profondeur maximale du volume à traiter. Le parcours peut être ajusté à 0.25 mm près correspondant au plus petit état du filtre binaire. Pour les indications intracrâniennes utilisant l'énergie nominale 201 MeV, deux plaques de plomb sont insérées dans le système afin d'adapter les conditions de diffusion en fonction de l'énergie sélectionnée, à savoir :

- Un « modulateur » pour étaler le dépôt d'énergie et pouvoir traiter toute la tumeur en profondeur (Fig. 20).
- Un « diffuseur » pour étaler le faisceau latéralement afin d'obtenir une distribution de dose homogène dans le plan perpendiculaire à l'axe du faisceau sur la taille des champs d'irradiation. Un diffuseur spécifique à chaque énergie nominale garantit

l'homogénéité de la distribution de dose transverse du faisceau dans le volume cible avec une précision de $\pm 3\%$ par rapport à la moyenne.

- Un « collimateur » pour moduler dans le plan latéral la forme du dépôt d'énergie. Les collimateurs limitent le diamètre du champ d'irradiation à des positions particulières le long de la ligne de faisceau, et permettent de réduire la quantité de protons diffusés ne participant pas à la dose au niveau du volume cible assurant ainsi une meilleure radioprotection des patients.

- Un « compensateur » pour ajuster la distribution de dose en profondeur

Ces dispositifs sont façonnés sur place. Ils sont indispensables pour délivrer une dose d'irradiation de façon homogène à une profondeur extrêmement précise dépendante de l'énergie des protons (Fig. 22).

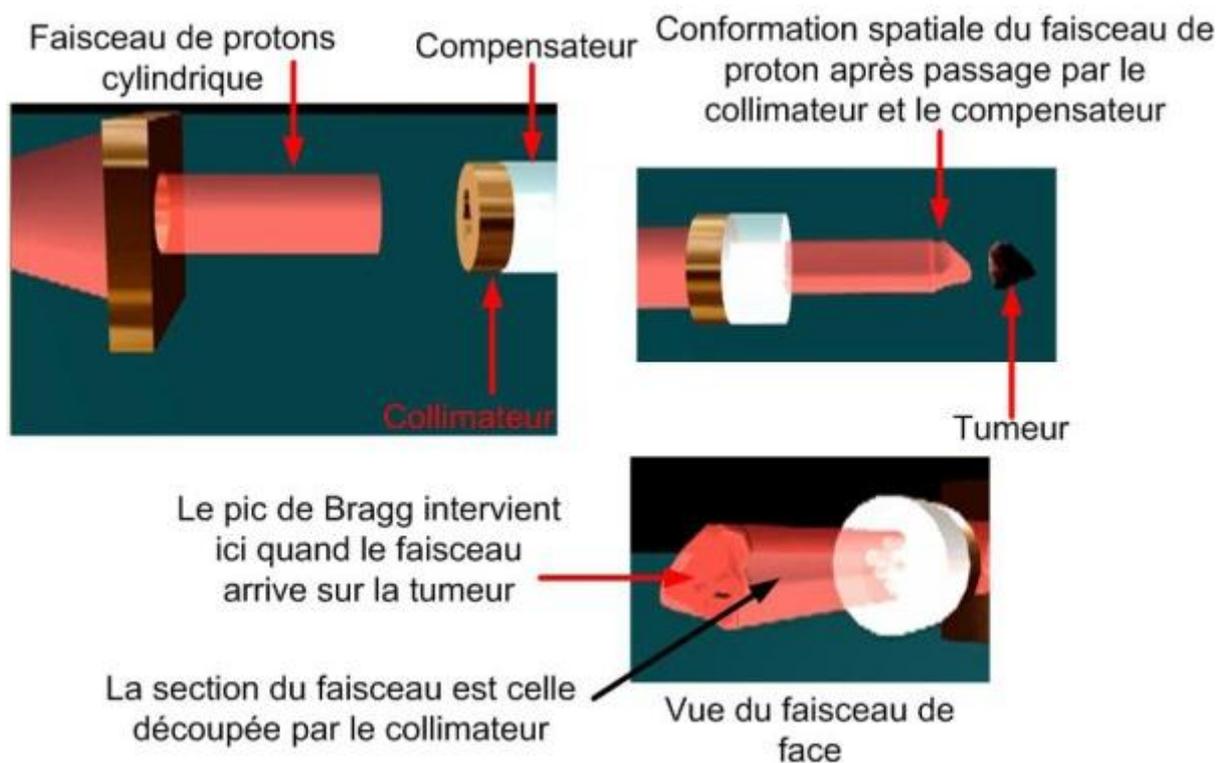


Fig. 22. – Conformation 3D du faisceau de protons au moyen du collimateur et du compensateur [93].

En définitive, l'irradiation a été effectuée à trois positions le long de la courbe de la trajectoire des protons (Fig. 23) :

P1 : à l'entrée du faisceau (P1) avant le plateau de Bragg (à 80% de la dose),

P2 : au milieu du plateau du SOBP,

P3 : dans la partie distale du SOBP.

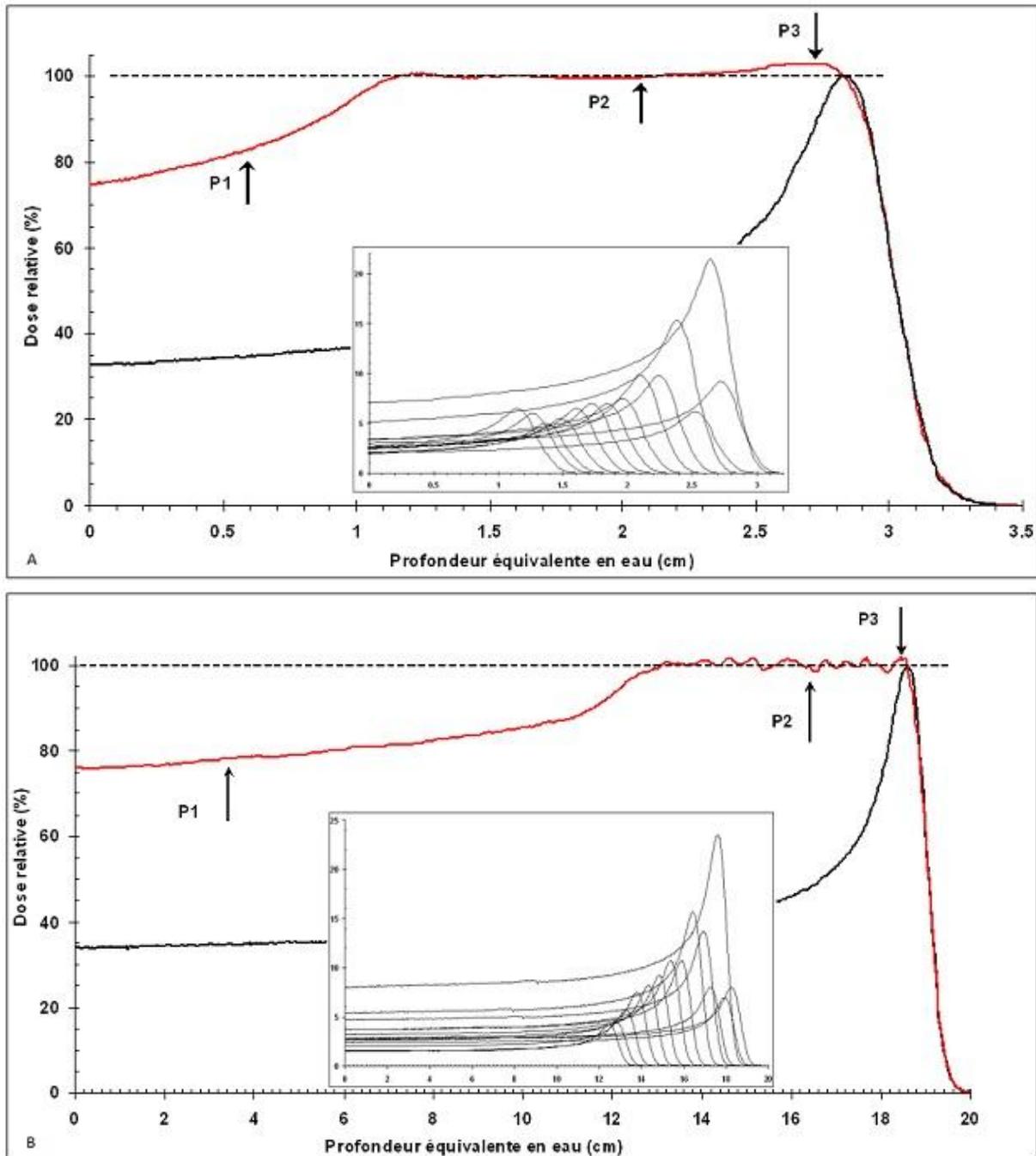


Fig. 23. Distribution de dose en profondeur mesurée dans l'axe du faisceau de protons aux deux énergies nominales 76 et 201 MeV. Les pics de Bragg dont la sommation génère la courbe de Bragg modulée sont représentés avec leur pondération respective (insert). Les positions P1, P2 et P3 indiquent la profondeur équivalente de la couche de cellules irradiées.

Figure. A : énergie nominale de 76 MeV dégradée à un parcours de $R90\% = 29$ mm eau (~ 58 MeV) ; largeur de modulation (distal 90% - proximal 90%) = 21 mm eau. (P1 = 4,9 mm eau,

$P2 = 20,5 \text{ mm eau}$, $P3 = 26,9 \text{ mm eau}$)

Figure. B : énergie nominale de 201 MeV dégradée à un parcours de $R90\% = 188 \text{ mm eau}$ ($\sim 166 \text{ MeV}$) ; largeur de modulation (distal 90% - proximal 90%) = 71 mm eau. ($P1 = 26 \text{ mm}$, $P2 = 160 \text{ mm eau}$, $P3 = 185 \text{ mm eau}$)

Les flacons ont été irradiés en position verticale dans une cuve en plastique, la face sur laquelle se trouvent les cellules étant tournée vers le faisceau. Pour les études de survie, l'irradiation a été faite dans l'air, à la température ambiante. Pour la mesure de l'incidence des cassures de l'ADN et de leur réparation, l'irradiation a été faite dans de l'eau associée à de la glace pour obtenir une température de 0°C . La glace était placée derrière les boîtes irradiées pour éviter l'interaction avec le faisceau de protons (Fig. 24).



Fig. 24. Disposition des flacons de culture en cours d'irradiation sous faisceau de protons.

Pour l'irradiation dans le faisceau de 76 MeV, un repère circulaire a été gravé sur les flacons (Fig. 25). Le diamètre de ce repère (30 mm) correspond au diamètre maximal du champ d'irradiation (sans pénombre) pour cette énergie. Seules les colonies situées à l'intérieur de la zone ainsi délimitée ont été prises en considération dans l'analyse.

Le débit dose utilisé pour toutes les expériences a été de 7,5 Gy/min pour le faisceau de 76 MeV et de 3 Gy/min pour le faisceau de 201 MeV, proche de celui utilisé en clinique pour les deux faisceaux des énergies différents.



Fig. 25. Flaçon de 25 cm² irradié dans le faisceau de 76 MeV. Le flaçon contient des cellules SQ20B irradiées à la dose de 3 Gy. On observe la différence entre le nombre des colonies à l'intérieur et à l'extérieur de la zone (cercle) irradiée.

L'alignement du faisceau a été contrôlé grâce à deux systèmes de mesure. Une chambre à fils (Ganil, France) placée en amont de la ligne vérifie le centrage du faisceau initial sur l'axe mécanique. Une chambre d'ionisation à transmission dont l'anode est pixélisée (Institut de Physique Nucléaire, Rome, Italie) donne une information sur la forme de la distribution de dose transverse du faisceau après sa mise en forme.

Le contrôle de qualité dosimétrique est réalisé dans une cuve à eau avec une chambre d'ionisation plate à électrodes parallèles (PPC05, IBA) pour l'acquisition des courbes de Bragg dans l'axe du faisceau et avec une chambre d'ionisation cylindrique de diamètre 6 mm (CC13, IBA) pour les distributions transverses de dose.

3.4 Détermination de la survie clonogénique

La survie au rayonnement a été déterminée selon la technique de formation de colonies. Les cellules en phase de croissance exponentielle ont été isolées par trypsinisation, ensemencées à la densité requise (1000 à 2000 cellules par flaçon de 25 cm²) puis placées en incubateur pendant 7 h minimum. Ce temps d'incubation, trop court pour permettre un cycle de division et modifier la multiplicité cellulaire, est suffisant pour obtenir l'adhésion des cellules viables au support et permettre leur transport. Après irradiation, les flaçons ont été replacés en incubateur durant le temps nécessaire pour 10 générations. Les colonies formées (Fig. 26) ont été rincées au PBS puis fixées au méthanol, colorées au bleu de Coomassie et comptées soit sous loupe, soit semi automatiquement par le système ColCount. Chaque point de mesure est obtenu par une moyenne sur 2 échantillons ou plus. Dans le cas du faisceau de 76 MeV, seules les colonies se trouvant à l'intérieur de la zone efficace d'irradiation sont comptées.

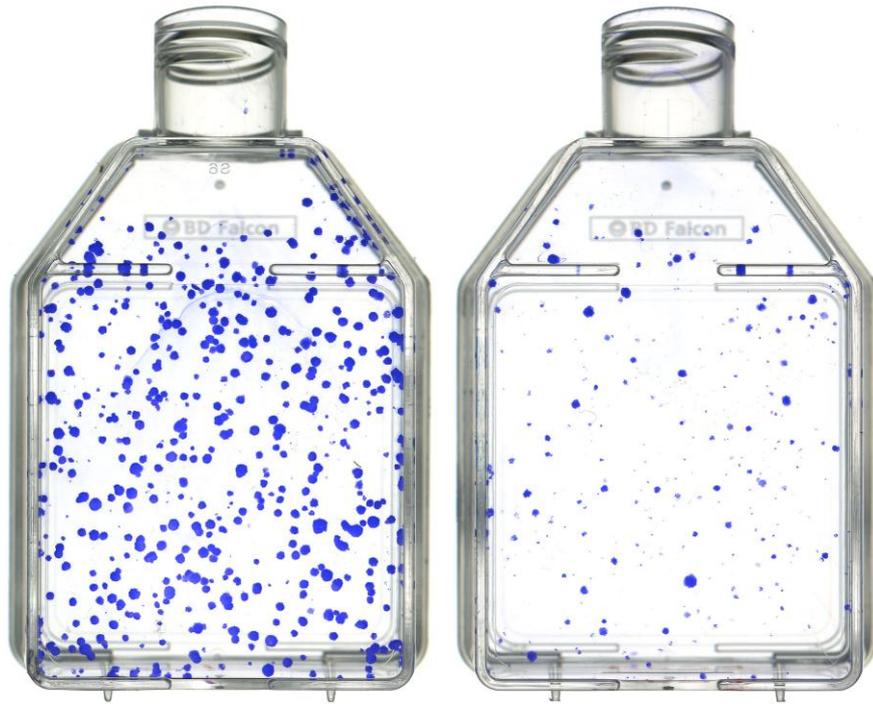


Fig. 26. Colonies de cellules non irradiées (gauche) et irradiées (droite) 12 jours après une irradiation de 6 Gy (200 MeV).

3.4.1 Courbes de survie cellulaire in vitro:

La courbe exprimant la relation entre la proportion S de cellules survivantes en fonction de la dose D est appelée courbe de survie (Fig. 27). Sa forme dépend du type cellulaire et du TEL du rayonnement.

Pour les rayonnements de TEL élevé la survie répond à une équation exponentielle,

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

La survie de la plupart des cellules mammifères exposées à des rayonnements de faible TEL présentent un épaulement. La courbe répond alors à une équation linéaire-quadratique,

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

où α et β sont des paramètres ajustables qui déterminent la radiosensibilité de la lignée cellulaire considérée. Le paramètre α représente la tangente à l'origine de la courbe. Il exprime la contribution des "lésions létales d'emblée", c'est-à-dire des dommages chromosomiques non réparables. Le paramètre β détermine la mortalité liée au carré de la dose. Il est corrélé à la manifestation des "lésions sublétales".

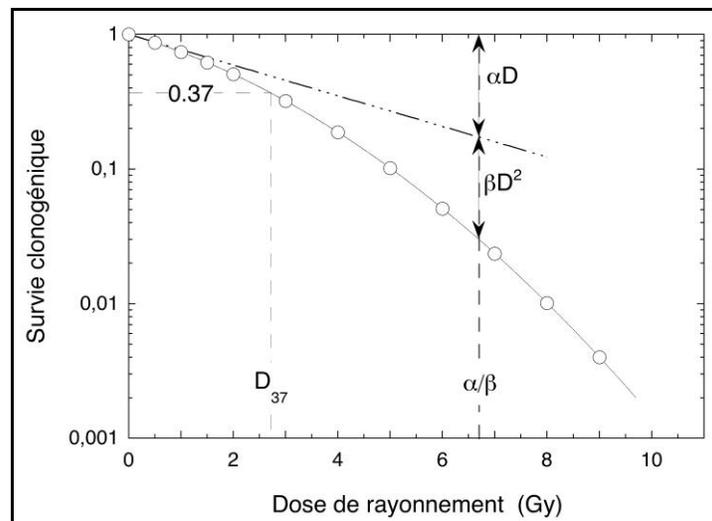


Fig. 27. Allure générale de la courbe de survie [192]. Le rapport α/β (en Gy) correspond à la dose pour laquelle αD et βD^2 contribuent pour une part égale à la létalité radio-induite.

La radiosensibilité est fréquemment exprimée par la dose létale moyenne D_{37} , correspondant à la dose pour laquelle la survie est égale à $1/e \approx 0,37$. D_{37} est liée à α et β par la relation :

$$D_{37} = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta}}{2\beta}$$

qui se simplifie comme $D_{37} = 1/\alpha$ lorsque la courbe de survie est exponentielle.

3.5 Electrophorèse en champs pulsés (ECP)

3.5.1 *Principe*

Depuis plusieurs années, l'électrophorèse en champs pulsés (ECP) est devenue la méthode de référence pour séparer les ADN de haut poids moléculaire. La première description en a été faite par Schwartz et Cantor [173]. Plusieurs modèles du mode de migration des fragments d'ADN dans le gel ont depuis été décrits. Dans le cadre de champs alternés, deux ont été démontrés: le modèle de réorientation par formation d'une pelote statistique [193] et celui du retour en arrière ou "*switchback*" [179].

Les versions d'électrophorèse en champs pulsés sont multiples et ont été décrites antérieurement [23]. Les deux groupes principaux sont les ECP à champs non homogènes et ceux à champs homogènes. Dans ce dernier groupe c'est le *Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)* que nous utilisons. Le principe de cette électrophorèse consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps. A chaque modification du champ, la molécule d'ADN doit se réorienter parallèlement au nouveau champ. Le temps nécessaire à la réorientation est proportionnel à la longueur de la molécule. Lorsque le champ est rétabli dans son sens initial, la molécule doit une nouvelle fois se réorienter. Ces temps de réorientation provoquent un retardement de la migration nette qui est proportionnel à la taille de la molécule.

Cette méthode permet ainsi de quantifier indirectement les CDB par la mesure du taux d'ADN extrait ou FAR (Fraction of Activity Released) et de la longueur des fragments double-brin. Sous l'effet de champs électriques appliqués selon un angle adéquat avec la direction moyenne de migration de l'ADN, les fragments d'ADN, chargés négativement, migrent dans une matrice d'agarose avec une vitesse inversement proportionnelle au logarithme de leur masse. La migration dépend également du champ électrique et de la concentration du gel d'agarose utilisée. L'utilisation d'un champ électrique qui varie périodiquement dans sa direction et dans son intensité permet de dissocier la pelote statistique formée par les fragments d'ADN entrelacés.

3.5.2 *Méthode utilisée*

(i) Préparation des plugs

Les cellules ont été cultivées 48 h en présence de [2-¹⁴C] thymidine à la concentration de 0,10 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les cellules SQ20B et de 0,03 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les cellules IMR90. Le milieu de culture est aspiré et remplacé, après rinçage avec du PBS froid (glace) par un tampon PBS contenant 2 mM EDTA (glace), ce qui bloque la réparation. Les cellules sont alors récoltées à l'aide d'un grattoir et centrifugées (2500 rpm, 4 min, 4°C). Le surnageant est soigneusement éliminé. Les cellules sont remises en suspension dans un volume connu de PBS à 4°C, de

manière à obtenir une densité de 3.3×10^6 cellules/ml. Un aliquot de 150 μ l (soit 5.10^5 cellules) est prélevé, incubé brièvement à 37°C (1 min) et mélangé sous agitation (vortex) à un équivalent d'agarose "low-melting" à 1.6 % dans le PBS maintenu à 37°C. La suspension obtenue est rapidement déposée dans des moules rectangulaires en plastique (4x8x10 mm) préalablement refroidis sur glace. Les moules sont gardés sur glace pendant 60 min permettant à l'agarose de se solidifier.

Les blocs d'agarose ou plugs sont alors démoulés et soumis à une double lyse à froid (4°C) selon la méthode préconisée par Stenerlöw et al. [180]:

- Les cellules contenues dans les blocs sont lysées et déprotéinisées par 2 ml de solution de lyse 1 (0,5 M EDTA, 2% N-lauryl Sarcosyl, 1 mg.ml⁻¹ protéinase K, pH 8).

- Les blocs sont lavés deux fois, avec 2 ml de Tris-HCl EDTA (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8) pendant 30 minutes à 4°C.

- Une seconde lyse est effectuée avec la solution de lyse 2 (1,85 M NaCl, 0,15 M KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 4 mM tris, 0,5% Triton X-100, pH 7,5) 48 h à 4°C.

- Après l'arrêt de l'action lytique des détergents, les blocs sont maintenus dans 2 ml d'EDTA 40 mM, pH 8, afin de les conserver (4°C). Ils ont été utilisés dans les 15 jours afin d'éviter toute dégradation de l'ADN.

Pour la méthode de lyse à chaud les blocs ont été d'abord incubés une nuit à froid dans 3 ml de milieu de lyse 1, puis transférés dans le même tampon à 50°C pendant 24 h. A la fin de l'incubation on raffermit les blocs dans la glace. Les blocs sont lavés deux fois, avec 2 ml de Tris-HCl EDTA (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8) pendant 30 min à 4°C. Une seconde lyse est effectuée avec la solution de lyse 2 pendant 48 h à 4°C. Après l'arrêt de l'action lytique des détergents, les blocs sont stockés comme décrit précédemment.

(ii) Migration, traitement et révélation

Les blocs sont intégrés dans les puits d'un gel 0,8% d'agarose (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad) dans du tampon TAE (40 mM Tris, 40 mM Na acétate, 2mM EDTA, pH8). Le gel est placé au centre de la chambre d'électrophorèse où circule le même tampon TAE maintenu à 14°C grâce à un thermostat. Des marqueurs de poids moléculaire Bio-Rad, *Schizosaccharomyces pombe* (5.7, 4.6, 3.5 Mb) et *Saccharomyces cerevisiae* (0.225, 0.285, 0.365, 0.450, 0.565, 0.610, 0.680, 0.750, 0.785, 0.825, 0.945, 1.02, 1.125, 1.6 et 2.2 Mb) sont intégrés dans le gel. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon TAE circulant et maintenu à 14°C par un refroidisseur, selon le protocole suivant :

	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
Switch time (s)	1200	1500	1800
Run time (h)	24	24	24
Angle	96°	100°	106°
Voltage gradient	2 V/cm	2 V/cm	2 V/cm

Après migration, le gel est incubé pendant 1 heure dans un bain de bromure d'éthidium (BET) afin de visualiser les marqueurs de poids moléculaires, à la concentration de $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ puis lavé 30 min dans le tampon TAE. Après photographie du gel sous transillumination UV, le gel est séché dans un sécheur (BioRad) pendant 2 h à 80°C . Il présente alors l'aspect d'une couche très fine d'agarose intégrée au support. Le gel est révélé pendant 3 à 7 jours dans la cassette d'un PhosphorImager(Fig. 28). L'écran de la cassette est ensuite développé par le scanner et l'analyse de l'image du gel est réalisée en utilisant le logiciel ImageQuant. Les profils de migration d'ADN obtenus par PhosphorImager et l'utilisation de marqueurs de poids moléculaire, permettent d'estimer la distribution en taille des fragments induits par les traitements. Les profils de migration présentent classiquement trois zones correspondant respectivement aux puits ($> 10 \text{ Mbp}$), à la "zone de compression" et à la "zone de migration" ($0,1-10 \text{ Mbp}$). En faisant correspondre le profil de la zone de migration à la migration des marqueurs de poids moléculaire, on obtient une évaluation de la taille des fragments d'ADN, ce qui permet de remonter au nombre de CDB. On se borne le plus souvent à mesurer la FAR, c'est à dire la proportion d'ADN $\leq 10 \text{ Mbp}$ extraite des puits (plugs) du gel d'agarose (Figure 28).

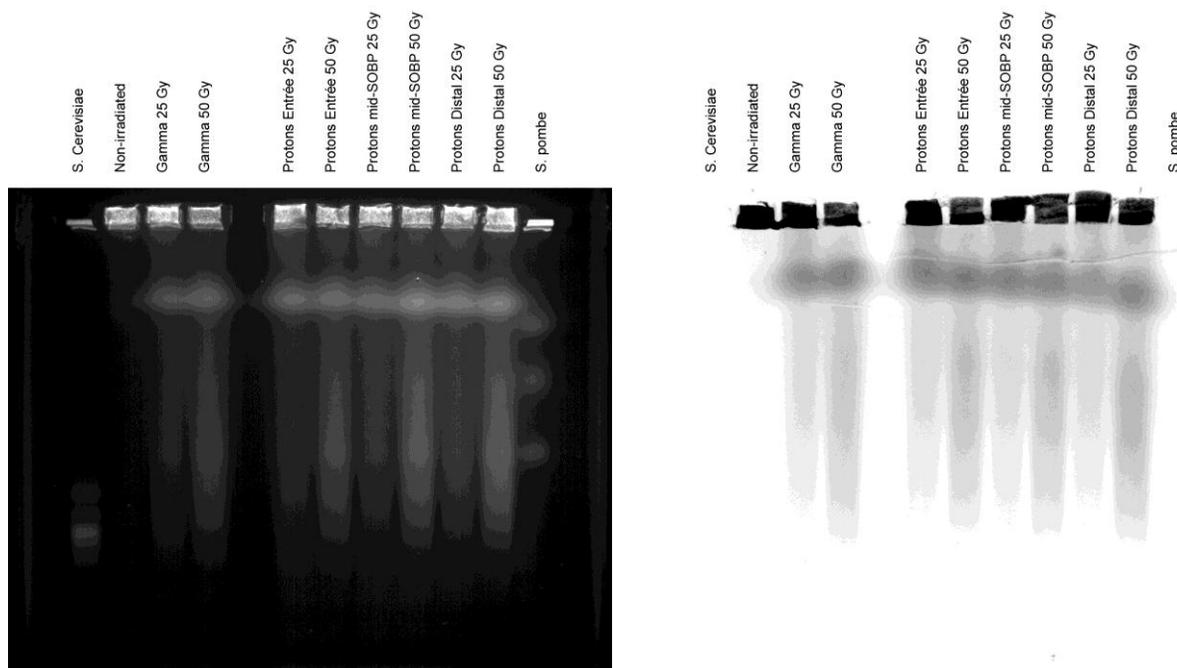


Fig. 28. Révélation de la migration de l'ADN (cellules SQ20B) par fluorescence (bromure d'éthidium, gauche) ou radioactivité (Phosphorimager, droite).

Les techniques d'ECP se sont rapidement imposées comme le meilleur moyen de séparation des fragments d'ADN résultant de la formation de cassures double-brin [36]. Toutes les versions, avec certaines limites, peuvent être utilisées pour l'étude des cassures double-brin. Une discussion est ouverte quant au meilleur angle entre champs pour obtenir la meilleure séparation. L'intérêt de cette technique est double, sa spécificité pour les CDB est complète [179]. Toutefois sa sensibilité reste faible [22].

La présence dans l'ADN irradié de sites sensibles au pH ou à la chaleur a été décrite et peut donner lieu à un excès de cassures simple- ou double-brin [180]. Par différentes méthodes de lyse à chaud et à froid, Stenerlöw *et al.* ont montré qu'une lyse à chaud pouvait provoquer un excès de cassures double-brin de l'ordre de 30% de celles obtenues à froid [180]. C'est donc une des méthodes à froid que nous avons choisi d'utiliser dans la plupart des expérimentations utilisant l'ECP. Cependant, afin de confirmer ces constatations, nous avons effectué une comparaison des deux conditions de lyse.

Selon la littérature [183], les lésions simple-brin et oxydatives peuvent être décelables *in vitro* par des enzymes comme Fpg (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase) qui permet la détection du produit majeur de l'oxydation des purines, la 8-oxoguanine, et Nth (endonucléase III) avec une double activité N-glycosylase et AP-lyase. Ces enzymes hydrolysent spécifiquement les lésions oxydatives de l'ADN en les transformant en CDB supplémentaires détectables par ECP. Nous avons utilisé les deux enzymes, en comparant les fragments d'ADN radio-induits avec ou sans traitement enzymatique.

Le système d'ECP que j'ai utilisé (CHEF DR III, Bio-Rad), consiste en un bain électrolytique à liquide circulant et thermostaté (Fig. 29). Vingt-quatre électrodes sont positionnées de façon symétrique sur les côtés d'un hexagone. Le gel est déposé au centre de ces électrodes. Le voltage est appliqué entre les paires opposées d'électrodes pour produire un champ homogène. Deux champs électriques d'amplitude égale sont appliqués alternativement, réorientant les molécules d'ADN d'un angle pouvant varier de 90 à 120°. Plusieurs paramètres peuvent affecter l'analyse de l'ECP: la concentration en ADN, la relation dose-réponse, le cycle cellulaire, la concentration d'agarose, les conditions de lyse, le temps de "pulse" de l'électrophorèse, le gradient du champ électrique, et la température du tampon d'électrophorèse.



Fig. 29. Système d'ECP - CHEF DRIII, Bio-Rad. Les 24 électrodes positionnées de façon symétrique sur les côtés d'un hexagone produisent un champ homogène. Le gel est déposé au centre de ces électrodes.

3.6 Electrophorèse de l'ADN en microgel (*Comet assay*)

Depuis plusieurs années, le “*comet assay*” ou “*single-cell gel electrophoresis*” (SCGE) est une méthode populaire pour l'évaluation des dommages de l'ADN. Des revues générales sur cette technique ont été publiées par plusieurs auteurs [6,43,44,59,85,125,167,177,189-191]. Brièvement, Östling et Johanson [147] ont été les premiers à développer la technique d'électrophorèse en microgel pour la détection de dommages de l'ADN au niveau d'une seule cellule. Plus tard, Singh [174] a introduit une technique d'électrophorèse alcaline (pH > 13). Cette version est plus sensible pour mesurer l'effet des agents génotoxiques (cassures simple- et double-brin) [189], mais introduit un biais dû à la dégradation de l'ADN par le pH alcalin.

La technique mesure l'incidence des cassures de brin d'ADN produites soit directement par un agent physique ou chimique, soit indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages, soit encore lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tels que l'apoptose. A partir d'une suspension, les cellules sont incluses dans un microgel d'agarose sur une lame de microscope et placées, après lyse, dans un champ électrophorétique. En présence de cassures de brin, l'ADN est relaxé et migre vers l'anode en formant une «queue de comète» (Fig. 30) qui sera visualisée après marquage par un fluorochrome. Comme nous l'avons décrit plus haut, selon les conditions expérimentales, la méthode permet l'analyse globale des dommages de l'ADN, induits par le rayonnement ou bien elle peut être sélective d'un type de lésions particulier. Elle est applicable à tous les types cellulaires dès lors qu'une suspension de cellules viables peut être réalisée. Cette technique ne nécessite que quelques milliers de cellules. Sa sensibilité est du même ordre que celle de l'éluion alcaline sur filtre et permet d'explorer l'effet de doses compatibles avec la survie cellulaire [4]. Cependant, elle est sujette aux mêmes artefacts que l'éluion, en particulier à des effets de rétention conférés par certaines structures de l'ADN en phase S, et elle ne permet pas d'avoir une image “instantanée” de l'état du système en raison de la lenteur du processus de lyse dû à la diffusion des agents de lyse dans la couche d'agarose. La technique des “blocs” d'agarose en CHEF a le même inconvénient de sorte que l'éluion sur filtre est irremplaçable dès lors qu'on désire avoir une image instantanée d'un processus rapide.

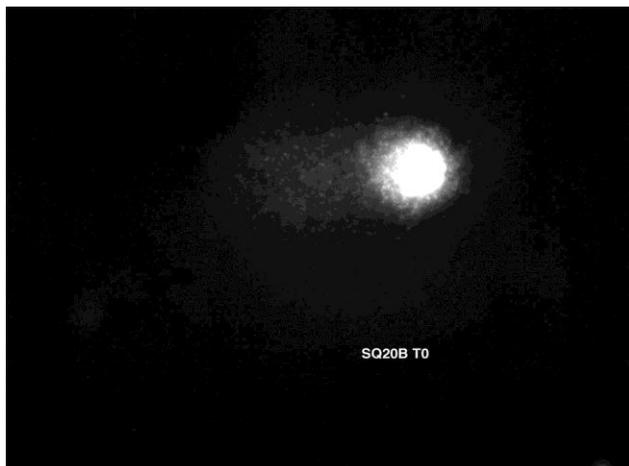


Figure 30a. Cellule SQ20B témoin



Figure 30b. Cellule SQ20B témoin + Fpg. On observe la fragmentation de l'ADN induite par l'enzyme.



Figure 30c. Cellule SQ20B après irradiation 3 Gy. En augmentant la dose on augmente aussi la fragmentation de l'ADN.

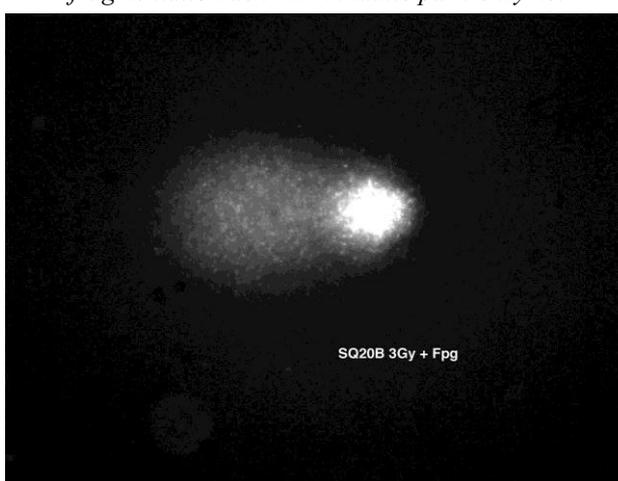


Figure 30d. Cellule SQ20B après irradiation 3 Gy + Fpg. L'enzyme accroît le taux de fragments d'ADN.

Fig. 30. Comète - la tête et la queue de comète d'une cellule SQ20B non irradiée et après irradiation à 3 Gy, sans et après un traitement par la Fpg.

L'analyse sélective de la formation et de la réparation des lésions de l'ADN distinctes des cassures de brin franches ou des sites alcali-labiles (convertis en cassures par traitement alcalin) est devenue possible par l'utilisation d'enzymes de réparation purifiées qui vont spécifiquement cliver le brin d'ADN au site lésionnel. Cette approche augmente la spécificité et la sensibilité du test. Dans notre expérience nous avons utilisé la Fpg, qui permet la détection du produit majeur de l'oxydation des purines, la 8-oxoguanine. Les sites sensibles à l'enzyme sont convertis en cassures d'ADN additionnelles ce qui fait que la longueur et l'intensité de la queue de comète augmentent [43] (Fig. 30 b et d).

Il n'y a pas de consensus pour la méthode d'interprétation des résultats. La longueur de la queue n'est pas un bon paramètre [44]. Les paramètres les plus utilisés sont la fluorescence relative de la tête et de la queue (normalement exprimé par un pourcentage

d'ADN dans la queue, analogue à la FAR en ECP) et le moment de la queue. Dans notre expérience nous avons utilisé la FAR.

3.6.1 *Méthode utilisée*

(i) **Préparation des lames**

Nous avons utilisé des lames dépolies à zone claire centrale (Erie Scientific) et lamelles 24 x 50 mm. Pour notre expérience nous avons utilisé de l'agarose SeaKem LE à 1% dans le PBS isotonique. Les lames ont été préparées selon la méthode décrite par Tice [189].

(ii) **Préparation des cellules dans l'agarose**

De l'agarose Low Melting (Sigma A-9414) à 1% dans le PBS est aliquoté en volume de 450 µl dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et conservé en surfusion à 37°C.

Les cellules,ensemencées quatre jours auparavant, sont irradiées soit dans les flacons de culture, soit après incorporation dans l'agarose. Nous avons utilisé la première méthode du fait de la technique d'irradiation au CPO. Après l'irradiation, les cellules ont été collectées par grattage dans un petit volume de PBS froid, à la concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. 50 µl de cette suspension ont été mélangés avec 450 µl de low melting agarose, pour avoir en final une concentration cellulaire de $2 \cdot 10^5$ cellules/ml, dont on dépose 100 µl par lame. Nous avons préparé deux lames par flacon irradié et deux flacons par dose d'irradiation.

(iii) **Etape de lyse**

Une fois le gel solidifié (5 min sur glace), les échantillons sont soumis à une lyse dans un tampon associant 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, 1% N-Lauroylsarcosine, 0,5% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10. La lyse est poursuivie 1 h à 4°C.

(iv) **Digestion enzymatique**

A l'abri de la lumière, les lames sont lavées (3x5 min) avec 50 ml de Tris-HCl 400 mM, pH 7,4 à la température ambiante. Les lames sont ensuite équilibrées (3x5 min) avec le tampon de l'enzyme (100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 40 mM Tris base, pH 8) à la température ambiante. La zone du gel contenant les cellules est exposée à 100 µl d'enzyme Fpg (2 µg/ml) déposé directement sur la zone sous lamelle. Seulement la moitié des lames sont soumises à la digestion enzymatique pour la comparer au reste des lames. Les lames sont alors incubées 45 min à 37°C dans un environnement saturé en humidité.

(v) **Electrophorèse**

Après incubation, les lames sont disposées sur la glace (5 min) pour durcir le gel, puis placées dans une cuve d'électrophorèse sous-marine et où elles sont recouvertes d'un volume de tampon (0.1 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,5) équilibré à 4°C et incubées 30 min à l'abri de la lumière.

Les lames placées parallèlement dans le bain dans le sens du champ, sont soumises à un champ électrique de 20 V et 260 mA pendant 35 min (Fig. 31). On ajuste le volume de tampon pour obtenir un voltage et un ampérage constants.

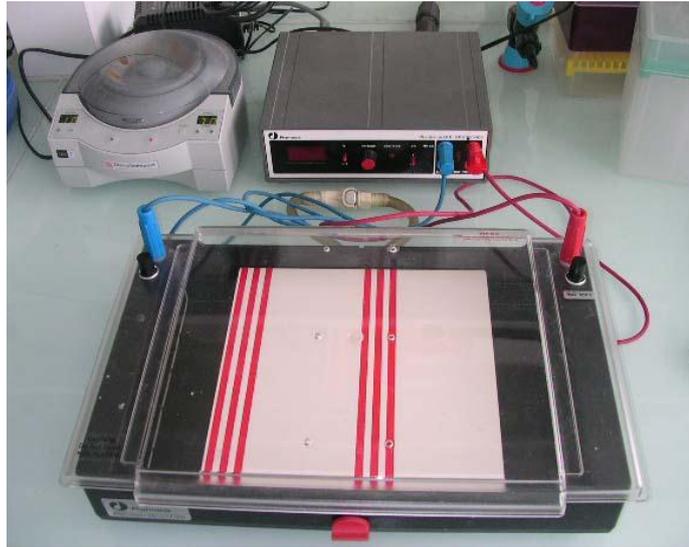


Fig. 31. Appareil d'électrophorèse utilisé pour la technique Comet assay.

(vi) Révélation

A l'abri de la lumière du jour et après durcissement du gel (5 min sur glace), les lames sont abondamment lavées (3x5 min) avec du tampon contenant 400 mM Tris-HCl, pH 7,4, à 4°C, puis colorées au BET (50 µl/lamelle). Recouvertes d'une lamelle, elles peuvent être stockées plusieurs jours au réfrigérateur.

(vii) Lecture sous microscope

Pour la prise de vues en fluorescence nous avons utilisé un microscope Zeiss Axiophot équipé d'une lampe à vapeur de mercure, filtres et caméra refroidie (Princeton). Les images de 50 comètes ont été capturées pour chaque plaque. Les résultats ont été exploités à l'aide du logiciel VEVA (VisionExplorer v 1.11a – Graftek Imaging).

3.7 Elution alcaline de l'ADN sur filtre

3.7.1 Généralités

Les techniques d'éluion de l'ADN sur filtre ont été développées par l'équipe de Kurt W. Kohn à partir de 1976 [102,104,105] pour étudier les effets des drogues cytotoxiques. Elles permettent l'analyse quantitative des cassures simple-brin et double-brin de l'ADN [104], ainsi que celle des pontages ADN-protéine et des pontages interbrin associés ou non à des cassures [101,105]. Dans leur principe, ces méthodes consistent à forcer l'éluion des

brins d'ADN natif ou dénaturé à travers les pores d'un filtre interagissant (chlorure de polyvinyle) ou n'interagissant pas (polycarbonate) avec les protéines.

L'ADN provient des cellules déposées et lysées directement sur le filtre par la N-laurylsarcosine (Sarkosyl), associée ou non au lauryl sulfate (SDS). L'élution neutre se fait à pH 9,6, l'élution alcaline à pH 12,2. Selon que l'ADN est ou non dénaturé, ce qui dépend principalement du pH de la solution éluante, la cinétique mesurée permet de quantifier le nombre de cassures simple-brin (pH > 12) ou double-brin (pH < 10). Un flux hydrodynamique contrôlé constitue l'agent d'entraînement.

Parfaitement corrélée aux techniques qui l'ont précédée (visco-élastométrie, sédimentation) [3], les méthodes d'élution alcaline sont plus sensibles et beaucoup plus reproductibles. La cinétique d'élution de l'ADN marqué par un radioélément constitue la donnée expérimentale. La fraction d'ADN éluee est déterminée par mesure par scintillation de la radioactivité des échantillons recueillis à intervalle constant. Cette cinétique tient compte du niveau de rétention de l'ADN. Dans le cas de l'élution alcaline, la cinétique dépend de deux facteurs :

- La longueur des fragments d'ADN, qui conditionne la vitesse d'élution pour un diamètre de pores déterminé. La probabilité de passage d'un brin d'ADN à travers le pore d'un filtre de dimension donnée (en général 2 μm) est inversement proportionnelle au logarithme de sa longueur. Si ce facteur est seul en jeu, la courbe d'élution adopte une loi exponentielle en fonction du volume d'élution. Selon que l'ADN est ou non dénaturé, ce qui dépend principalement du pH de la solution éluante, les données permettent de quantifier le nombre de cassures simple-brin (pH 12.2 à 12.7) ou double-brin (pH 7.2 ou 9.6). Les filtres en polycarbonate (PC) sont bien adaptés à ce type d'étude du fait qu'ils n'interagissent pas avec les composants des complexes nucléoprotéiques.

- L'existence d'interactions entre le filtre et l'ADN, qui détermine une rétention. Ce cas se rencontre lorsque l'ADN contient des pontages ADN-protéines. La nature et l'intensité des interactions dépendent de la nature chimique du filtre et des caractéristiques physicochimiques des solutions de lyse et d'élution. On utilise en général des filtres en chlorure de polyvinyle (PVC), qui lient fortement les protéines par interaction hydrophobe, permettant la rétention des fragments d'ADN qui sont associés à une chaîne peptidique. Dans ce cas, la courbe d'élution atteint un plateau de rétention dont le niveau dépend, entre autres facteurs, du taux de pontages. Comme j'ai mentionné ci-dessus, les filtres en polycarbonate (PC) n'interagissent pas avec les composants des complexes nucléoprotéiques.

Certaines enzymes protéolytiques à large spectre d'activité, telles que la protéinase K de *Tritirachium album* (PK), permettent le clivage des pontages ADN-protéine par digestion partielle de la fraction peptidique des adduits ADN-protéine. Cette propriété détermine l'utilisation de la protéinase K dans les techniques d'élution.

3.7.2 *Matériel pour l'élution alcaline*

Le matériel est constitué de colonnes porte-filtre composées d'un tube, d'un raccord fileté, d'un joint et d'un entonnoir (Sweenex) doté d'une grille porte-filtre (\varnothing 25 mm). Chaque

colonne est reliée par une tubulure à une pompe péristaltique multicanaux à débit réglé (Bioblock Scientific Ismatec) qui permet une élution lente ($\approx 0,4 \text{ ml/cm}^2/\text{h}$). Les fractions sont recueillies séquentiellement par un collecteur d'échantillon. Le traitement des éluats nécessite des pots à scintillation, du liquide de scintillation, différents produits chimiques (acide chlorhydrique, soude...) (Fig. 32). Les filtres (usage unique) sont des membranes d'arrêt en polycarbonate (Nuclepore, pores $\text{\O} 2 \mu\text{m}$).

Les colonnes étant assemblées, l'expérience comprend séquentiellement la collecte (grattoir) des cellules ayant subi le traitement adéquat et brièvement entreposées dans la glace, le dépôt des cellules sur le filtre, l'addition d'une solution de lyse détergente, et l'élution proprement dite par un tampon d'élution. On compte (scintillation) chacune des fractions éluées. L'ADN retenu sur le filtre est hydrolysé (HCl, NaOH) et compté séparément.

3.7.3 *Tampons utilisés pour l'élution alcaline*

- (i) PBS: 0,7 mM KH_2PO_4 , 4,3 mM K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,4
- (ii) Solution de lyse 1: 0,2% NLS, 40 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 9,6
- (iii) Solution de lyse 2: 50 mM Tris, 25 mM EDTA, 100 mM glycine, 2% SDS, pH 9,6, complétée extemporanément par 1 mg/ml de protéinase K
- (iv) Solution de lavage: 20 mM EDTA, pH 9,6
- (v) Tampon d'élution: 20 mM EDTA, 0,1% SDS, 20% tetrabutylammonium hydroperoxide, pH 12,2

3.7.4 *Protocole*

L'analyse des CSB par élution alcaline a été effectuée selon Filipiski et Kohn [61]. Les cellules sontensemencées à 2×10^6 cellules par flacon de 25 cm^2 en présence de [2-14C] thymidine ($0,05 \mu\text{Ci/ml}$) pendant 48 h. Pour mesurer le plus exactement possible le taux de CSB incidentes radio-induites, les cellules sont irradiées en présence d'une solution de PBS/10 mM EDTA froide et plongées immédiatement après irradiation dans un bain de glace. Elles sont ensuite rincées, grattées (en prenant soin de ne gratter que la zone irradiée dans le cas des irradiations protons avec le faisceau de 76 MeV) et 8×10^5 cellules sont déposées sur les filtres. Chaque condition expérimentale est réalisée en duplicat ou triplicat.

Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution de lyse 1, puis lavées avec une solution de lavage EDTA (20 mM EDTA, pH 9,6). Une seconde lyse SDS-protéinase K est effectuée (solution de lyse 2), puis les cellules sont de nouveau rincées avec de l'EDTA. A cette étape là il ne reste plus sur le filtre que de l'ADN.

L'ADN est ensuite élué avec une solution alcaline dénaturante (tampon d'élution).

Les fractions (1 ml) sont récupérées directement dans des pots à scintillation de 6 ml. La radioactivité est quantifiée grâce à un compteur à scintillation. A la fin de l'élution les filtres sont traités avec une solution d'HCl 0,1 N (1 h, 60°C) pour permettre une dépurination de l'ADN. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute une solution de NaOH 0,4 N pendant 20 min (hydrolyse des sites apuriques). La radioactivité contenue dans l'ADN qui demeure sur les filtres est également comptée par scintillation.

Le pourcentage d'ADN qui reste sur le filtre, c'est à dire le rapport [Radioactivité du filtre] / [Radioactivité totale (éluats + filtre)] à la fin de l'éluion, permet d'estimer le taux d'ADN non clivé pour chaque échantillon à un temps donné. La représentation en fonction du temps du taux d'ADN retenu sur le filtre en fin d'éluion (16 ml) permet de visualiser la cinétique de réparation des CSB.

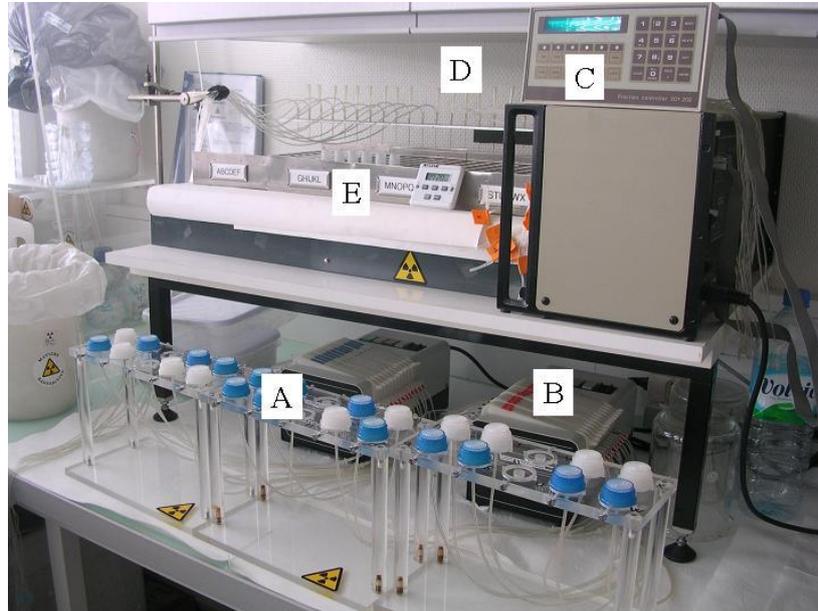


Fig. 32. Système d'éluion alcaline. A : filtre; B : pompe péristaltique multicanaux à débit régulé; C : programmateur; D : collecteur d'échantillon; E : pots de recueil des éluats.

3.8 Immunofluorescence

3.8.1 Culture des cellules, traitements

Les cellules sontensemencées de $1,5$ à 3×10^6 par flacon de 25 m^2 la veille de l'irradiation. Les cellules sont irradiées ensuite dans les flacons à la température ambiante et sont laissées réparer pendant 30 min et 24 h à 37°C . Ensuite, on pratique le grattage de la zone irradiée et on récolte les cellules. Les cellules sont réensemencées à 5×10^5 et laissées adhérer sur des lamelles de 18 mm de diamètre en plaque 6 puits après une brève centrifugation. La surface d'une lamelle est égale à $2,54 \text{ cm}^2$. Au préalable les lamelles ont été coatées à la poly-L-Lysine (PLL) et stérilisées par UV.

3.8.2 Fixation

Les lamelles sont rincées dans du PBS, puis incubées dans du paraformaldéhyde (PFA) 3,7% dilué dans du PBS (15 min, 37°C). Les cellules sont ensuite traitées pour la neutralisation avec du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 50 mM deux fois dix minutes et réhydratées dans du PBS à température ambiante.

3.8.3 Perméabilisation

L'étape de perméabilisation est réalisée à l'aide du Triton x 100 0,5% dilué dans du PBS pendant 20 min à 4°C. Ensuite les cellules sont bloquées avec de la BSA (sérumalbumine bovine) 2% dilué dans du PBS pendant 1h à la température ambiante. Les lamelles sont rincées 3 fois au PBS.

3.8.4 Immunomarquage

Les lamelles sont transférées en chambre humide en présence de l'anticorps primaire dilué 1/400 dans du PBS 2 % BSA pendant 45 min à 37° (Tableau 7). A la fin de l'incubation les lamelles sont rincées 3 fois avec du PBS.

	Ac primaire	Ac secondaire
p-ATM	Upstate 05-740, mouse monoclonal anti Phospho-ATM (ser 1981)	Alexa Fluor-555 anti-mouse
γ-H2AX	Upstate 07-164, rabbit anti- γ -H2AX (ser139)	Alexa Fluor-555 anti-rabbit
Artemis	Abcam ab35649, rabbit polyclonal anti-Artemis	Alexa Fluor-555 anti-rabbit

Tableau 7. Anticorps primaires et secondaires utilisés en IF.

L'anticorps primaire est ensuite révélé avec un anticorps secondaire dilué 1/400 dans du PBS contenant 2% BSA (45 min à la température ambiante à l'abri de la lumière). Les anticorps secondaires Alexa Fluor-555 ont une absorption maximale à une longueur d'onde de 555 nm (orange), leur émission maximale est de 565 nm (rouge). Les lamelles sont finalement rincées deux fois au PBS.

3.8.5 Montage

Les lamelles sont montées sur des lames avec une goutte d'agent de montage PBS/Glycerol/DABCO en présence de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) dilué 1/10 000 dans du PBS. Le DAPI est un intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules par fluorescence dans l'UV (ultraviolet) et qui a une absorption maximale à une longueur d'onde de 358 nm (ultraviolet), son émission maximale est de 461 nm (bleu). Le bord des lamelles est verni à la fin pour éviter leur dessiccation.

3.8.6 Observation

Les lamelles sont observées sous un microscope Zeiss Axiophot équipé d'une caméra Micromax (Princeton Applied Research) 3D avec des temps d'exposition d'environ 40 ms pour le DAPI et 150 à 300 ms pour l'Alexa. Pour chaque lamelle on fait une acquisition de 25 noyaux cellulaires. Après déconvolution, les images sont traitées avec le logiciel ImageJ 1.44p, Wayne Rasband – National Institutes of Health, USA.

4. RESULTATS - DISCUSSION

4.1 1^{ère} PARTIE

Efficacité biologique relative (EBR) des deux faisceaux de protons de 76 MeV et 201 MeV du Centre de Protonthérapie de l'Institut Curie à Orsay (ICPO)

4.1.1 Introduction

L'équipe de *Radiobiologie Moléculaire et Cellulaire* de l'U350 Inserm, alors animée par le Dr. Vincent Favaudon, s'est intéressée depuis 2001 à la détermination de l'efficacité biologique relative (EBR) dans le SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*) des faisceaux de protons de l'ICPO. Lorsque je suis arrivé au laboratoire, une première série de mesure de la survie clonogénique avait été réalisée avec le Pr Georges Noël sur des cellules V79 et HeLa irradiées à différentes positions dans le SOBP du faisceau médical de 76 MeV du Centre de protonthérapie d'Orsay, montrant une augmentation significative de l'EBR dans la région distale du SOBP. Le sujet qui m'a été proposé portait de ces observations.

Aux énergies $> 1\text{MeV}$, électrons relativistes et photons X ou γ induisent la même quantité de dommages et le même taux de létalité cellulaire par unité de dose physique. En revanche, électrons/photons d'une part, atomes chargés (ions) d'autre part, diffèrent au niveau de la structure microscopique du dépôt d'énergie dans la matière irradiée. Ceci se traduit par des différences de l'efficacité biologique relative (EBR) des différents types de rayonnement.

Peu d'études ont été réalisées avec les faisceaux de protons de haute énergie (60-250 MeV) utilisés dans les différents centres de protonthérapie. L'EBR de ces faisceaux est classiquement estimée à 1,10 (c'est à dire 10% supérieure à celle des rayons- γ du Cobalt-60). Cette valeur moyenne a été déterminée par mesure de la régénération des cryptes intestinales chez la souris après exposition à une dose unique de 10 à 15 Gy [80]. Cette méthode est discutable pour plusieurs raisons qui tiennent à la non-linéarité des effets en fonction de la dose, au fait que la mort des cellules souches des cryptes intestinales survient par apoptose alors que ce mode de mort cellulaire est minoritaire dans les tumeurs solides, à l'utilisation dans les calculs d'un isoeffet plutôt que d'une isodose, et au fait qu'il n'était pas tenu compte de la perte d'énergie des protons avec la profondeur dans le faisceau.

Or, selon que la valeur d'EBR estimée est trop élevée ou trop faible par rapport à la valeur réelle, le radiothérapeute confronté à l'usage de faisceaux de protons court le risque, dans le premier cas de sous-doser les tumeurs, dans le second cas d'induire des complications graves. Mon projet cherche à donner une réponse cohérente à ces questions. Il est centré sur le problème de l'EBR des faisceaux de protons.

J'ai repris le problème à la base en analysant sur des lignées cellulaires normales ou tumorales humaines, l'effet des protons mis en œuvre dans les deux faisceaux médicaux (76 et 201 MeV) du Centre de Protonthérapie d'Orsay de l'ICPO en prenant en considération les paramètres suivants:

- La dose-dépendance de l'effet létal des rayonnements (paramètres α et β des courbes de survie dans le modèle linéaire quadratique).
- L'incidence des lésions de l'ADN.

en fonction de la nature du rayonnement, de l'énergie et de la position des cellules au sein du SOBP. Le rayonnement de référence utilisé a été la raie d'émission γ à 662 keV du Césium-137 (^{137}Cs).

Le but de cette première partie a été de remesurer la valeur de l'EBR des faisceaux médicaux de l'ICPO de 76 MeV et de 201 MeV en utilisant un modèle *in vitro*, et de chercher à établir une corrélation entre l'incidence des lésions de l'ADN et la létalité en fonction de la nature du rayonnement, de l'énergie et de la position des cellules dans le SOBP.

La comparaison de la survie au rayonnement a été réalisée avec des lignées cellulaires humaines : une lignée fibroblastique (IMR90), une lignée de carcinome ORL (SQ20B) ainsi qu'une lignée de carcinome épidermoïde du col utérin (HeLa) en fonction de la dose et de la nature du rayonnement (rayons γ du ^{137}Cs , protons de 76 et 201 MeV) et de la position au sein du SOBP.

L'incidence des lésions radio-induites de l'ADN a été déterminée aux mêmes positions dans le SOBP pour les faisceaux de 76 et 201 MeV et comparée à celle obtenue à la même dose sous irradiation γ (^{137}Cs). Les cassures double-brin (CDB) ont été quantifiées par électrophorèse en champs pulsés à l'aide d'une technique publiée récemment et qui évite la formation d'artefacts par conversion de dommages de bases en cassures double-brin [180]

La valeur de l'EBR résultant de l'incidence des cassures double-brin radio-induites de l'ADN a été comparée avec l'EBR pour la survie.

Assez curieusement, la publication de ces résultats constitue une sorte de première en ce sens que les faisceaux médicaux d'énergie différente n'avaient jamais été comparés au sein du même centre de protonthérapie. Nous verrons en conclusion que la manière de configurer les faisceaux a pourtant un effet significatif dans la partie distale du SOBP, en accord avec les plus récentes simulations de microdosimétrie [73].

4.1.2 *Résultats - Article*

Radiobiological characterization of two therapeutic proton beams with different initial energy spectra used at the Institut Curie-Proton therapy Center in Orsay

Valentin Calugaru, Catherine Nauraye, Georges Noël, Nicole Giocanti, Vincent Favaudon & Frédérique Megnin-Chanet

Int J Radiat Oncol Biol Phys

doi:10.1016/j.ijrobp.2010.09.003



BIOLOGY CONTRIBUTION

RADIOBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TWO THERAPEUTIC PROTON BEAMS WITH DIFFERENT INITIAL ENERGY SPECTRA USED AT THE INSTITUT CURIE PROTON THERAPY CENTER IN ORSAY

VALENTIN CALUGARU, M.D.,*^{†‡} CATHERINE NAURAYE, PH.D.,* GEORGES NOËL, M.D., PH.D.,^{†‡}
 NICOLE GIOCANTI, PH.D.,^{†‡} VINCENT FAVAUDON, PH.D.,^{†‡} AND FRÉDÉRIQUE MÉGNIN-CHANET, PH.D.^{†‡}

*Institut Curie, Centre de Protonthérapie d'Orsay, Centre Universitaire, Orsay, France; [†]Institut Curie, Centre Universitaire, Orsay, France; and [‡]INSERM, U612, Centre Universitaire, Orsay, France

Purpose: Treatment planning in proton therapy uses a generic value for the relative biological efficiency (RBE) of LI throughout the spread-out Bragg peak (SOBP) generated. In this article, we report on the variation of the RBE with depth in the SOBP of the 76- and 201-MeV proton beams used for treatment at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay.

Methods and Materials: The RBE (relative to ¹³⁷Cs γ -rays) of the two modulated proton beams at three positions in the SOBP was determined in two human tumor cells using as endpoints clonogenic cell survival and the incidence of DNA double-strand breaks (DSBs) as measured by pulse-field gel electrophoresis without and with enzymatic treatment to reveal clustered lesions.

Results: The RBE for induced cell killing by the 76-MeV beam increased with depth in the SOBP. However for the 201-MeV protons, it was close to that for ¹³⁷Cs γ -rays and did not vary significantly. The incidence of DSBs and clustered lesions was higher for protons than for ¹³⁷Cs γ -rays, but did not depend on the proton energy or the position in the SOBP.

Conclusions: Until now, little attention has been paid to the variation of RBE with depth in the SOBP as a function of the nominal energy of the primary proton beam and the molecular nature of the DNA damage. The RBE increase in the 76-MeV SOBP implies that the tumor tissues at the distal end receives a higher biologically equivalent dose than at the proximal end, despite a homogeneous physical dose. This is not the case for the 201-MeV energy beam. The precise determination of the effects of incident beam energy, modulation, and depth in tissues on the linear energy transfer–RBE relationship is essential for treatment planning. © 2010 Elsevier Inc.

Proton therapy, spread-out Bragg peak, relative biological efficiency, DNA double-strand break, clustered DNA damage.

INTRODUCTION

Proton therapy is a radiotherapy treatment modality that allows high conformation of the dose distribution to the target volume because of the physical properties of sharp lateral penumbra and distal dose fall-off. These properties make it possible to increase tumor target doses while reduc-

ing or maintaining dose levels to adjacent normal tissues. The Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay (ICPO) has been operating since 1991, with more than 5,000 patients treated to date (1–3). For intracranial tumors, the maximum energy of the synchrocyclotron (201 MeV) is used, and is degraded down to 76 MeV for ocular tumors. The method used to spread the beam, transversely and longitudinally, is

Reprint requests to: Frédérique Méglin-Chanet, Ph.D., INSERM U612, Institut Curie, Bât. 112, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France. Tel: (+33) 169863195; Fax: (+33) 169075327; E-mail: frederique.megnin@curie.fr

Dr. Noël is currently at the Département de Radiothérapie, Centre de lutte contre le cancer Paul Strauss, 67065 Strasbourg, France.

This research was supported by grants from the Cancéropôle d'Ile-de-France (ACI 2004 "Targeted protontherapy for pediatric and adult tumors: technical optimization, radiobiology and socio-economic evaluation" and ACI 2007 "Towards dynamic protontherapy") and Institut Curie's "Retinoblastoma" Incitative and Cooperative Program.

Supplementary material for this article can be found at www.redjournal.org.

Conflict of interest: none.

Acknowledgments—The authors thank Ludovic de Marzi, Sabine Delacroix, Régis Ferrand, Samuel Meyroneinc, Alejandro Mazal, and the physicists of the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay for their help in the design and implementation of proton experiments, Stéphane Hermans (Institut Curie) for the construction of mechanical parts of cell tank and holders, and Janet Hall, Drs. Rémi Dendale, Alain Fourquet and Pr. Pierre Bey for their continuous support and encouragement. Serge Boiteux (UMR 217 CEA/CNRS, CEA, Fontenay-aux-Roses, France) generously provided Fpg and Nth enzymes and John B. Little (Center for Radiation Sciences and Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA) SQ20B cells.

Received April 12, 2010, and in revised form Sept 1, 2010. Accepted for publication Sept 15, 2010.

the passive spreading by scatterers. This allows a superimposition of various beams of different energies and provides the so-called spread-out Bragg peak (SOBP) defining a modulation width where the physical dose is uniform.

Linear energy transfer (LET) describes the microscopic spatial distribution of energy absorption in a tissue and is a major determinant of the biological efficiency of radiation (relative biological efficiency [RBE]). The RBE-LET relationship of various particles is known to vary according to a bell-shaped curve with the maximum RBE culminating at approximately 6 to 8 (six- to eightfold as efficient as ^{60}Co radiation) with energies below 2 MeV (4, 5). As the SOBP is formed by the superimposition of multiple Bragg peaks of varying intensity and range, protons in the proximal part of the SOBP are of higher energy and thus lower LET than in the distal part. This problem has long been recognized and has prompted RBE determinations using *in vitro* and *in vivo* approaches (6, 7). Most studies found mean RBE values between 1.0 and 1.3, and a mean generic RBE value of 1.10 was established from *in vivo* studies based on the regeneration of intestinal crypts in mice (8, 9). RBE values for cell killing between 1.4 and 2.1 at the distal edge of the SOBP generated from proton beams with a nominal energy in the range of 65 to 72 MeV have been reported (10–12). These results support the hypothesis that proton RBE values should be high at the most distal and descending part of the SOBP in low-energy beams, but little is known about the variation of RBE with depth in the SOBP for higher energy beams.

To address this issue, we have compared the RBE values for the cell killing and the induction of DNA double-strand breaks (DSBs) and clustered lesions in two human tumor cell lines at three critical positions in the SOBP from the 76- and 201-MeV proton beam lines used at the ICPO. A link between the differential observed RBE values and microdosimetric considerations is discussed in the light of published data.

METHODS AND MATERIALS

Cell lines and culture

HeLa (human cervix carcinoma) and SQ20B (head and neck squamous carcinoma) cells were routinely subcultured every 4 days and grown (37°C, 5% CO₂) as monolayers in DMEM essential medium with 10% v/v foetal calf serum (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). A 0.4-mg/l quantity of hydrocortisone was added to the culture medium for SQ20B cells.

γ-Ray irradiations

γ-Ray irradiations were performed in 25-cm² culture flasks using the 0.662 MeV emission of the ^{137}Cs source in an IBL-637 irradiator (CIS-Biointernational, Orsay, France). The RBE for ^{137}Cs (LET_{water} = 0.91 keV/μm) relative to ^{60}Co radiation (E = 1.17 and 1.33 MeV, LET_{water} = 0.20 keV/μm) was taken at 1.07 (13). The dosimetry was carried out by the Henri-Becquerel National Laboratory (CEA, Saclay, France), using an alanine-EPR dosimeter and corrected monthly for ^{137}Cs decay. The same dose rates were used for γ-ray and proton irradiations (7.5 Gy/min or 3 Gy/min).

Proton irradiations

A single beam line designed for two nominal energies at its entrance, with passive spreading system is available at the ICPO therapy facility (for more details, see supplementary data, Fig. E1). The 201-MeV line uses the maximum energy of the synchrocyclotron with a maximum field size of 12 cm in diameter. For the 76-MeV line, the initial energy is degraded and the field size limited to 3 cm in diameter. The dose homogeneity in the irradiated field was ± 2.5%; the same tolerance is used in depth for the SOBP. The dosimetry was performed by a cylindrical ionization chamber (CC13, IBA) placed along the isocenter axis in a water tank at the same distance from the last collimator as the cell layers. The dose calibration factor of this tank was determined from the reference ionization chamber (PTW, W31010) calibrated by the Henri-Becquerel National Laboratory.

The 76-MeV beam energy is degraded down to a range R90% = 29.1 mm water (~58 MeV) and SOBP width (distal 90% – proximal 90%) = 20.5 mm water. The 201-MeV beam energy is degraded down to a range R90% = 188 mm water (~166 MeV) and SOBP width (distal 90% – proximal 90%) = 72 mm water. Positions 1, 2 and 3 (Fig. 1) indicate the irradiation depth of the cell layers. The water-equivalent depth at these positions after traversing the scattering system, monitoring devices, air, water, and plastic layers was 4.9 (entrance), 20.5 (mid-SOBP) and 26.9 mm (distal SOBP) in the 76-MeV SOBP; 26 (entrance), 160 (mid-SOBP), and 185 mm (distal SOBP) in the 201-MeV SOBP.

For studies with the 76-MeV beam, part of the flask surface received a dose lower than the nominal dose and cells located out of the ≥95% homogeneity irradiation field were disregarded for subsequent analyses. The dose rates used were 7.5 Gy/min (76 MeV) and 3 Gy/min (201 MeV).

Clonogenic assays

Cells were seeded at a density of 40 cells/cm² in 25 cm² tissue culture flasks and left to adhere for 7 h. Flasks were then mock-irradiated or exposed to ^{137}Cs γ-rays or protons and returned to the incubator for 8 to 10 days. Colonies were fixed, stained and scored manually under a magnifying lens, excluding microcolonies. Cell survival (S) curves were fitted to the linear-quadratic equation (Eq. 1) through nonlinear least-square regression using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA):

$$\ln(S) = -\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2, \quad (1)$$

where D is the dose of radiation and α and β adjustable parameters. For each experiment, the mean lethal dose (D₃₇), i.e. the dose of radiation leaving 1/e = 0.37 survival was calculated using the mean values of α and β determined from the curves drawn for best fit to the experimental data.

Statistical analysis was performed using StatEL (AD Science, Paris, France). A nonparametric Mann-Whitney U test was performed on paired data sets to assess differences between survival curves using the values at the highest radiation doses, with survival values in the vicinity of 0.2. H0 states that there is no significant difference between median values; H1 infers that the medians are statistically distinct; p is the calculated error risk estimate relative to the model (H0 or H1) considered.

DNA double-strand break determination

To prevent the conversion of labile damaged sites in DNA to breaks by heat or mild alkali, the analysis of DSBs in irradiated cells was performed using the method of Sternerlöw *et al.* (14)

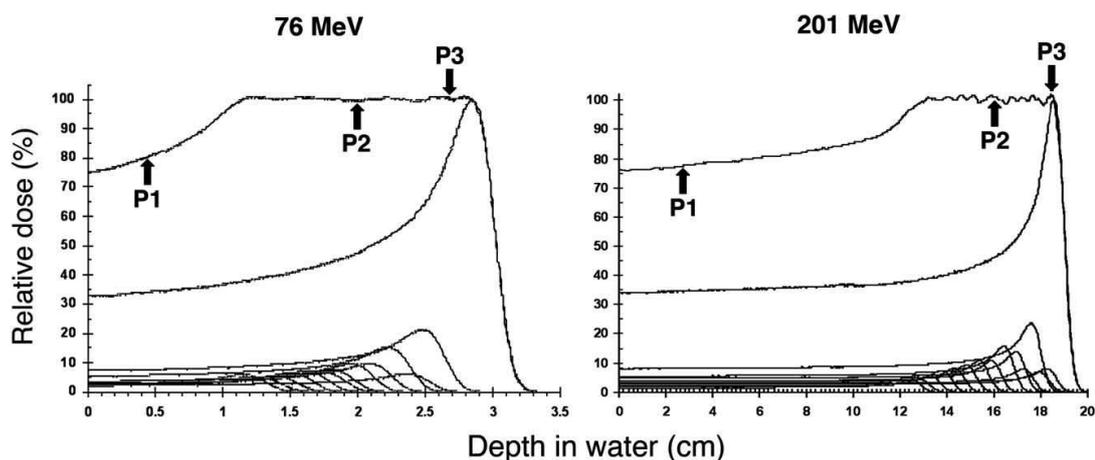


Fig. 1. Depth-dose profiles of the spread-out Bragg peak (SOBP) measured in the nominal 76- and 201-MeV Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay (ICPO) beams. The Bragg peaks the summation of which generates the SOBP are shown to scale. Positions 1, 2, and 3 indicate the irradiation depth of the cell layers.

with modifications. Briefly, $[2-^{14}\text{C}]$ thymidine (0.05 $\mu\text{Ci/ml}$) (Perkin-Elmer, Courtabœuf, France) was added to cells for three doubling times ($1 \times$ to 4×10^6 cells per 25-cm^2 flask), then was removed 3 h before irradiation to allow ligation of Okazaki fragments. The flasks were then chilled on ice, mock-irradiated or given 25 Gy, and kept at 4°C until their inclusion in agarose plugs. Cells were harvested by scraping and mixed with low-melting-point agarose to a final concentration of 2.9×10^6 cells/ml in 0.8% agarose in PBS. Embedded cells were subsequently lysed in buffer I (0.5 mol/l ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 2% *N*-lauroylsarkosine, and 1 mg/ml proteinase K, pH 8.0) for 24 h at 4°C . The plugs were rinsed with 1 mmol/l EDTA and 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0 (30 min, 4°C) and incubated (48 h, 4°C) in buffer II (1.85 mol/l NaCl, 0.15 mol/l KCl, 5 mmol/l MgCl_2 , 2 mmol/l EDTA, 4 mmol/l Tris, and 0.5% Triton X-100, pH 7.5). The plugs were finally washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stored in 40 mmol/l EDTA buffer at 4°C for up to 5 days before electrophoresis.

For digestion by *Escherichia coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease (Nth), after treatment the plugs

were washed with buffer III (100 mmol/l KCl, 40 mmol/l Tris, 0.5 mmol/l EDTA, pH 8.0), treated with Fpg (12 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 2 h, washed again then treated with Nth (10 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 2 h, washed, and analysed immediately.

The plugs were then inserted into the wells of an 0.8% w/v pulsed-field certified agarose gel made in TAE buffer (40 mmol/l Tris-acetate, 2 mmol/l EDTA, pH 8.0) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and the gels analyzed at 14°C in a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad) with buffer recirculation. Migration (2 V/cm) was performed using three blocks, 24 h each, with switch times (angles) of 20 min (96°), 25 min (100°), and 30 min (106°), respectively. The molecular weight markers (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) used were *Schizosaccharomyces pombe* (3.5–5.7 Mb), *Hansenula wingei* (1.0–3.1 Mb), *Saccharomyces cerevisiae* DNA (0.2–2.2 Mb), and lambda ladder standard (multiples of 48.5 kb).

After electrophoresis, the gels were dried and the migration profile and the fraction of DNA extracted from the plugs (fraction of activity released [FAR]) determined using a Phosphorimager and ImageQuant densitometry software (GE Healthcare–Amersham

Table 1. Relative biological effectiveness (RBE, calculated from D_{37}) and α and β values of 76- or 201-MeV protons for the survival of HeLa or SQ20B cells

Energy	Position	HeLa*				SQ20B*			
		RBE $[D_{37}^{137\text{Cs}}/D_{37}^{\text{P}}]$	RBE $[D_{37}^{60\text{Co}}/D_{37}^{\text{P}}]$	$\alpha^{\text{P}}/\alpha^{137\text{Cs}}$	$\beta^{\text{P}}/\beta^{137\text{Cs}}$	RBE $[D_{37}^{137\text{Cs}}/D_{37}^{\text{P}}]$	RBE $[D_{37}^{60\text{Co}}/D_{37}^{\text{P}}]$	$\alpha^{\text{P}}/\alpha^{137\text{Cs}}$	$\beta^{\text{P}}/\beta^{137\text{Cs}}$
76 MeV	P1	0.997	1.067	1.113	0.732	1.027	1.099	1.760	0.884
	P2	1.066	1.141	1.287	0.606	1.090	1.166	1.444	1.094
	P3	1.245	1.332	1.547	0.633	1.217	1.302	1.326	1.450
201 MeV		1.000	1.070	1.000	1.000	1.000	1.070	1.000	1.000

Abbreviation: RBE = relative biological efficiency.

Note: ^{60}Co or ^{137}Cs are taken as the reference radiation. y Positions of the cell layers in the SOBP:

–76 MeV: P1 = 4.9 mm; P2 = 20.5 mm; P3 = 26.9 mm.

–201 MeV: P1 = 26 mm; P2 = 160 mm; P3 = 185 mm.

* The $D_{37}^{137\text{Cs}}/D_{37}^{\text{P}}$, $D_{37}^{60\text{Co}}/D_{37}^{\text{P}}$, $\alpha^{\text{P}}/\alpha^{137\text{Cs}}$, and $\beta^{\text{P}}/\beta^{137\text{Cs}}$ ratios were calculated according to the D_{37} , α and β values given in Figs. 2 and 3.

Biosciences, Orsay, France). Using this protocol, the size range of migrating DNA was between 200 kb and 8 Mb, with logarithmic migration between 1 and 6 Mb. Fragments shorter than 50 kb were excluded from the gel.

RESULTS

Radiation survival of HeLa and SQ20B cells

The lethal effect of γ -rays and protons at the mid-SOBP (position 2, Fig. 1) was first investigated using clonogenic assays. The RBE for 76-MeV protons at the mid-SOBP position determined from the ratio of the D_{37} values (Table 1) was between 1.07 (HeLa) and 1.09 (SQ20B) relative to ^{137}Cs γ -rays ($n = 3$), and between 1.14 (HeLa) and 1.16 (SQ20B) relative to ^{60}Co (13), which is in good agreement with published RBE values from *in vitro* studies (6). In contrast, the survival curves after exposure to 201-MeV protons or γ -ray irradiation were indistinguishable ($n = 3$; Fig. 2).

The response to graded doses of protons was then determined at three positions in the 76- and 201-MeV SOBPs

(Fig. 3 and Table 1). A gradual increase in radiation sensitivity was observed as cells were positioned more deeply in the 76-MeV SOBP. The maximum RBE was found in the distal part of the SOBP (position 3, Fig. 1). The difference between survival curves was statistically significant ($n = 3$), with a relative increase of the D_{37} ratio ranging between 1.25 (HeLa) to 1.35 (SQ20B) on moving from position 1 to position 3. Similar results were obtained based on the SF2 values (data not shown). However the survival curves for both cell lines after exposure to 201-MeV protons did not vary with the depth in the SOBP.

Measurement of radio-induced DNA double-strand breaks in SQ20B cells

The incidence (initial yield) of DSBs as a function of the nature of the radiation (^{137}Cs γ -rays vs. protons), the nominal energy of the proton beam (76 vs. 201 MeV) and the position of the cell layer within the SOBP, was determined in SQ20B cells using PFGE as described above.

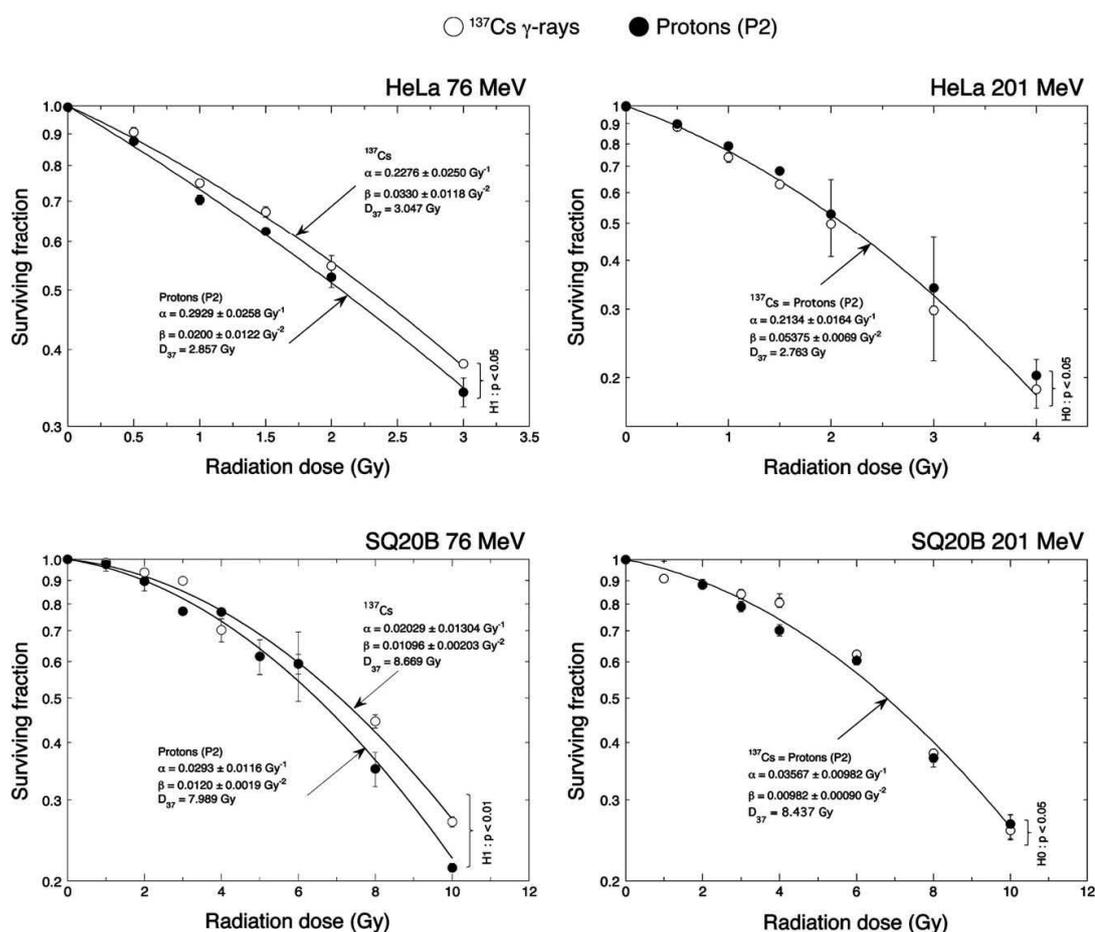


Fig. 2. Comparison of the clonogenic survival curves of HeLa and SQ20B cells exposed to ^{137}Cs γ -rays or protons at the mid-spread-out Bragg peak (SOBP) position (position 2, Fig. 1). Bars indicate SD.

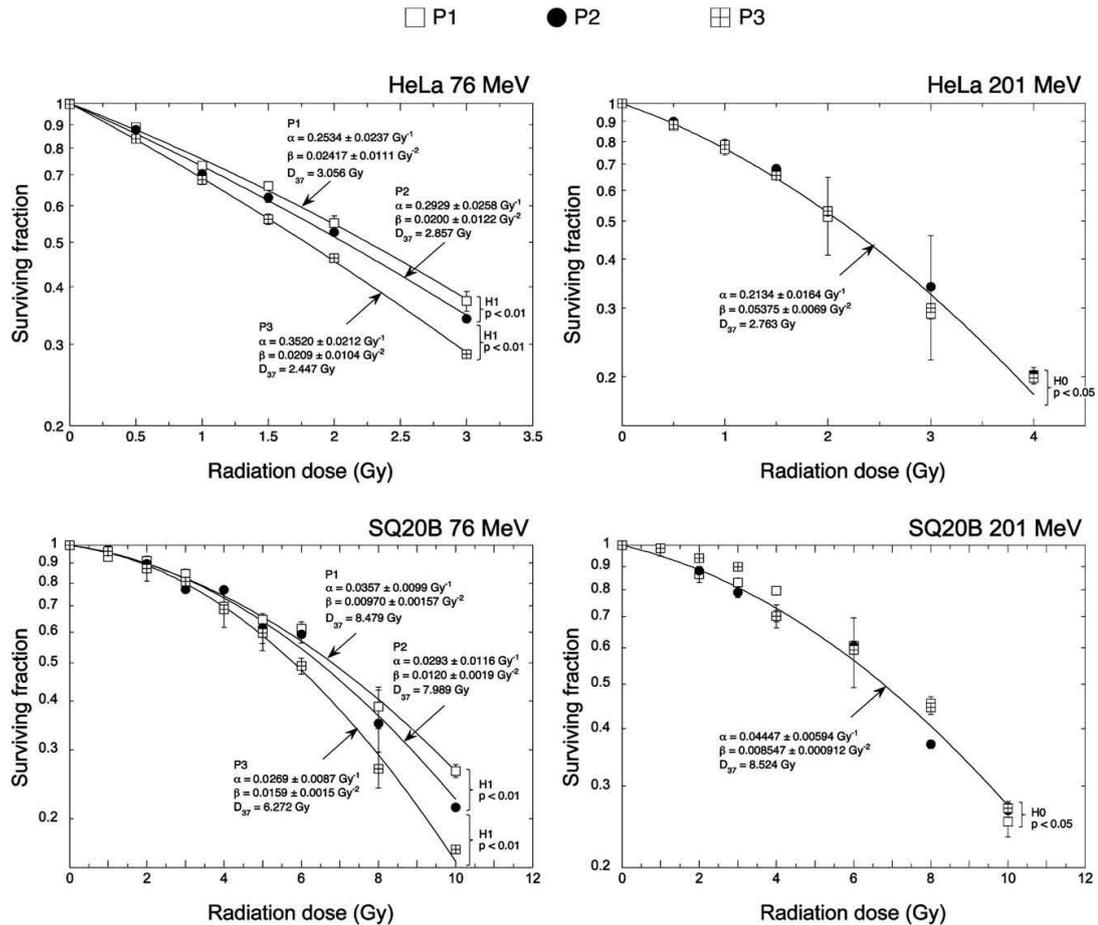


Fig. 3. Comparison of clonogenic survival curves of HeLa and SQ20B cells exposed to protons as a function of the incident energy and position in the spread-out Bragg peak (SOBP). Bars indicate SD.

The FAR determined after exposure of the cells to 25 Gy γ -rays was 0.55 ± 0.03 ($n = 3$). This is in good agreement with published results obtained using a cold lysis procedure to avoid inclusion of heat-labile sites in the measurements (14). The FAR was significantly higher for protons than for γ -rays, indicating an excess of DSBs for protons in the range of molecular weight (0.2–8 Mb) analyzed (Fig. 4). A nonsignificant increase of the FAR with the depth in the SOBP and with the energy was observed and no systematic change of the migration profile of DNA in the agarose gel was found under these conditions (Fig. 5). The mean RBE for protons relative to ^{137}Cs γ -rays was determined as 1.16 ± 0.08 ($n = 3$) and 1.26 ± 0.09 ($n = 3$) for the 76- and 201-MeV proton beams respectively. Interestingly, excess DSBs in the 201-MeV SOBP relative to γ -rays did not result in increased lethality.

Plugs prepared from SQ20B cells exposed to 25 Gy of protons were also heated to 50°C for 24 h during lysis in buffer I, followed by 48 h at 4°C in buffer II. This treatment

will convert heat-labile sites in DNA into DSBs (14). An increase of the FAR by a factor of 1.13 ± 0.04 ($n = 2$) was found, however, the migration profile of DNA after heating did not vary significantly with the position of cells in the SOBP (data not shown).

To assess whether the increase of the cell killing along the isocenter axis of the 76-MeV SOBP was correlated with the formation of bistranded oxidative clustered DNA lesions (OCDL), DNA was digested with Fpg and Nth (15). There was a large increase in the FAR (from 1 to 1.34 ± 0.016 , $n = 2$) in the cells irradiated with γ -rays after enzymatic treatment (Figure 4) demonstrating that complex lesions were formed in these cells, although their level did not appear to depend on the dose rate of irradiation (3 vs. 7.5 Gy/min). After exposure to 201-MeV protons, the number of complex lesions formed was of the same order as after γ -irradiation with a mean RBE value of 1.45 ± 0.14 ($n = 2$). In contrast, after exposure to the 76-MeV beam, there was a statistically significant increase in the level of complex lesions formed

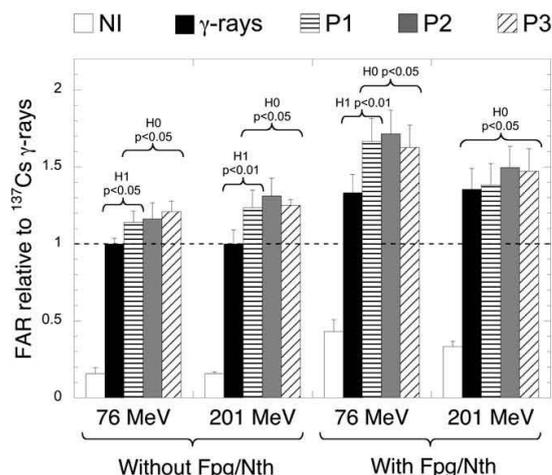


Fig. 4. Variation of the incidence of DSBs in SQ20B cells as a function of the beam energy and position in the SOBP without or with treatment with Fpg and Nth. The fraction of activity released (FAR) is given relative to ^{137}Cs γ -rays without Fpg/Nth. NI = nonirradiated. Bars indicate SE.

(from 1.16 ± 0.08 to 1.66 ± 0.15 , $n = 2$). However, there was no variation among the three positions in the SOBP, and the migration profile of DNA did not change appreciably (Fig. 5).

DISCUSSION

RBE for radiation survival

Our data adds support to earlier reports (6, 7) establishing that the RBE for radiation survival increases with increasing depth in the SOBP of 65- to 80-MeV proton beams. However, there are few data in human cells on its variation in higher energy beams. We show here, in two human

tumor cells, that the RBE does not vary significantly with the depth in the 201-MeV SOBP. This difference between the SOBP generated from 76- and 201-MeV protons was unexpected.

The RBE may vary depending upon the cell type and with the dose level. Most of the published *in vitro* determinations of RBE have taken cell survival as the endpoint, comparing radiobiological parameters such as D_{37} or the α/β ratio. In general, one of the known effects of high-LET radiation is to linearize the survival curves by increasing the value of the α parameter with little or no effect on β (16). Thus, the RBE value may vary not only due to the changing LET throughout the SOBP range, but also with the α/β ratio of the cell line used. In our study, we compared the D_{37} or α and β values in two human cell lines with different radiosensitivities. The value of the α parameter increased by 1.4 (HeLa) and decreased by 1.3 (SQ20B, the most radioresistant cell line) upon shifting the cells from the entrance to the distal part of the 76-MeV SOBP, whereas the value of the β parameter did not change (HeLa) and increased by 1.6 in SQ20B cells. However, when the mean D_{37} values were used to calculate the RBE, the difference between the two cell lines appeared to be relatively minor, and thus is unlikely to provide an explanation as to why the RBE is invariant in the depth of the 201-MeV SOBP.

Microdosimetric considerations

A precise determination of the effects of incident beam energy, modulation and depth in tissues on the LET-RBE relationship is still lacking. The classical approach to this question lies in an empirical biological weighting function to correlate the microdosimetry spectra with cell survival values. Belli *et al.* (17) developed a semi-empirical approach combining Monte-Carlo calculation of the energy spectrum in the target volume and published experimental results in Chinese hamster V79 cells. They show an increase of RBE

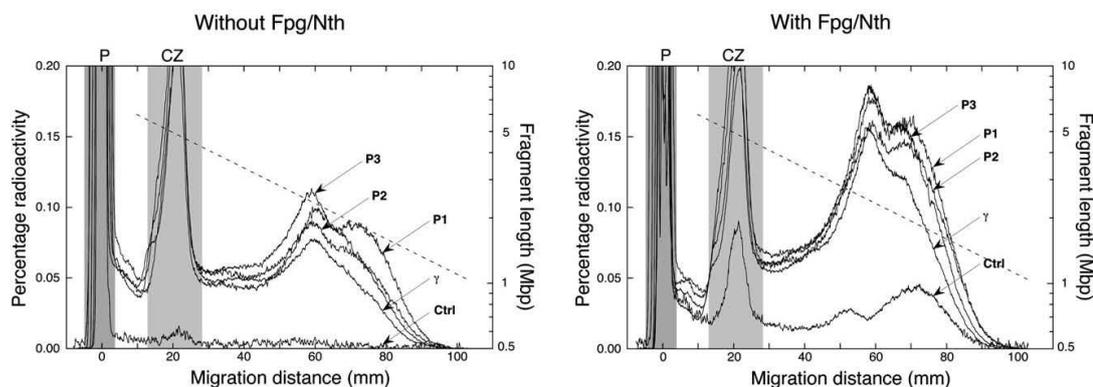


Fig. 5. Effect of Fpg/Nth treatment on the PFGE migration profiles of DNA extracted from SQ20B cells exposed to 25 Gy γ -rays (γ) or protons (P) at the three positions analyzed in the spread-out Bragg peak (SOBP). Fragment length calibration (dashed line) was performed in the same gels using molecular weight markers, with fluorescence detection. CZ = compression zone; P = plugs. The middle of the plugs was taken as the origin. Data plotted are representative of two independent experiments.

with depth in the SOBP culminating at $RBE \approx 2.0$ in the most distal part of the SOBP of a 70-MeV beam. Another approach was developed by Coutrakon *et al.* (18) for incident energies ranging between 155 and 250 MeV, who concluded that the mean RBE values lie between 1.0 and 1.2 and should not vary significantly with incident energy and depth in the SOBP until the distal edge of the beam. Based on simulation of modulated Bragg curves and proton Monte Carlo calculation of microdosimetric distributions, Paganetti *et al.* (19) proposed a microdosimetric weighting function to predict the RBE of protons beams as a function of the incident proton energy (between 70 and 250 MeV), the biological endpoint, the energy spread introduced by scattering and energy loss straggling in the absorber, and the depth in the SOBP. The calculations gave RBE values in the mid-SOBP ranging between 1.35 (250 MeV) and 1.9 (70 MeV) for the inactivation of V79 cells in G1/S phase of the cell cycle vs. 1.1 (250 MeV) and 1.3 (70 MeV) for intestinal crypt regeneration in mice. Although the calculated RBE value (based on the α slopes ratio) at the mid-SOBP for the 70-MeV beam was substantially higher than that found in our experiments and reported by others (6, 7), the model did predict an increase of the RBE values for modulated proton beams with depth, up to 1.37 at the distal end of the 155 MeV SOBP beam analyzed.

Depth-dependence of cell survival along the modulated SOBP of the 72 MeV proton beam of the Paul Scherrer Institut was simulated with a biophysical model by Biaggi *et al.* (11), assuming that clustered DNA damage is a relevant step of the process leading to cell inactivation. The results support the assumption of a direct connexion between LET, RBE, and the induction of ionization clusters, with a good agreement between the calculated microdosimetric curve and the death of V79 fibroblasts, with RBE values in excess of 2.0. This value is much larger than that found in our own measurements and those reported by Paganetti *et al.* (19), which might reflect the cell model used. Nevertheless, the authors concluded that the large increase of RBE in the distal part of the SOBP was due to the presence of short-range, low-energy protons. The yield of these particles depends on the initial energy of the proton beam and Monte Carlo calculations have indicated that their contribution should be relatively minor in the distal part of the SOBP generated from a 200-MeV beam (20) providing a possible

explanation for the differential response reported here in the SOBPs generated from the 76- and 201-MeV beams.

DNA damage

Ionizing radiation induces not only DNA DSBs but also OCDLs. Although isolated damage is generally repaired efficiently, clustered DNA lesions have been suggested to be more difficult to repair or to be non-repairable with thus a high mutagenic potential (21). Data available on the formation of clustered damage by high-LET radiations are often controversial suggesting a variable response to dose and radiation type (22).

Although we found that Fpg/Nth treatment resulted in an increase in the number of PFGE-detectable DSBs relative to nonenzymatic treatment, no variation was seen depending on the depth in the SOBP. These results leave unexplained the molecular nature of the damage responsible for the higher RBE observed in the distal part of the SOBP of the 76-MeV beam. It seems that the OCDLs revealed by these enzymatic treatments are not the predominant determinant of cellular lethality and raises the question of the correlation between the RBE and the nature of the lethal DNA damage. Although the total amount of DSBs or OCDLs did not vary along the isocenter axis of the 76-MeV SOBP, other features of biological significance may be different between the three positions. For instance, the generation of small DNA fragments not detectable in this study could lead to chromosome deletions and cell death. Cytogenetic analyses such as the study of chromosome aberrations or micronuclei formation could provide an explanation. Other types of clustered damage that the glycosylases used here are unable to bind or cleave (such as DNA associated proteins or other molecules) may influence the severity of the lesions. Belli *et al.* (23) showed in Chinese hamster V79 cells that DNA fragments induced by light-charged particles are shifted toward smaller sizes compared with γ -rays, in the size range characteristics of the loop structure of the chromosome. These observations suggest that the spatial relationship between lesions may have a significant impact on the cellular response to proton therapy. The molecular dissection of the formation and repair of such complex lesions, using for example cell clones made deficient for known repair genes using RNA interference, will help to resolve this issue and are in progress in our laboratory.

REFERENCES

1. Dendale R, Lumbroso-Le Rouic L, Noel G, *et al.* Proton beam radiotherapy for uveal melanoma: Results of Curie Institut-Orsay proton therapy center (ICPO). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:780–787.
2. Habrand JL, Schneider R, Alapetite C, *et al.* Proton therapy in pediatric skull base and cervical canal low-grade bone malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:672–675.
3. Noel G, Feuvret L, Calugaru V, *et al.* Chordomas of the base of the skull and upper cervical spine. One hundred patients irradiated by a 3D conformal technique combining photon and proton beams. *Acta Oncol* 2005;44:700–708.
4. Belli M, Bettega D, Calzolari P, *et al.* Inactivation of human normal and tumour cells irradiated with low energy protons. *Int J Radiat Biol* 2000;76:831–839.
5. Belli M, Cherubini R, Finotto S, *et al.* RBE-LET relationship for the survival of V79 cells irradiated with low energy protons. *Int J Radiat Biol* 1989;55:93–104.
6. Gerweck LE, Kozin SV. Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy. *Radiother Oncol* 1999;50:135–142.
7. Paganetti H, Niemierko A, Ancukiewicz M, *et al.* Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:407–421.

8. Gueulette J, Octave-Prignot M, De Costera BM, *et al.* Intestinal crypt regeneration in mice: A biological system for quality assurance in non-conventional radiation therapy. *Radiother Oncol* 2004;73(Suppl 2):S148–S154.
9. Gueulette J, Slabbert JP, Bohm L, *et al.* Proton RBE for early intestinal tolerance in mice after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 2001;61:177–184.
10. Bettega D, Calzolari P, Chauvel P, *et al.* Radiobiological studies on the 65 MeV therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1297–1303.
11. Biaggi M, Ballarini F, Burkard W, *et al.* Physical and biological characteristics of a fully modulated 72 MeV therapeutic proton beam: Model predictions and experimental data. *Nucl Instrum Meth Phys Res B* 1999;159:89–100.
12. Tang JT, Inoue T, Yamazaki H, *et al.* Comparison of radiobiological effective depths in 65-MeV modulated proton beams. *Br J Cancer* 1997;76:220–225.
13. Fu KK, Phillips TL, Heilbron DC, *et al.* Relative biological effectiveness of low- and high-LET radiotherapy beams for jejunal crypt cell survival at low doses per fraction. *Radiology* 1979;132:205–209.
14. Stenerlöv B, Karlsson KH, Cooper B, *et al.* Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: Results for cells deficient in nonhomologous end joining. *Radiat Res* 2003;159:502–510.
15. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, *et al.* Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: Oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry* 2000;39:8026–8031.
16. Beuve M, Alphonse G, Maalouf M, *et al.* Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:635–642.
17. Belli M, Campa A, Ermolli I. A semi-empirical approach to the evaluation of the relative biological effectiveness of therapeutic proton beams: The methodological framework. *Radiat Res* 1997;148:592–598.
18. Coutrakon G, Cortese J, Ghebremedhin A, *et al.* Microdosimetry spectra of the Loma Linda proton beam and relative biological effectiveness comparisons. *Med Phys* 1997;24:1499–1506.
19. Paganetti H, Olko P, Kobus H, *et al.* Calculation of relative biological effectiveness for proton beams using biological weighting functions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:719–729.
20. Ottolenghi A, Merzagora M, Paretzke HG. DNA complex lesions induced by protons and alpha-particles: Track structure characteristics determining linear energy transfer and particle type dependence. *Radiat Environ Biophys* 1997;36:97–103.
21. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 1994;65:7–17.
22. Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: A review. *J Radiat Res (Tokyo)* 2008;49:203–210.
23. Belli M, Cherubini R, Dalla Vecchia M, *et al.* DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulsed-field gel electrophoresis. I. Experimental results. *Int J Radiat Biol* 2002;78:475–482.

4.1.3 Discussion – Conclusions 1ère partie

La première partie de la thèse a été axée sur l'analyse et la comparaison des deux faisceaux médicaux d'énergies différentes (76 et 201 MeV) utilisés en clinique à l'ICPO. Dans cette étude nous avons cherché à déterminer s'il existait une corrélation entre l'EBR pour la létalité cellulaire et pour l'incidence des cassures double-brin de l'ADN en fonction de la nature du rayonnement, de l'énergie et de la position des cellules dans le SOBP.

(i) EBR pour la survie cellulaire

Les courbes de survie établies à partir de la survie clonogénique des cellules irradiées aux trois positions (P1, P2, P3) du SOBP généré par le faisceau 201 MeV, sont identiques et se superposent à celle obtenue après exposition au rayonnement γ du ^{137}Cs . La valeur d'EBR relative à la mort cellulaire induite par les protons de 201 MeV est donc identique (aux erreurs statistiques près) à celle du rayonnement γ du ^{137}Cs et ne varie pas de manière significative tout au long du SOBP.

En revanche, si l'on se base sur les valeurs de D_{37} (dose nécessaire pour avoir 37% de cellules survivantes) et de la SF2 (fraction des cellules survivantes après une exposition à la dose de 2 Gy), l'EBR du faisceau de 76 MeV est significativement plus élevée que celle du rayonnement γ du ^{137}Cs et augmente avec la profondeur dans la SOBP (Tableau 8) pour les deux principales lignées de cellules humaines utilisées dans l'étude. On trouvera dans l'article (voir Tableau I de l'article) les valeurs des paramètres α et β déterminés à partir des mêmes courbes de survie.

		HeLa		SQ20B	
Energy	Position	D_{37}^g/D_{37}^P	SF2 ^g /SF2 ^P	D_{37}^g/D_{37}^P	SF2 ^g /SF2 ^P
76 MeV	P1	0.997 (1.067)	1.016 (1.087)	1.027 (1.099)	1.006 (1.076)
	P2	1.066 (1.141)	1.082 (1.158)	1.090 (1.166)	1.010 (1.081)
	P3	1.245 (1.332)	1.222 (1.308)	1.217 (1.302)	1.656 (1.772)
201 MeV		1.000 (1.07)		1.000 (1.07)	

Tableau 8. Valeurs d'EBR résultant du rapport des valeurs de D_{37} et de la SF2 pour les faisceaux de 76 et 201 MeV (en police droite, EBR par rapport au ^{137}Cs ; en italique, EBR par rapport au ^{60}Co).

En prenant en compte le fait que l'EBR du ^{137}Cs relative au ^{60}Co est de 1,07 [64], l'EBR du faisceau de protons de 76 MeV au centre du SOBP (position P2) est de $1,16 \pm 0,02$

par rapport à ^{60}Co , en bon accord avec des valeurs d'EBR publiées à partir des études *in vitro* (pour une revue voir [68]). Cependant, la différence observée entre les deux lignes de faisceau, était inattendue.

Les études antérieures [68,151] avaient suggéré une augmentation de l'EBR avec la profondeur dans le SOBP des faisceaux de protons de 65-80 MeV utilisées pour le traitement du mélanome de la choroïde. Toutefois, il n'y avait pas de données sur les faisceaux de protons d'énergie ≥ 201 MeV utilisés pour le traitement des tumeurs intracrâniennes. Les études avec le faisceau 160 MeV du Harvard Cyclotron Laboratory concluaient à une valeur d'EBR $> 1,15$ par rapport au rayonnement γ du ^{60}Co [164,166,188].

En sus des aspects liés au transfert d'énergie à l'échelle microscopique, l'EBR peut varier selon la lignée cellulaire et le niveau de dose. Nos propres résultats montrent qu'on n'obtient pas les mêmes valeurs selon qu'on se réfère à D_{37} ou SF2 d'une part, aux paramètres α et β des courbes de survie d'autre part (Tableau I de l'article). Ces incertitudes sont inévitables dès lors qu'on s'adresse à un système où la réponse n'est pas exponentielle en dose. De plus, l'un des effets connus des rayonnements de TEL élevé est de linéariser les courbes de survie en augmentant la valeur du paramètre α au détriment du paramètre β [17]. Ainsi, la valeur de l'EBR peut varier non seulement à raison du changement du TEL tout au long du SOBP, mais aussi avec le rapport α/β de la lignée cellulaire utilisée. Toutefois, nous montrons qu'une différence de radiosensibilité entre deux lignées cellulaires ne peut pas fournir une explication des raisons pour lesquelles l'EBR est invariante dans la profondeur du SOBP du faisceau de 201 MeV (Tableau I de l'article).

La majorité des centres de traitement de protons emploient une valeur générique d'EBR égale à 1,10 sans tenir compte de la profondeur dans le SOBP, ni du tissu, ni de la dose ou de la dose par fraction, ni de l'énergie des protons. Nos données, après celles d'autres auteurs et plus particulièrement des travaux de microdosimétrie, montrent que la planification des traitements doit intégrer les paramètres physiques et biologiques pour optimiser le contrôle de la tumeur.

(ii) Considérations microdosimétriques

Plusieurs auteurs ont examiné les caractéristiques microdosimétriques des faisceaux de protons monoénergétiques ou modulés. Cependant, une détermination précise des effets de l'énergie du faisceau incident, de la modulation et de la profondeur dans les tissus sur la relation TEL-EBR, importante dans la perspective de la planification des traitements, fait encore défaut.

Une première approche classique de cette question réside dans une fonction empirique biologique qui corrèle les spectres de microdosimétrie avec des valeurs de survie cellulaire. Cette approche a été développée par Coutrakon *et al.* [47] pour des énergies incidentes comprises entre 155 et 250 MeV. Les auteurs ont conclu que, dans ces conditions la valeur moyenne de l'EBR se situe entre 1,0 et 1,2 et ne devrait pas varier de façon significative en fonction de l'énergie incidente ou de la profondeur dans le SOBP. Belli *et al.* [14] ont développé une autre approche semi-empirique combinant un calcul Monte-Carlo et

les réponses publiées dans la littérature sur des cellules V79 (fibroblastes de hamster chinois) irradiées avec des faisceaux mono-énergétiques de protons. Appliquée à un faisceau large de protons dont l'énergie initiale est 70 MeV, la méthode prédit une augmentation de l'EBR avec la profondeur dans le SOBP atteignant une valeur de l'EBR $\approx 2,0$ dans la partie la plus distale du SOBP.

En se basant sur la simulation de courbes de Bragg modulées et sur un calcul Monte-Carlo des distributions microdosimétriques de protons, Paganetti *et al.* [152] ont proposé une fonction de pondération microdosimétrique pour prédire l'EBR des rayonnements de protons en fonction de l'énergie des protons incidents (entre 70 et 250 MeV), l'effet biologique, l'énergie de propagation introduite par la diffusion et la perte d'énergie dans l'absorbeur, et la profondeur dans le SOBP. Les calculs ont donné, pour le milieu du SOBP, des valeurs d'EBR de 1,35 (250 MeV) et 1,9 (70 MeV) pour l'inactivation des cellules V79 dans la phase G1/S du cycle cellulaire contre 1,1 (250 MeV) et 1,3 (70 MeV) pour la régénération des cryptes intestinales chez la souris. Bien que cette valeur calculée de l'EBR (basée sur les pentes α des courbes de survie) au milieu du SOBP pour le faisceau de 70 MeV soit sensiblement plus élevée que dans nos expériences et celles rapportées par d'autres auteurs [68,151], le modèle prédit une augmentation avec la profondeur des valeurs de l'EBR pour les faisceaux de protons modulés, jusqu'à 1,37 à l'extrémité distale d'un SOBP généré par un faisceau de 155 MeV.

La variation de la survie cellulaire avec la profondeur dans le SOBP du faisceau de protons de 72 MeV de l'Institut Paul Scherrer a été simulée avec un modèle biophysique par Biaggi *et al.* [18]. Basés sur un modèle de la structure de la chromatine, les calculs effectués par ces auteurs sont en bon accord avec le concept de *dommages multiples localisés* de l'ADN (*LMDS*). Dans cette approche, pour le calcul Monte-Carlo les auteurs ont utilisé un code FLUKA. Le résultat confirme l'hypothèse d'une relation directe entre le TEL, l'EBR et l'induction de grappes d'ionisation, avec une bonne concordance entre la courbe calculée en microdosimétrie et la mort de fibroblastes V79. Toutefois, les auteurs trouvent une valeur d'EBR supérieure à 2,0 dans la partie distale du SOBP. Cette valeur est significativement plus grande que celle trouvée dans nos propres mesures et celle rapportée par Paganetti *et al.* [152]. Nous pensons que cette différence est liée au modèle cellulaire utilisé. Néanmoins, la forte augmentation de l'EBR dans la partie distale du SOBP a été expliquée par les auteurs par la présence sur une courte distance d'un grand nombre de protons de basse énergie (donc présentant un fort TEL). Le rendement de ces particules dépend de l'énergie initiale du faisceau de protons et les calculs Monte-Carlo indiquent que leur contribution devrait être relativement mineure dans la partie distale du SOBP généré à partir d'un faisceau de 200 MeV [148]. Ceci est susceptible d'expliquer la réponse différentielle que nous rapportons ici dans les SOBP générés à partir de 76 et 201 MeV.

(iii) Dommages de l'ADN

Les rayonnements ionisants induisent des dommages double-brin de l'ADN comme les CDB et les *clusters* de sites abasiques et de bases oxydées de l'ADN. Les auteurs ont

proposé que ces *clusters*, réputés dotés d'un fort pouvoir mutagène [72], peuvent être détectés et quantifiés au moyen d'endonucléases qui les transforment en CDB analysables par électrophorèse en champs pulsés [128,162,184]. Ces résultats ont été récemment mis en doute en raison d'artefacts liés à la méthodologie ([26],[84]).

Nous avons appliqué cette méthode afin de déterminer si un excès significatif de *clusters* est ou non formé dans la partie distale du SOBP de 76 MeV. Les résultats (Figure 4 de l'article) montrent que le traitement par Fpg/Nth induit la formation d'un excès des CDB d'un facteur de 1,35 à 1,65 par rapport au contrôle. Toutefois, le rendement de l'ADN extrait des *plugs* après traitement enzymatique ne varie pas significativement avec la profondeur dans le SOBP, non plus qu'avec l'énergie initiale du faisceau initial. On constate une tendance (non significative) à un excès de CDB dans le SOBP de 201 MeV par rapport aux échantillons exposés aux rayons γ du ^{137}Cs , mais cet effet n'a pas de contrepartie en termes de mortalité cellulaire. Nous concluons avec Boucher et al. [26] que les LMDS, s'ils existent, sont en nombre trop faible pour qu'ils puissent être caractérisés par des processus physico-chimiques ou enzymatiques peu spécifiques.

La nature moléculaire des dégâts responsables de l'augmentation de l'EBR observé dans la partie distale de la SOBP du faisceau de 76 MeV, reste donc un mystère. On peut toutefois proposer que le type des lésions - leur complexité surtout - et leur répartition spatiale joue un rôle important dans la réponse cellulaire à la protonthérapie. Cette hypothèse sera discutée dans la deuxième partie de la thèse.

4.2 2^{ème} PARTIE.

Analyse de la nature et des mécanismes de réparation des lésions induites par les protons

4.2.1 Introduction

Les résultats de la première partie de ma thèse ont fait apparaître une différence inattendue de la valeur de l'EBR relative à la survie au rayonnement dans la partie distale du SOBP en fonction de l'énergie incidente. De manière tout aussi inattendue, les données ont montré l'absence de corrélation entre l'EBR pour la survie et l'incidence globale des cassures double-brin de l'ADN (CDB) déterminée par électrophorèse en champs pulsés. Cette observation pose la question de la nature des lésions létales dans ces conditions. Pour progresser, il fallait mettre en place une analyse de la nature et des mécanismes de réparation des lésions radio-induites de l'ADN en fonction des caractéristiques physiques des rayonnements. Cette étude, qui n'est pas achevée mais dont les résultats permettent déjà de proposer un cadre théorique, forme le second volet de la thèse.

Dans une première étape, j'ai étudié l'incidence des cassures simple-brin de l'ADN (CSB) en fonction du type de rayonnement (protons de 76 ou 201 MeV vs. photons de 662 keV du ^{137}Cs) et en fonction de la profondeur dans le SOBP. Deux méthodes ont été employées : la technique d'éluion alcaline sur filtre, et la méthode connue sous le nom de *Comet assay*. Pour cette dernière l'analyse a été réalisée avec et sans traitement enzymatique post-irradiation par la formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) et l'endonuclease III (Nth) d'*E. coli*, comme dans le protocole utilisé pour l'électrophorèse en champs pulsés (cf. article).

Pour une étude préliminaire des mécanismes impliqués dans la réparation des lésions radio-induites par les protons, nous avons déterminé la survie au rayonnement de lignées cellulaires déficientes pour différentes voies de signalisation et de réparation des lésions de l'ADN. Nous avons établi dans ce but une collaboration avec le Dr. Denis Biard (CEA-DSV-IRCM-LGR, Fontenay-aux-Roses) qui nous a fourni des clones de cellules HeLa invalidées de façon stable pour OGG1, PARP-1, XRCC1, XRCC4, DNA-PK ou ATM. Une lignée HeLa Artemis^{KD} a été établie pour la circonstance. La méthode employée par le Dr Biard consiste à transfecter la lignée HeLa parentale avec des vecteurs pEBV (*Epstein-Barr Virus*) contenant des séquences codant des shRNA (*short hairpin RNA*) dirigés contre les ARNm d'intérêt [19,20]. Les clones déficients ont été utilisés pour procéder à la même étude que la lignée sauvage.

La détermination par immunofluorescence du recrutement aux sites de dommages de trois protéines (ATM, γH2AX , Artemis) effectrices de la réparation des CDB, a été développée en troisième approche. Le rationnel de cette approche repose sur l'opinion largement validée, que d'éventuels défauts de réparation des CDB impactent lourdement la survie au rayonnement. Nous rappelons (voir 2.6.1) que la détection des CDB arme une cascade de signalisation qui se traduit par la phosphorylation d'un ensemble de protéines dont les plus caractéristiques sont ATM et H2AX. Les formes phosphorylées de ces protéines (pATM et γH2AX) s'agrègent en *foci* détectables par immunofluorescence et dont les

cinétiques de formation et de déclin dépendent de la structure des lésions de l'ADN [45]. Nous espérons que cette propriété puisse apporter des informations sur la nature des lésions de l'ADN dans les régions de plus fort TEL, c'est à dire dans la partie distale du SOBP.

4.2.2 Résultats

(i) Détermination des CSB par électrophorèse en microgel (*Comet assay*)

Östling et Johanson [147] ont été les premiers à développer la technique d'électrophorèse microgel pour la détection de dommages de l'ADN au niveau d'une seule cellule. Singh [174] a adapté la méthode pour permettre une électrophorèse en conditions alcalines (pH > 13). Cette version est plus sensible pour mesurer l'effet des agents génotoxiques [189], mais introduit un biais dû à la dégradation de l'ADN par hydrolyse alcaline.

A partir d'une suspension, les cellules sont incluses dans un microgel d'agarose sur une lame de microscope et placées, après lyse, dans un champ électrophorétique. En présence de cassures de brin, l'ADN est relaxé et migre vers l'anode en formant une «queue de comète» (Fig. 30) qui sera visualisée après marquage par un fluorochrome spécifique de l'ADN double-brin. La méthode a été décrite au chapitre 3.6.

L'étude des lésions d'ADN par la méthode *Comet assay* a comporté deux parties:

- Une analyse directe des lésions formées sous irradiation photonique (rayonnement γ du ^{137}Cs) vs. protons de 201 MeV à l'entrée du faisceau et au centre du SOBP,
- Une analyse après traitement des échantillons par les ADN glycosylases Fpg et Nth.

Deux lignées cellulaires : SQ20B (carcinome tête et cou) et IMR90 (fibroblastes humains normaux) ont été mises en œuvre. 1800 clichés (50 par lame) en fluorescence (propidium) ont été capturés à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot équipé d'une lampe à vapeur de mercure et caméra CCD refroidie. La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel VEVA (VisionExplorer v 1.11a – Graftek Imaging).

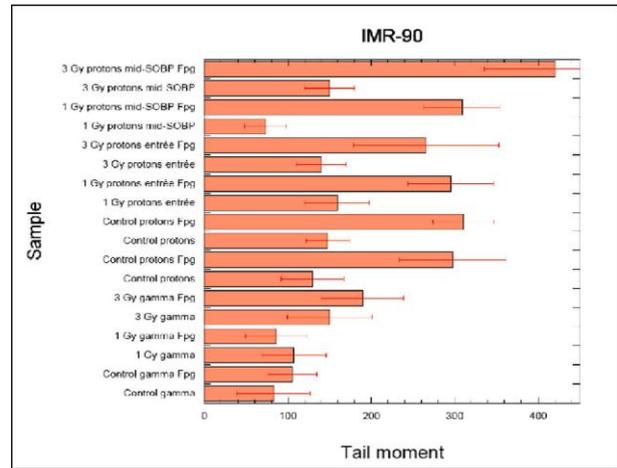
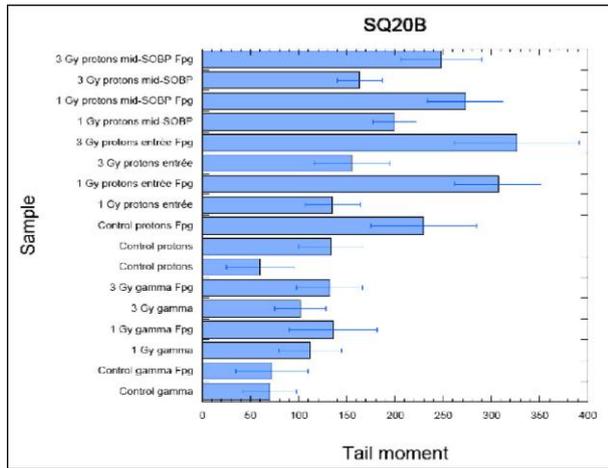


Fig. 33. Résultats de l'analyse du moment de la queue des comètes pour les lignées cellulaires SQ20B et IMR90.

Les résultats montrent que pour les deux lignées cellulaires considérées, l'incidence des dommages n'est pas significativement différente entre l'entrée et le milieu du SOBp d'une part, entre ces deux positions et les photons ^{137}Cs d'autre part (Fig. 33). L'exposition aux glycosylases Fpg et Nth induit par elle-même une fragmentation importante de l'ADN (Fig. 34). Le même phénomène avait été observé dans les expériences par électrophorèse en champs pulsés (voir figure 4 de l'article).

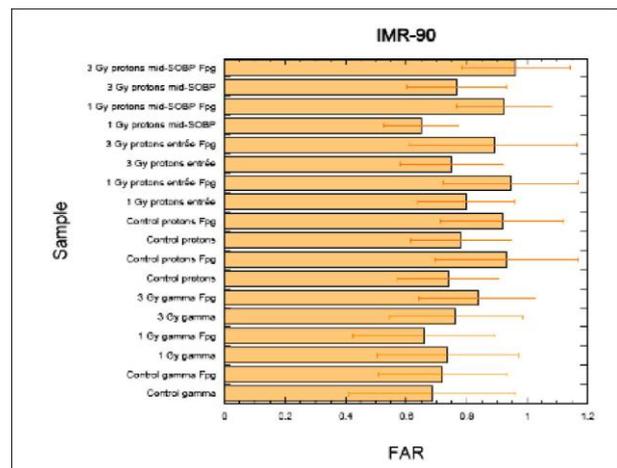
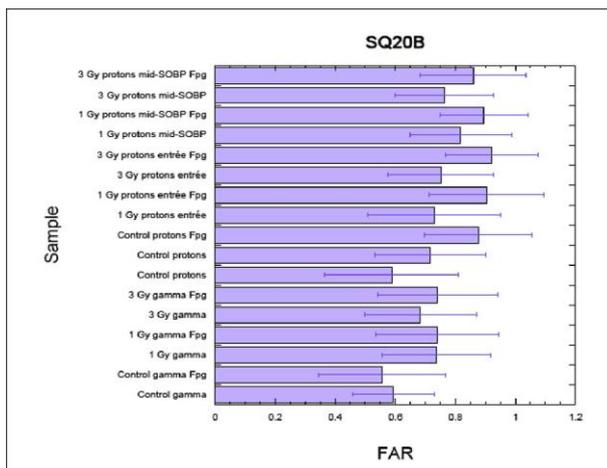


Fig. 34. Résultats de l'analyse de la FAR (Fraction of Activity Released) des comètes pour les lignées cellulaires SQ20B et IMR90.

Une analyse plus fine des résultats conduit à se poser la question de la validité de la méthode. En effet, pour les deux lignées cellulaires et pour les deux paramètres étudiés on ne

trouve pas de différence entre l'exposition à 1 Gy et 3 Gy, et ce aussi bien pour les protons que pour le rayonnement γ .

Une première explication tient à ce que les conditions expérimentales peuvent permettre une réparation partielle des radio-lésions entre le moment de leur formation et le moment où la lyse des cellules abolit toute possibilité de réparation. De fait, et bien que toutes les manipulations aient été effectuées à basse température, il s'écoule plus d'une heure entre l'irradiation, l'inclusion des cellules dans le gel et la lyse. Un autre artefact est introduit par le logiciel de quantification. Tous les études publiées par divers auteurs sur cette technique [6,43,44,59,85,125,167,177,189-191] ont utilisé un matériel et des logiciels qui exploitent les images captées en temps réel sur une profondeur de 16 bits. Les contraintes liées à la distance entre le laboratoire et le lieu d'irradiation imposaient un traitement différé et la capture des images de fluorescence sur une dynamique de 8 bits, de sorte que les "têtes" des comètes ont été souvent saturées par le fluorochrome. Les résultats n'ont donc qu'une valeur indicative, et nous avons décidé de poursuivre l'étude en utilisant d'autres méthodes.

(ii) Etude des CSB par la méthode d'élution alcaline sur filtre

L'élution alcaline a été développée par Kohn *et al.* à partir de 1976 [103]. La méthode (voir chapitre 3.7) consiste à lyser les cellules sur une membrane d'arrêt en polycarbonate comportant des pores calibrés ($\text{\O} 2 \mu\text{m}$) par des détergents en présence d'une concentration d'EDTA suffisante pour séquestrer les ions métalliques nécessaires à l'activité des nucléases. Les constituants cellulaires sont évacués avec un "tampon de lyse" à l'exception des filaments d'ADN. L'ADN est alors élué dans des conditions alcalines causant, d'une part, une séparation des brins, et d'autre part des CSB aux sites dits alcali-labiles (voir chapitre 3.7). La vitesse d'élution des molécules d'ADN à travers les pores est inversement proportionnelle à la longueur des brins. La cinétique d'élution de l'ADN cellulaire ayant incorporé de la thymidine radioactive ($2\text{-}^{14}\text{C}$) par voie de biosynthèse constitue habituellement la donnée d'expérience. On construit alors le profil d'élution à partir de la mesure par scintillation de la radioactivité des fractions d'élution recueillies à intervalles constants (Fig. 35). La cinétique d'élution est caractérisée par deux paramètres :

- la vitesse d'élution, déterminée par la pente initiale,
- la fraction d'ADN retenue au plateau d'élution.

L'existence d'une rétention indique qu'une fraction de l'ADN ne peut franchir les pores du filtre. Le pourcentage d'ADN qui reste sur le filtre, c'est-à-dire le rapport [Radioactivité du filtre] / [Radioactivité totale (éluat + filtre)] à la fin de l'élution, permet d'estimer le taux d'ADN non clivé pour chaque échantillon à un temps donné.

Pour l'étude en cours, j'ai utilisé la lignée cellulaire SQ20B. Les cellules ont été irradiées à deux paliers de dose (3 Gy et 5 Gy) aux trois positions (P1, P2, P3) du SOBP du faisceau de 76 MeV et comparées à celles irradiées avec le rayonnement γ du ^{137}Cs .

La figure 35 présente les profils d'élution alcaline des cellules SQ20B après une irradiation de 3 Gy.

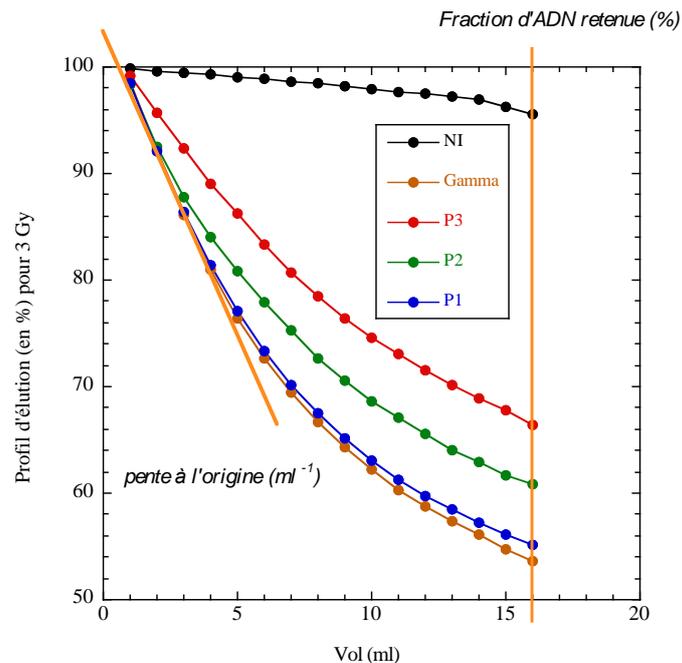


Fig. 35. Profils d'élution alcaline de cellules SQ20B après une irradiation de 3 Gy aux trois positions du SOBP du faisceau de 76 MeV, comparés à une irradiation gamma (^{137}Cs) à la même dose. (NI = non irradié).

Les profils d'élution permettent de calculer la vitesse d'élution et la fraction d'ADN retenue au plateau d'élution. La pente de la courbe d'élution est une mesure du nombre de cassures en unités arbitraires. En effet, sachant que la vitesse d'élution est d'autant plus rapide que les brins d'ADN sont plus courts et que l'ADN est totalement dénaturé dans les conditions d'élution, la quantité d'ADN retenue sur le filtre, ou la réciproque de la pente initiale, constituent toutes deux une mesure inverse du nombre de CSB. La figure 36 présente les pentes à l'origine des cellules SQ20B après une irradiation de 3 Gy (Fig. 36 a) et de 5 Gy (Fig. 36 b). La figure 37 montre le pourcentage d'ADN retenu après une élution de 16 ml pour 3 Gy (Fig. 37 a) et 5 Gy (Fig. 37 b).

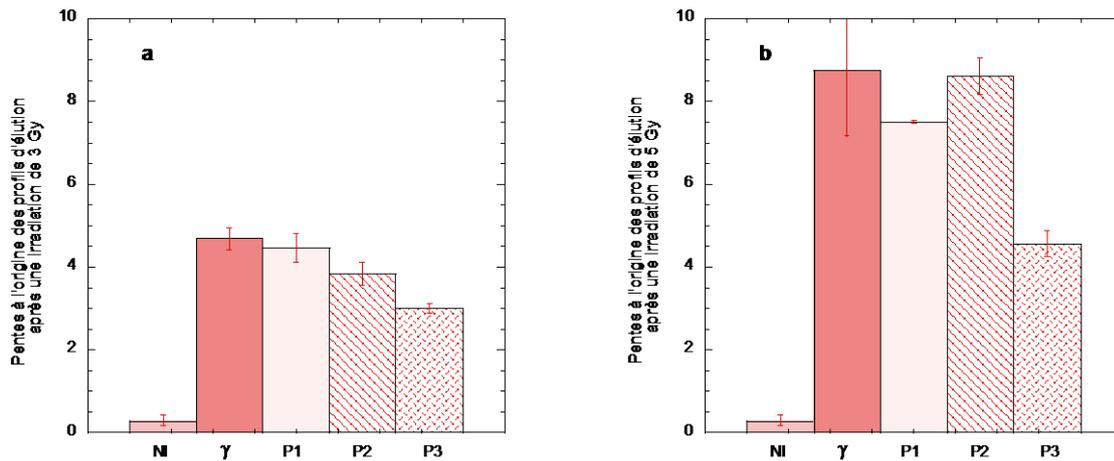


Fig. 36 : *Pentes à l'origine des profils d'éluion alcaline de cellules SQ20B après une irradiation de 3 Gy (a) et 5 Gy (b) aux trois positions du SOBP du faisceau de 76 MeV, comparés à une irradiation gamma (^{137}Cs) à la même dose. (NI = non irradié).*

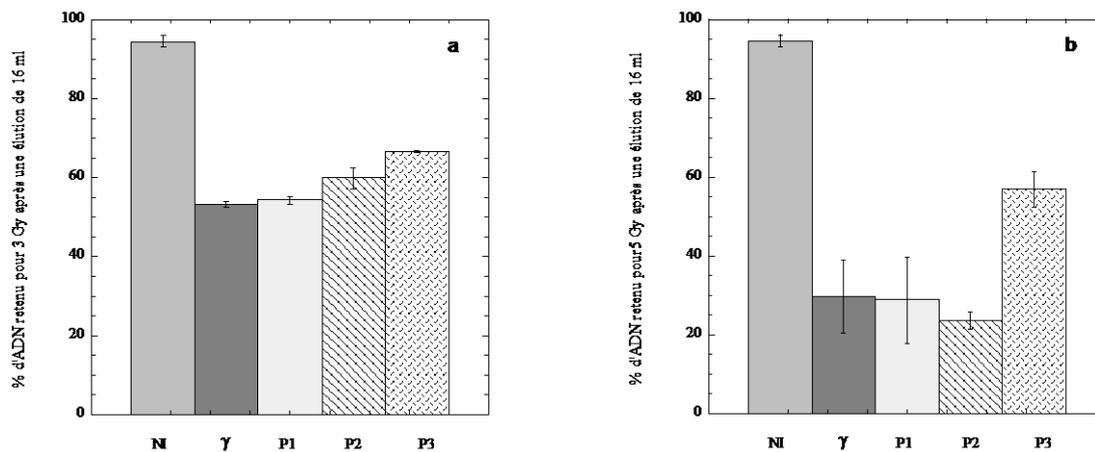


Fig. 37 : *Pourcentage d'ADN retenu après une éluion de 16 ml de cellules SQ20B pour une irradiation de 3 Gy (a) et 5 Gy (b) aux trois positions du SOBP du faisceau de 76 MeV, comparés à une irradiation gamma (^{137}Cs) à la même dose. (NI = non irradié).*

Le diagramme d'éluion ne montre pas de différence entre l'irradiation gamma et les protons en position P1. Il existe une différence, non significative, en position P2. En revanche, la différence est hautement significative avec les cellules irradiées en position P3 et va

clairement dans le sens d'une réduction de l'incidence des dommages simple-brin à cette position. Cet effet est plus marqué à 5 Gy qu'à 3 Gy.

(iii) Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes

Pour étudier les mécanismes impliqués dans la réparation des lésions radio-induites par les protons, nous avons mesuré la survie clonogénique de clones de cellules HeLa défectifs pour différentes voies de signalisation et de réparation des lésions de l'ADN. Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, la méthode employée repose sur la transfection stable d'une lignée HeLa avec des vecteurs pEBV (Epstein-Barr Virus) contenant des séquences codant des shRNA (short hairpin RNA) dirigés contre les ARNm d'intérêt et portant une cassette de sélection à l'hygromycine B [19,20]. Différents clones "Knock-down" (KD) ont été ainsi obtenus après transfection de vecteurs réplikatifs pEBVsiRNA dirigés contre OGG1 (8-oxoguanine DNA Glycosylase 1), PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1), XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) d'une part, qui interviennent dans la réparation par excision de bases (BER/SSBR) et XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), DNA-PK_{cs} (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou Artemis (DNA cross-link repair 1C protein) d'autre part, qui interviennent dans la réparation par suture non-homologue (NHEJ) et la signalisation des cassures de l'ADN. La lignée Artemis-KD a été spécialement créée pour cette étude par D. Biard. Comme lignée contrôle (HeLa Vect Ctl), la lignée parentale transfectée avec un plasmide pEBVsiRNA contenant un shRNA non fonctionnel (pBD650) a été utilisée.

La Figure 38 et le Tableau 9 montrent les caractéristiques des lignées déficientes utilisées. Ces clones ont été précédemment décrits et caractérisés par D. Biard [21,55], par notre laboratoire [69] et au cours de nos travaux.

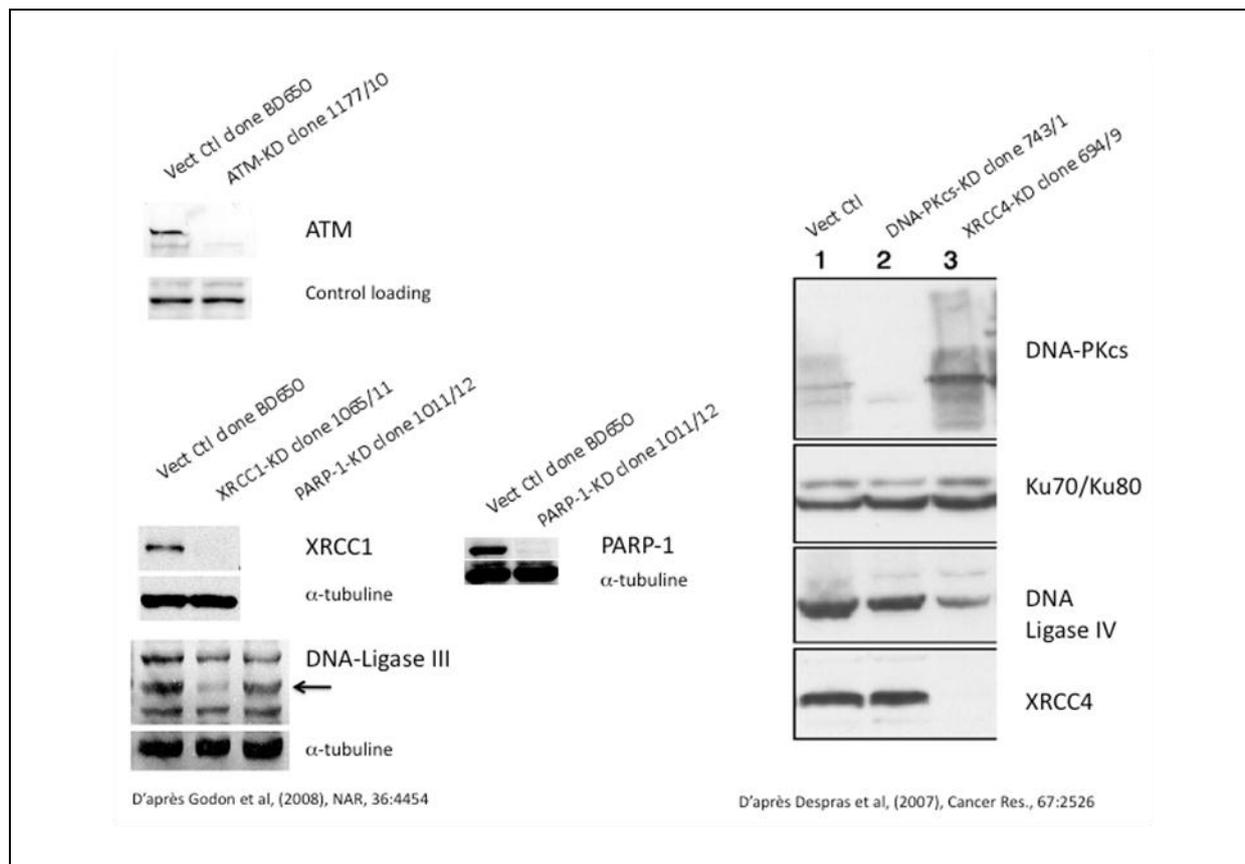


Fig. 38 : Détermination par Western blot du niveau résiduel d'expression des protéines ciblées dans les différentes lignées défectives utilisées [55,69].

Clone défectif	Voie impliquée	Phénotypes
PARP-1-KD clone 1011/12	SSBR, BER	Niveau d'extinction supérieur à 90% en immunofluorescence (IF) et en Western Blots. Perte de l'activité de poly(ADP-ribosylation). Croissance plus faible que les contrôles. Sensibilité aux rayons gamma.
XRCC1-KD clone 1065/11	SSBR, BER	Niveau d'extinction supérieur à 90% en immunofluorescence et en Western Blots. Croissance plus faible que les contrôles. Diminution du taux protéique du partenaire DNA Ligase III.
Ogg1-KD clone 784/27	SSBR	Réduction de 80% de l'activité Ogg1 endogène. Bonne croissance. Aucune sensibilité aux UVC.
DNA-PKcs-KD clone 743/1	NHEJ	Niveau d'extinction supérieur à 95% en IF. Réduction de 70% de l'activité NHEJ. Forte sensibilité aux rayons gamma et à l'étoposide.

XRCC4-KD clone 694/9	NHEJ	Tous les clones présentent un niveau résiduel d'environ 20% (sinon mort cellulaire). Niveau d'extinction supérieur à 75%. Forte sensibilité aux rayons gamma, aux UVC et à l'étoposide. Baisse du niveau protéique du partenaire DNA Ligase IV.
-------------------------	------	---

Tableau 9: Phénotypes des clones défectifs utilisés (d'après D. Biard, [21]).

Il est à noter que dans une approche avec des lignées Knock-Down, il peut rester un niveau résiduel de la protéine dont l'importance dépend du gène ciblé. L'obtention des clones est parfois délicate (les souris KO pour XRCC1 et XRCC4 ne sont pas viables) et il se produit des mécanismes de compensation.

(iv) Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes pour le BER

Nous avons comparé les survies cellulaires de trois clones déficients pour les voies de réparation BER/SSBR. Dans un premier temps nous avons déterminé la radiosensibilité aux rayons gamma. La Figure 39 présente les survies clonogéniques des lignées PARP-1-KD, Ogg1-KD et XRCC1-KD.

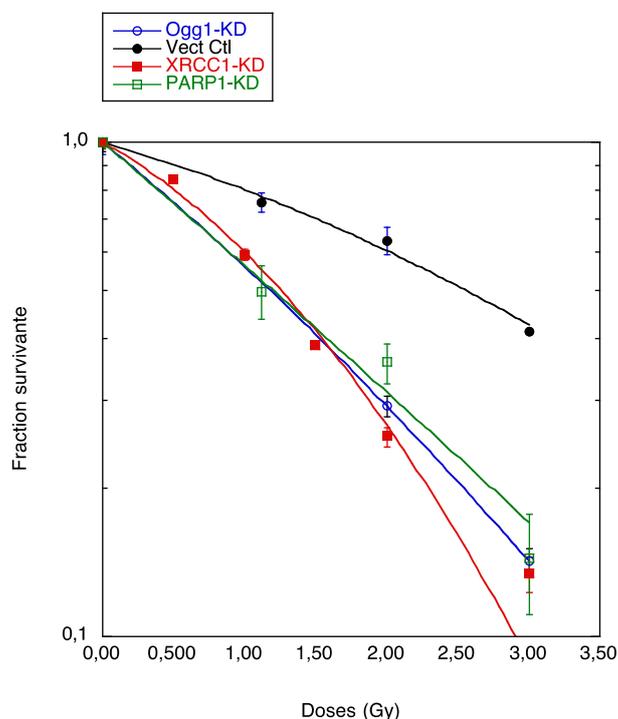


Fig. 39 : Courbes de survie des lignées HeLa vecteur control, XRCC1-KD, PARP-1-KD et Ogg1-KD après irradiation gamma.

Les survies à 2 Gy (SF2) et 3 Gy (SF3) ont été déterminées et les D_{37} calculées. Pour le calcul de la valeur de la dose létale moyenne D_{37} , c'est à dire la dose pour laquelle la survie est égale à $1/e \approx 0.37$, les courbes de survie clonogénique de toutes les lignées ont été ajustées soit à l'équation linéaire-quadratique,

$$(1) \ln(S) - \ln(S_0) = -\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2 \quad D_{37} = \frac{-\alpha + \sqrt{\alpha^2 + 4\beta}}{2\beta}$$

soit, lorsque $\beta \rightarrow 0$, à une équation monoexponentielle,

$$(2) \ln(S) - \ln(S_0) = -\alpha \cdot D \quad D_{37} = 1/\alpha$$

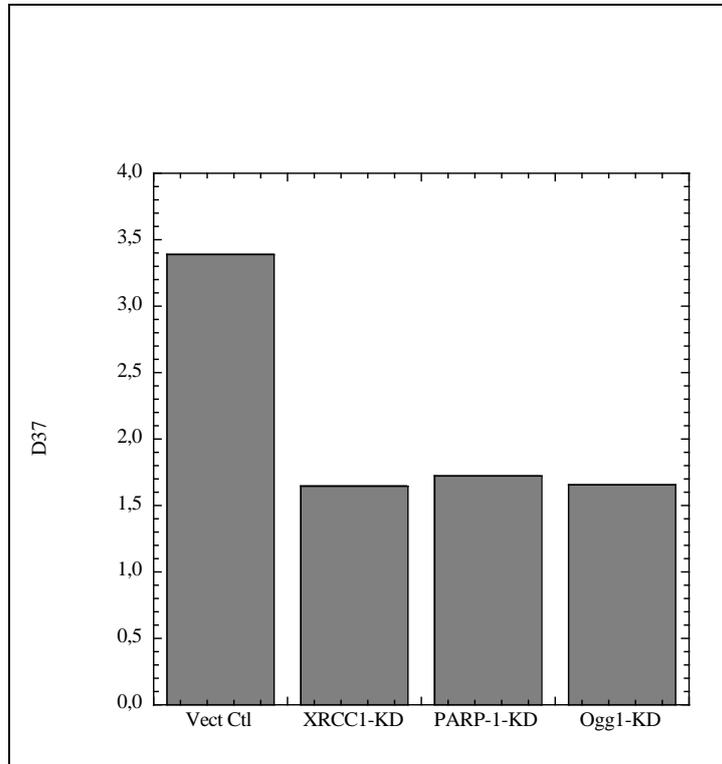


Fig. 40. D_{37} des lignées *HeLa* vecteur control, *XRCC1-KD*, *PARP-1-KD* et *Ogg1-KD* calculée après irradiation gamma.

Les trois lignées déficientes dans la voie de réparation du BER/SSBR sont plus radiosensibles que la lignée contrôle et présentent sensiblement la même sensibilité au rayonnement γ du ^{137}Cs (Fig. 40).

Par la suite, nous avons comparé la survie cellulaire de ces clones après une irradiation protons aux trois positions du SOBP pour les faisceaux de 76 et 201 MeV comparée à celle obtenue au même débit de dose sous irradiation γ (^{137}Cs).

La Fig. 41 présente les SF3 des 4 clones étudiés pour le faisceau de 76 MeV (a) et celui de 201 MeV (b) comparés aux rayons gamma.

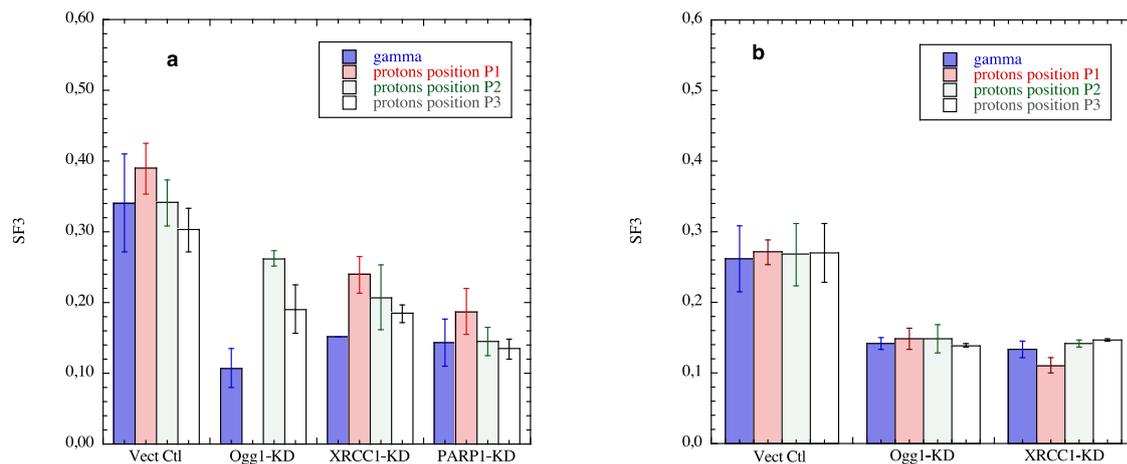


Fig. 41. SF3 des lignées HeLa vecteur control ($n=9$), XRCCI-KD ($n=2$), PARP-1-KD ($n=2$) et Ogg1-KD ($n=2$) après irradiation aux trois positions du SOBP pour (a) le faisceau de 76 MeV et (b) de 201 MeV comparés aux rayons gamma.

Pour le faisceau de 201 MeV (Fig. 41b), la radiosensibilité des cellules Contrôle, Ogg1-KD et XRCCI-KD n'est pas modifiée par rapport aux rayons gamma et ne change pas en fonction de la profondeur dans le SOBP. En revanche, pour le faisceau de 76 MeV (Fig. 41a), l'EBR estimée par la SF3 et la SF2 (données non présentées) varie au sein du SOBP et augmente en fonction de la profondeur ($P3 > P2 > P1$). L'effet est moins marqué dans deux des trois clones défectifs pour les voies de réparation du SSBR/BER que dans la lignée contrôle. L'effet est plus marqué pour la lignée Ogg1-KD.

(v) Etude de la survie cellulaire des lignées déficientes pour le NHEJ

Nous avons comparé les survies cellulaires de deux clones déficients pour les voies de réparation du NHEJ (DNA-PKcs-KD et XRCCI4-KD) et d'un clone déficient dans les voies de signalisation des cassures de l'ADN et des points de contrôle du cycle cellulaire (ATM-KD). Dans un premier temps nous avons déterminé la radiosensibilité aux rayons gamma de ces clones. La Figure 42a présente les survies clonogéniques de ces cellules après irradiation gamma et la Figure 42b les D_{37} calculées à partir de ces courbes.

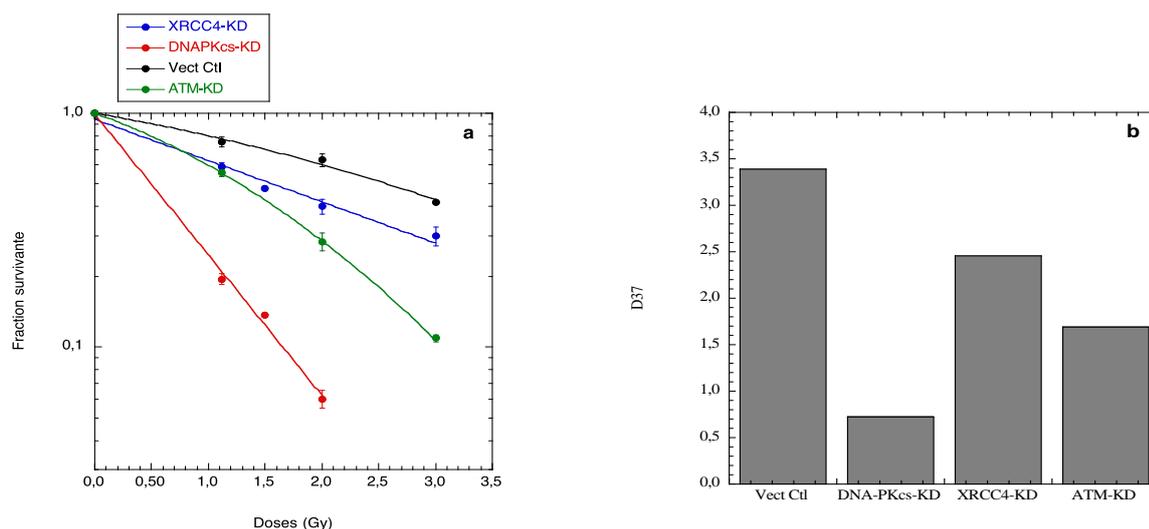


Fig. 42 : Radiosensibilité des lignées HeLa Contrôle, XRCC4-KD, DNA-PKcs-KD et ATM-KD après irradiation gamma. a) courbes de survie clonogénique, b) D_{37} .

Comme attendu, on observe une radiosensibilité très marquée de la lignée déficiente pour DNA-PKcs. La radiosensibilité de la lignée déficiente pour XRCC4 est en accord avec les données précédemment publiées sur ce clone [55]. La lignée déficiente pour ATM présente une radiosensibilité intermédiaire, plus marquée à partir de 2 Gy.

Supposant que les faisceaux de protons induisent des lésions complexes dans les cellules irradiées, nous nous sommes intéressés à la protéine Artemis qui interviendrait dans les mécanismes de réparation de ces lésions [118]. Pour cela, nous avons demandé à D. Biard de créer une lignée HeLa déficiente pour Artemis. Deux clones Artemis-KD ont été sélectionnés : les clones Artemis-KD 1514/3 et Artemis-KD 1514/12. Nous avons comparé la radiosensibilité aux rayons gamma de ces deux clones (Fig. 43).

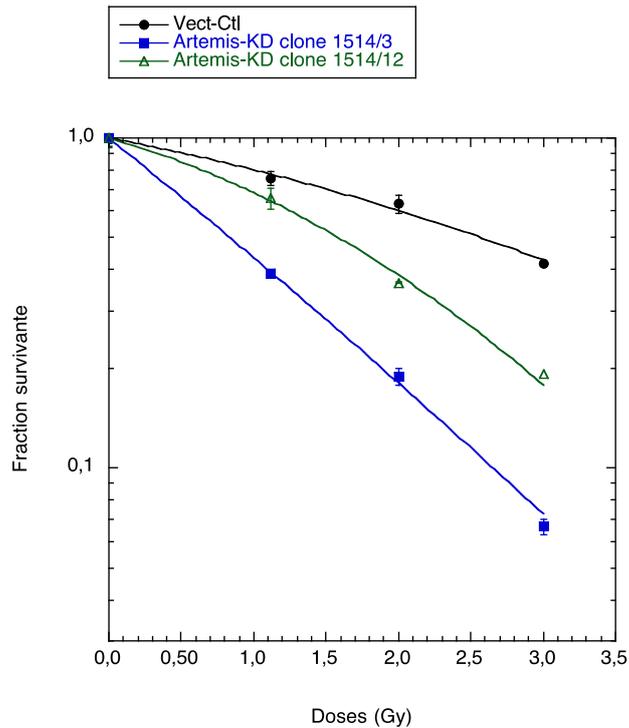


Fig. 43 : Courbes de survie des lignées HeLa Contrôle, Artemis-KD clone 1514/3 et Artemis-KD clone 1514/12 sous irradiation gamma.

Les deux clones issus de la lignée déficiente pour Artemis sont radiosensibles. La radiosensibilité est cependant plus marquée pour le clone Artemis-KD 1514/3.

Le niveau d'expression de la protéine Artemis a été déterminé par Western blot (Figure 44).

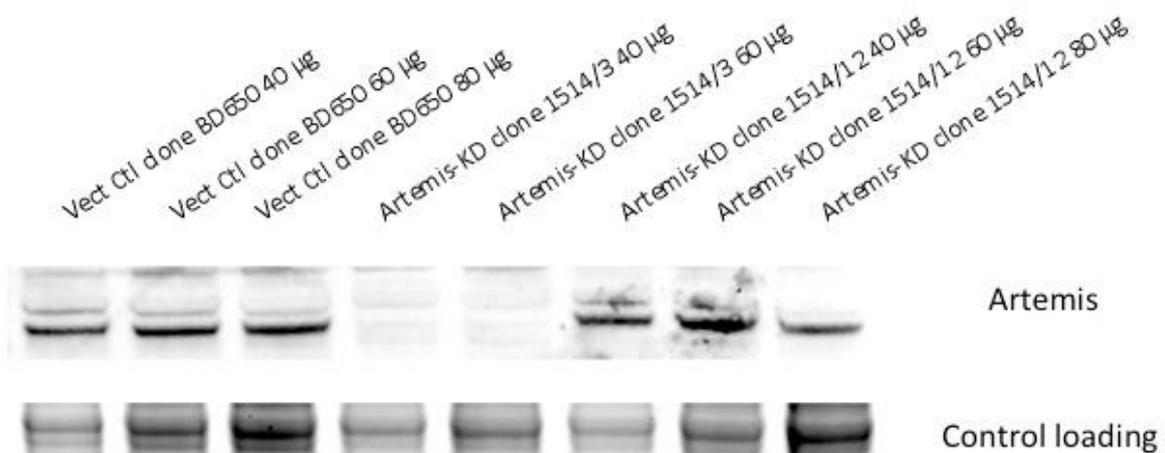


Fig. 44 : Détermination par Western blot du niveau d'expression de la protéine Artemis dans les deux clones déficients.

L'expression de la protéine Artemis est pratiquement nulle dans le clone 1514/3 alors qu'un niveau résiduel persiste dans le clone 1514/12. Ce différentiel d'expression de la protéine Artemis est vraisemblablement à l'origine de la différence de radiosensibilité observée entre les deux clones (Fig. 43).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons cultivé le clone 1514/3 pendant 8 jours en absence d'hygromycine B dans le milieu de culture. On montre alors que la réversion de ce clone restaure une radiosensibilité identique à celle de la lignée Contrôle (figure 45).

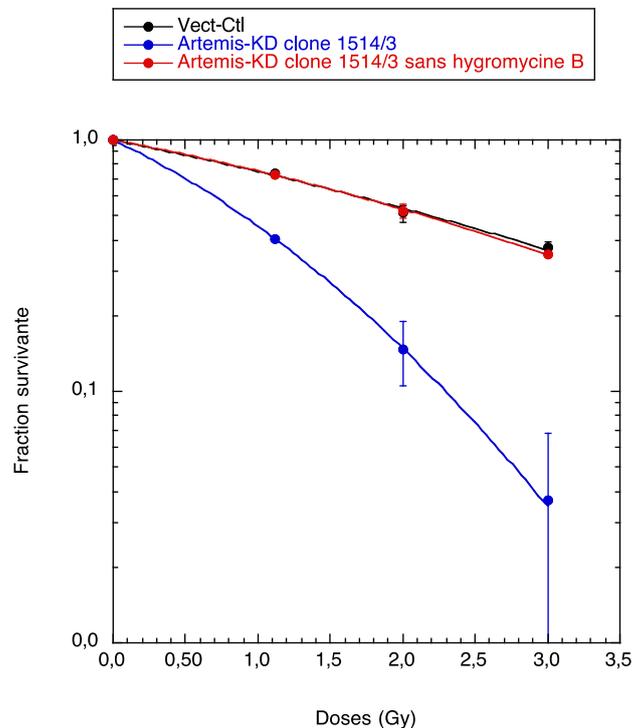


Fig. 45 : Courbes de survie de la lignée Artemis-KD clone 1514/3 cultivée avec et sans hygromycine B comparée à la lignée Contrôle après irradiation gamma.

Par la suite, nous avons comparé la survie cellulaire de ces clones exposés à une irradiation par les protons aux trois positions du SOBP pour les faisceaux de 76 et 201 MeV comparée à celle obtenue au même débit de dose sous irradiation γ (^{137}Cs).

La Fig. 46 présente les SF3 des 5 clones étudiés pour le faisceau de 76 MeV (a) et celui de 201 MeV (b) comparés aux rayons gamma.

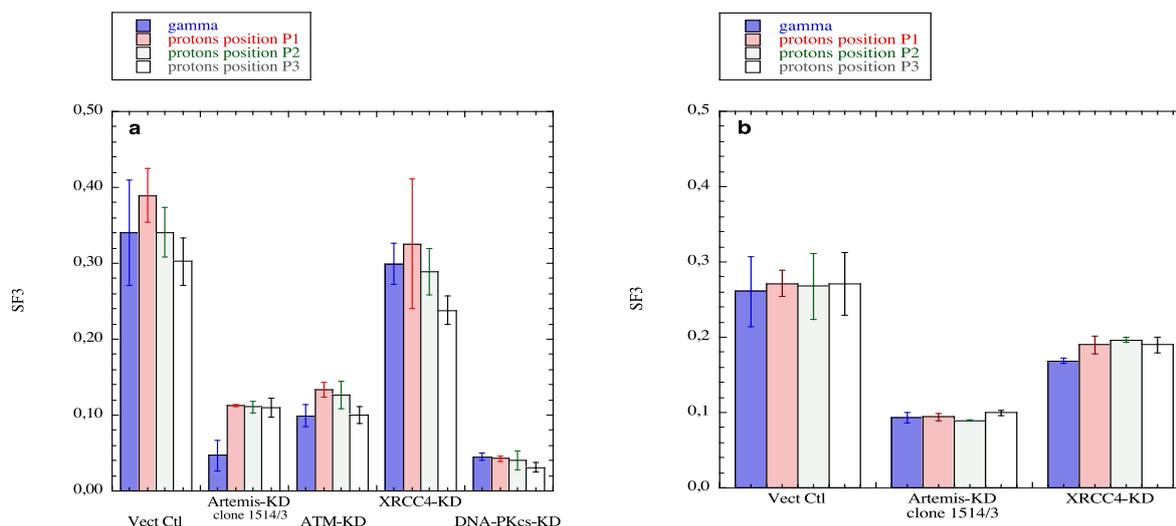


Fig. 46. SF3 des lignées HeLa Contrôle ($n=9$), Artemis-KD clone 1514/3 ($n=2$), ATM-KD ($n=2$), XRCC4-KD ($n=2$) et DNA-PKcs-KD ($n=2$) irradiés aux trois positions du SOBP des faisceaux de 76 MeV(a) et 201 MeV (b) comparés aux rayons gamma.

Pour le faisceau de 201 MeV (Fig. 46b), la radiosensibilité des cellules Contrôle, Artemis-KD et XRCC4-KD n'est pas modifiée par rapport aux rayons gamma et ne change pas en fonction de la profondeur dans le SOBP. Pour le faisceau de 76 MeV (Fig. 46a), l'EBR des lignées Contrôle, ATM-KD, XRCC4-KD et DNA-PKcs-KD (dans une moindre mesure due à la forte radiosensibilité de cette lignée) varie au sein du SOBP et augmente en fonction de la profondeur ($P3 > P2 > P1$). En revanche, pour la lignée Artemis-KD, aucun changement dans l'EBR n'a été observé en fonction de la profondeur dans le SOBP lorsque ces cellules sont irradiées à 76 MeV ($n=2$). De plus, on peut remarquer que la radiosensibilité du clone 1514/3 est plus marquée lorsqu'elle est irradiée avec des rayons gamma au débit de dose de 7,77 Gy/min ($n=4$) (Fig. 46a et 47a et b). Cet effet n'est pas retrouvé lors de l'irradiation du clone Artemis-KD 1514/12 (Fig. 48).

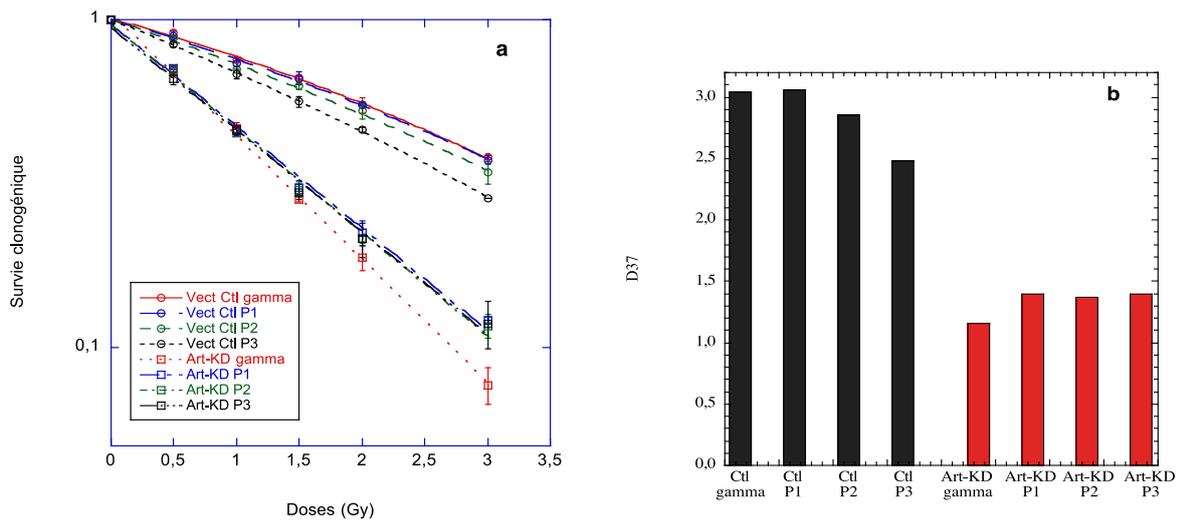


Fig. 47. a) Courbes de survie de la lignée Artemis-KD clone 1514/3 comparée à la lignée Contrôle après irradiation gamma et protons aux trois positions du SOBP pour le faisceau de 76 MeV. b) D_{37} calculées à partir de ces courbes de survie.

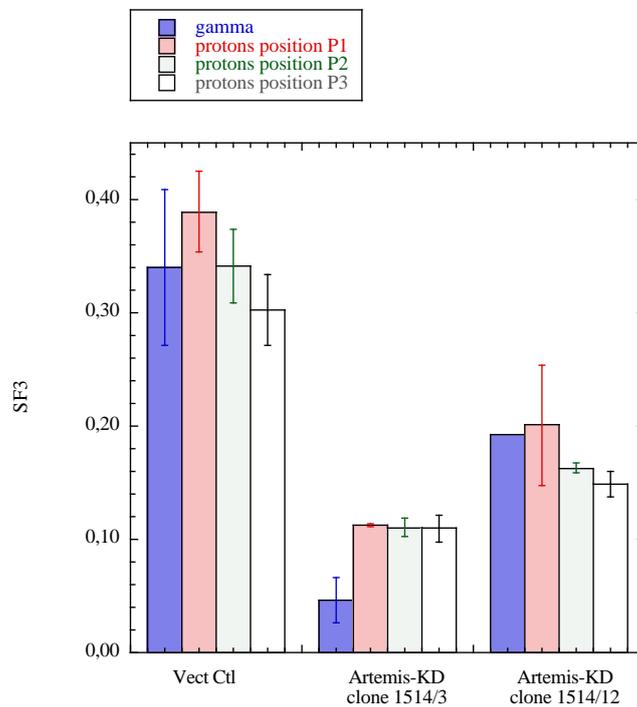


Fig. 48. SF3 des lignées HeLa Contrôle (n=9), Artemis-KD clone 1514/3 (n=2) et Artemis-KD clone 1514/12-KD (n=1) exposées aux protons aux trois positions du SOBP du faisceau de 76 MeV comparés aux rayons gamma.

Des trois lignées déficientes pour le NHEJ analysées seulement la lignée Artemis-KD ne montre pas d'augmentation de la radiosensibilité avec la profondeur dans le SOBP du

faisceau de 76 MeV. Cette observation suggère que cette lignée n'est pas capable de prendre en charge un sous-type de dommage spécifique des rayonnements de haut TEL dont la proportion augmente dans la partie distale du SOBP.

(vi) Etude des foci de pATM, γ H2AX et pArtemis par immunofluorescence

La détection des CDB arme une cascade de signalisation qui se traduit par la phosphorylation d'un ensemble de protéines dont les plus typiques sont ATM et H2AX. Les formes phosphorylées de ces protéines s'agrègent en *foci* détectables par immunofluorescence et dont les cinétiques de formation et de déclin dépendent de la structure des lésions de l'ADN [45]. Selon la plupart des auteurs, le temps optimum pour la formation des *foci* s'établit à 30 min post-irradiation [45,97,109]. Ce temps, compatible avec le temps de transit entre le ICPO et le laboratoire, a été retenu pour l'analyse.

Nous avons repris pour l'expérience la lignée SQ20B utilisée dans la première étude. Les cellules ont été exposées à une dose unique de 3 Gy dans les trois positions du SOBP des faisceaux de protons de 76 MeV et de 201 MeV (voir chapitre 3.3.2, Fig. 23) et comparées à celles exposées à la même dose de photons γ du ^{137}Cs . Les *foci* de trois protéines effectrices de la réparation des CDB par suture non-homologue, à savoir ATM, H2AX et Artemis, ont été titrés par immunofluorescence sur microscope confocal. La méthode utilisée a été décrite au chapitre 3.8.120 lamelles ont été analysées, à raison de 25 échantillons (noyaux) par lamelle, générant une base de 3000 fichiers vidéo. Après déconvolution, les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ 1.44p, Wayne Rasband – National Institutes of Health, USA à l'aide de deux macros élaborées par Fabrice Cordelières (Plateforme d'Imagerie, UMR3348 CNRS, Institut Curie) (Fig. 49) et qui feront l'objet d'une publication séparée.

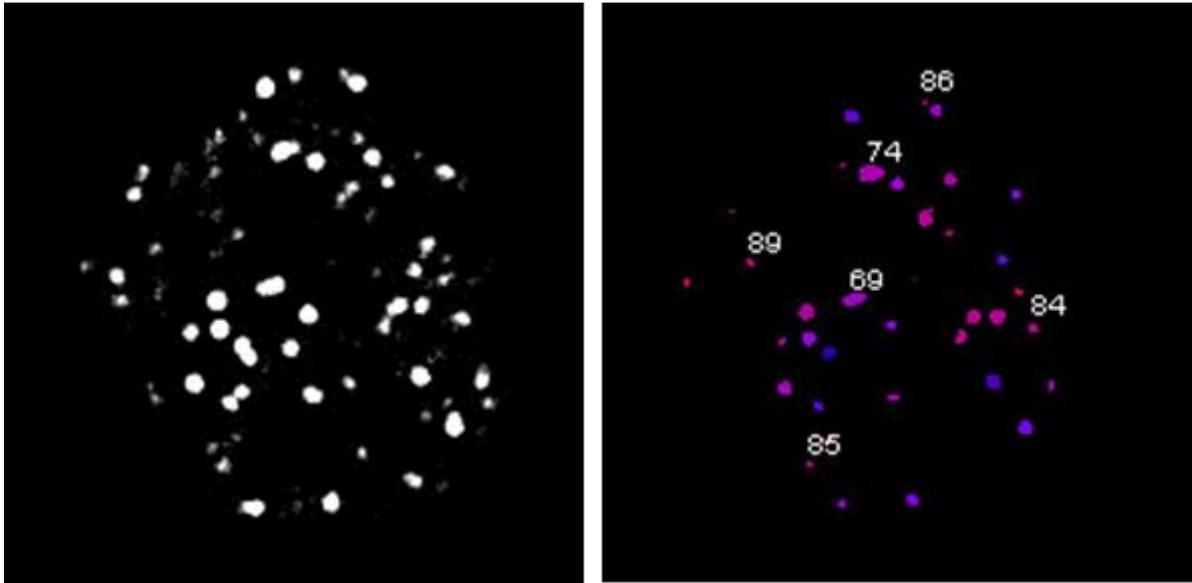


Fig. 49. Foci de pATM à 30 min post irradiation (3 Gy) au centre (position P2) du SOBP du faisceau de protons de 76 MeV (à gauche image déconvoluée, à droite après le traitement d'image avec ImageJ).

Les résultats sont différents selon que les cellules ont été irradiées dans le faisceau de 76 ou 201 MeV.

A 76 MeV, et pour les trois protéines d'intérêt (ATM, H2AX et Artemis), le nombre de *foci* est significativement plus important en P1 que dans la série exposée aux photons γ du ^{137}Cs . Il augmente encore de P1 à P2 mais baisse de manière très significative lorsqu'on passe de P2 à P3.

A 201 MeV, le nombre de *foci* suit la même évolution jusqu'à la position P2, mais continue à augmenter de P2 à P3 (Fig. 50).

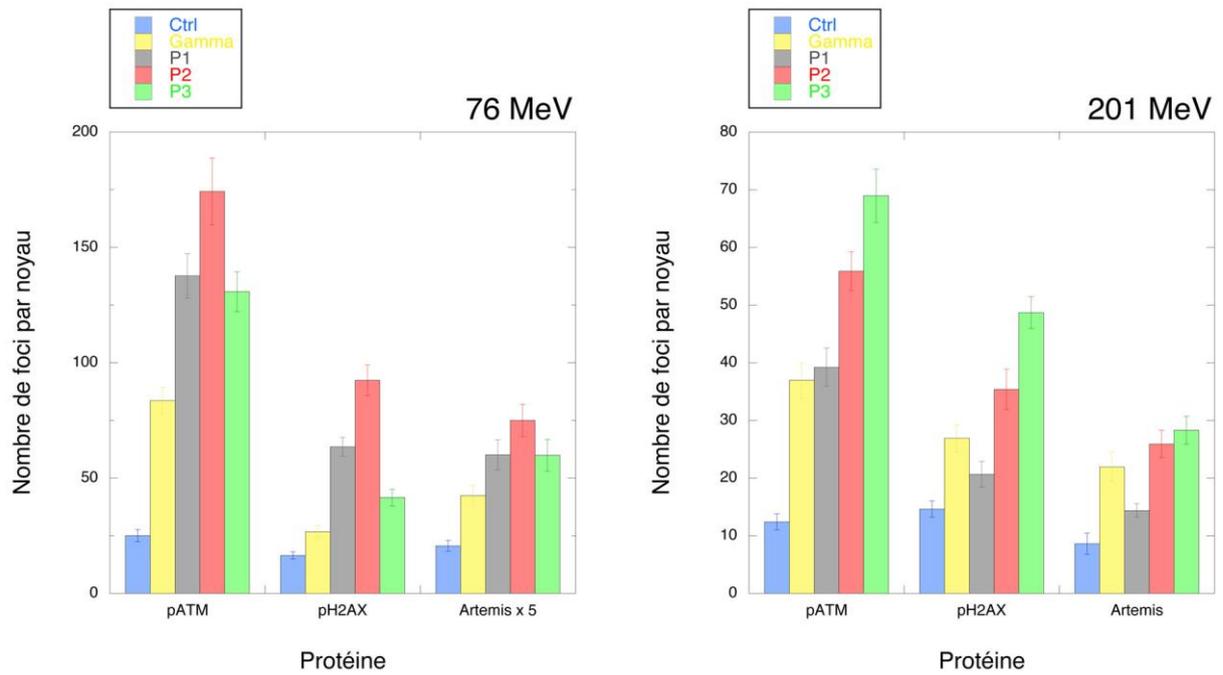


Fig. 50. Histogrammes montrant le nombre de foci par noyau des protéines pATM, γ H2AX et pArtemis à 30 min après exposition à 3 Gy de photons (^{137}Cs) ou de protons de 76 et 201 MeV aux positions P1, P2 ou P3. Les valeurs indiquent les moyennes \pm SEM.

Le volume des *foci* dépend peu de la protéine considérée, et ne présente pas de variations systématiques en fonction de la nature du rayonnement ou de la position dans le SOBP. On constate cependant, sans pouvoir y attribuer une signification, qu'ils sont plus volumineux à 76 qu'à 201 MeV (Fig. 51).

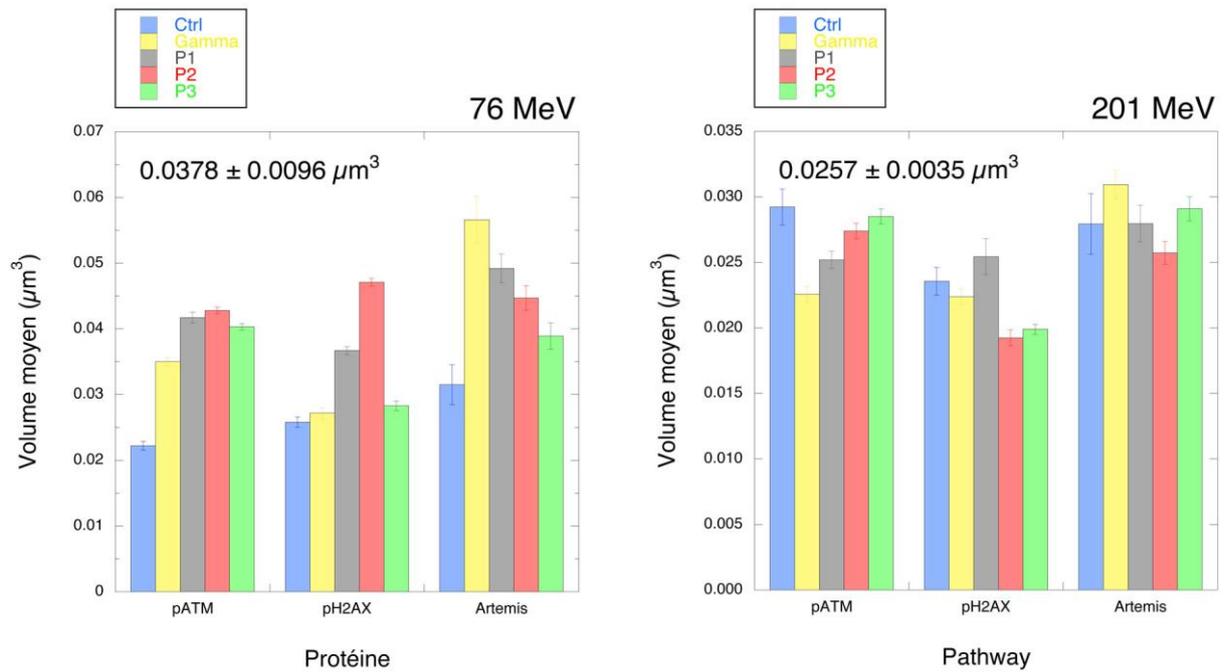


Fig. 51. Histogrammes montrant le volume des foci des protéines pATM, γ H2AX et pArtemis. Les conditions étaient les mêmes que dans la Fig. 50. Les valeurs indiquent les moyennes \pm SEM.

En complément, nous avons déterminé la persistance des *foci* de pATM, γ H2AX et Artemis 24 h après exposition aux protons de 76 MeV. On constate dans ces conditions une diminution d'un facteur 5 du nombre de *foci* de pATM et γ H2AX par rapport au temps 30 min post-irradiation, indiquant que la majorité des CDB a été réparée à 24 h. En revanche, le nombre de *foci* d'Artemis est plus élevé à 24 h qu'à 30 min (Fig. 52). Ce résultat, qui est à prendre avec beaucoup de précautions en raison des artefacts qui affectent assez systématiquement la mesure des *foci* d'Artemis, suggère un recrutement très tardif d'Artemis dans la réparation de dommages difficilement réparables. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que la digestion par Artemis des extrémités portant des lésions complexes peut occasionner une perte d'information génétique et donc représente un risque pour la cellule [131].

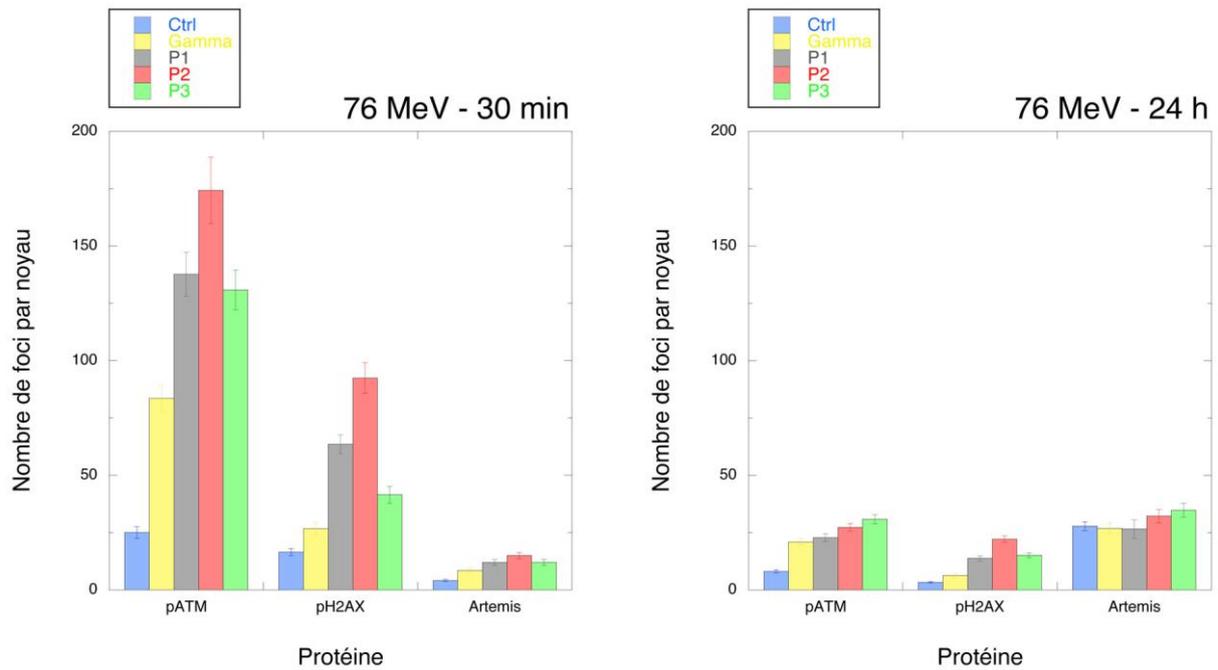


Fig. 52. Comparaison du nombre de foci d'ATM, H2AX et Artemis 30 min et 24 h post-irradiation.

4.2.3 Discussion 2^{ème} partie

Le concept de LMDS, issu de la microdosimétrie et basé sur les modèles microdosimétriques décrivant le dépôt d'énergie des électrons en fin de parcours, a été la principale hypothèse émergeant de la première partie de la thèse, concept qui expliquerait la différence entre la survie clonogénique et le nombre de CDB mesurées par électrophorèse en champs pulsés aux points distaux du SOBP des faisceaux de protons de 76 et 201 MeV de l'ICPO.

La seconde partie de mon travail visait l'analyse de la nature et des mécanismes de réparation des lésions radio-induites de l'ADN en fonction des caractéristiques physiques des rayonnements.

(i) Etude des CSB

La première approche a été la mesure de l'incidence des cassures simple-brin de l'ADN (CSB) en fonction du type de rayonnement (protons de 76 ou 201 MeV vs. photons de 662 keV du ^{137}Cs) et en fonction de la profondeur dans le SOBP. Deux méthodes ont été employées : la technique d'éluion alcaline sur filtre, et la méthode connue sous le nom de *Comet assay*.

Les résultats issus de la méthode *Comet assay* n'ont qu'une valeur indicative, à cause de différents aléas que nous avons précédemment mentionnés. Ils suggèrent que dans le cas

du faisceau de 201 MeV, et pour les deux lignées cellulaires utilisées (SQ20B et IMR90), l'incidence des dommages n'est pas significativement différente entre l'entrée et le milieu du SOBP d'une part, entre ces deux positions et les photons ^{137}Cs d'autre part. Le traitement de l'ADN des cellules irradiées par les glycosylases Fpg et Nth ne fait pas apparaître de différence majeure mais induit par lui-même une fragmentation importante de l'ADN. Le même phénomène avait été observé par électrophorèse en champs pulsés. Ces artefacts nous ont conduits à mettre en œuvre d'autres méthodes.

La technique d'éluion alcaline sur filtre, très fiable et bien maîtrisée au laboratoire, a été utilisée en deuxième intention. Les résultats ne montrent pas de différence entre l'irradiation gamma et les protons de 76 MeV à l'entrée du faisceau (position P1). En revanche, ils mettent en évidence une diminution de l'incidence des dommages alcali-labiles (cassures simple-brin + désoxyribose oxydé + bases oxydées) dans la profondeur du SOBP ($P1 > P2 > P3$). Nous verrons que cette observation concorde avec la méthode des *foci* (ci-dessous).

(ii) Analyse des mécanismes de réparation des lésions radio-induites par les protons

L'étude des voies de réparation impliquées dans la réponse aux protons a fait appel à deux méthodes : d'une part la survie au rayonnement de lignées cellulaires déficientes pour différentes voies de signalisation et de réparation des lésions de l'ADN, d'autre part la détermination par immunofluorescence du recrutement aux sites de dommages de trois protéines (ATM, H2AX, Artemis) effectrices de la réparation des CDB.

La comparaison des quatre lignées étudiées (XRCC1-KD, Ogg1-KD, Artemis-KD et XRCC4-KD) irradiées au rayonnement gamma du ^{137}Cs et aux protons de 201 MeV dans les trois positions du SOBP montre que la délétion des protéines impliquées dans les différentes voies de réparation produit un effet radiosensibilisateur par rapport à la lignée Contrôle, mais que les paramètres de radiosensibilité ne changent pas en fonction des différentes conditions.

Les lignées déficientes dans la voie de réparation par excision de bases (BER) à savoir Ogg1-KD, PARP-1-KD et XRCC1-KD présentent toutes, d'une part une hyper-radiosensibilité au rayonnement, et d'autre part une diminution significative des paramètres SF3 et SF2 (données non présentées) en fonction de la profondeur dans le SOBP du faisceau de 76 MeV. Même en absence de ces protéines, on observe une augmentation de la mortalité cellulaire en position P3, alors que les résultats d'éluion alcaline ont montré une diminution très nette de l'incidence des cassures simple-brin à cette position.

Les lignées déficientes dans la voie de réparation par suture non homologue (NHEJ), à savoir XRCC4-KD, DNA-PKcs-KD et dans une moindre mesure ATM-KD, présentent toutes, d'une part une hyper-radiosensibilité au rayonnement comme attendu, et d'autre part une diminution significative des paramètres SF3 et SF2 (données non présentées) en fonction de la profondeur dans le SOBP du faisceau de 76 MeV. Même en absence de ces protéines, on observe une augmentation de la mortalité cellulaire en position P3.

Seule la lignée déficiente pour la protéine Artemis présente un phénotype différent des autres lignées étudiées.

Nous avons caractérisé dans un premier temps cette lignée et pu montrer que le clone Artemis-KD 1514/3 présente une radiosensibilité marquée due à l'extinction de la protéine d'intérêt. Ces données sont en accord avec celles publiées récemment où la transfection d'un mutant dominant négatif de la protéine Artemis dans les cellules HeLa induit un effet radiosensibilisateur [115]. Nous avons pu montrer également que, à dose égale, la radiosensibilité des cellules Artemis-KD irradiées par les rayons gamma augmente avec le débit de dose (7,77 Gy/min vs 2,6 Gy/min). Cet effet est absent lorsque ces cellules sont irradiées en protons.

En revanche, aucun changement dans l'EBR n'a été observé en fonction de la profondeur dans le SOBP lorsque les cellules Artemis-KD sont irradiées à 76 MeV.

La protéine Artemis est impliquée dans le processus de recombinaison V(D)J et est responsable d'un syndrome d'immunodéficience sévère [133]. Artemis a une activité nucléasique indispensable à la résection des structures intermédiaires secondaires lors de la recombinaison par V(D)J. Elle interviendrait d'une part lors de la réparation par NHEJ [118,161], et d'autre part serait impliquée dans les processus de remodelage de la chromatine, l'expression de p53 et la réponse au stress oxydatif [49,70,206,210]. Son activation est précédée d'une hyperphosphorylation, assurée soit par la protéine kinase ATM [158], soit par la protéine kinase DNA-PKcs [56]. ATM régulerait la protéine Artemis au cours du remodelage de la chromatine ou dans le contrôle du cycle cellulaire, et induirait son association avec la protéine Nbs1 au cours de la réparation des lésions induit par l'irradiation [37]. La protéine DNA-PKcs interviendrait lors de la réparation par NHEJ ainsi que lors de la réparation des lésions complexes de l'ADN, et régulerait la fonction endonucléase d'Artemis [76].

En définitive, seule des trois lignées déficientes analysées la lignée Artemis-KD ne montre pas d'augmentation de la radiosensibilité avec la profondeur dans le SOBP du faisceau de 76 MeV. Cette observation indique que cette lignée n'est pas capable de prendre en charge un sous-type de dommage spécifique des rayonnements de haut TEL dont la proportion augmente dans la partie distale du SOBP. Etant donné que l'augmentation de la mortalité cellulaire ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'incidence des cassures simple-brin et double-brin, ni du nombre de foyers de réparation à 30 min, nos résultats suggèrent que les dommages spécifiques des protons dans la partie distale du SOBP de 76 MeV appartiennent à la classe des LMDS, et que la voie de réparation D-NHEJ *via* la protéine Artemis est la voie de prédilection pour la réparation de ces dommages.

(iii) Interprétation en termes de microdosimétrie

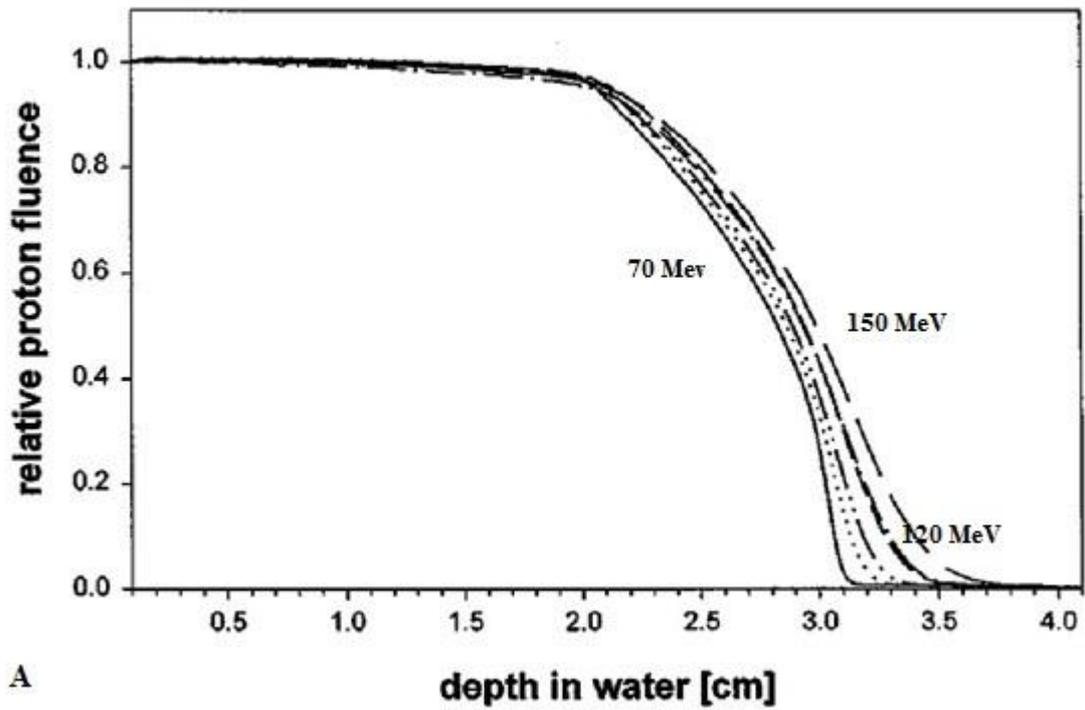
La microdosimétrie prévoit que la fréquence des LMDS augmente avec le TEL du rayonnement incident [72,135] (voir également Article). Cependant, le taux de dommages complexes est probablement trop faible pour qu'il soit possible de les mettre en évidence par

une analyse directe [27], de sorte que leur caractérisation est nécessairement indirecte (survie, aberrations chromosomiques). Les résultats obtenus avec les mutants et les *foci* des effecteurs du D-NHEJ suggèrent la possibilité d'une nouvelle approche.

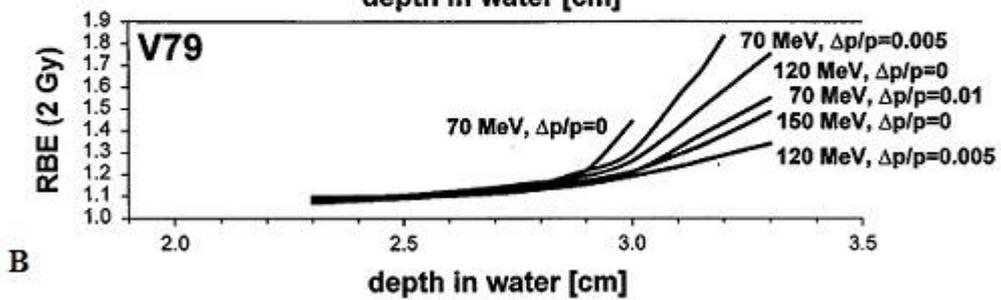
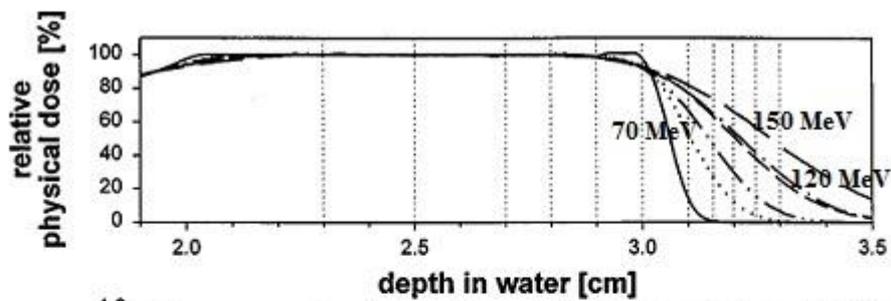
Les facteurs liés à la microdosimétrie doivent à ce stade être pris en considération. On sait que le pic de Bragg étant très étroit, il est nécessaire de l'élargir afin d'irradier la masse tumorale dans toute son épaisseur axiale. Le pic de Bragg élargi ou "modulé" est obtenu par la superposition de pics de Bragg associées à des protons de différentes énergies. Techniquement, pour créer le SOBP des différents faisceaux de protons afin de sculpter le faisceau à la forme et à la profondeur de la tumeur plusieurs dispositifs sont placés le long de celui-ci (Fig. 23). Les caractéristiques physiques de chaque dispositif et l'architecture de chaque ligne de faisceau peuvent avoir aussi une influence importante sur le TEL et donc les paramètres radiobiologiques des faisceaux de protons.

Paganetti et Goiten [150] avaient montré par calcul Monte-Carlo utilisant un code GEANT/FLUKA, que l'EBR peut varier selon la configuration de la ligne qui délivre le faisceau de protons, mais ils avaient considéré que cette influence est mineure. Néanmoins, pour les faibles doses et/ou pour les faibles énergies cette influence peut être significative et expliquer les différences d'EBR constatées dans la partie distale du SOBP. Dans ces situations, le modèle de conception de la ligne doit donc être pris en compte.

Par ailleurs, pour les faisceaux de protons de relativement basse énergie (70 MeV) en fin de SOBP, c'est à dire dans la zone où l'on peut prévoir une forte augmentation du TEL, et où nous avons montré une augmentation rapide de la valeur de l'EBR (voir Article), il se produit une chute rapide de la fluence des protons (Fig. 53 A). Pour les particules, la fluence est définie comme le nombre total de particules qui traverse une unité de surface dans un intervalle de temps spécifique (nombre de particules par mètre carré).



A



B

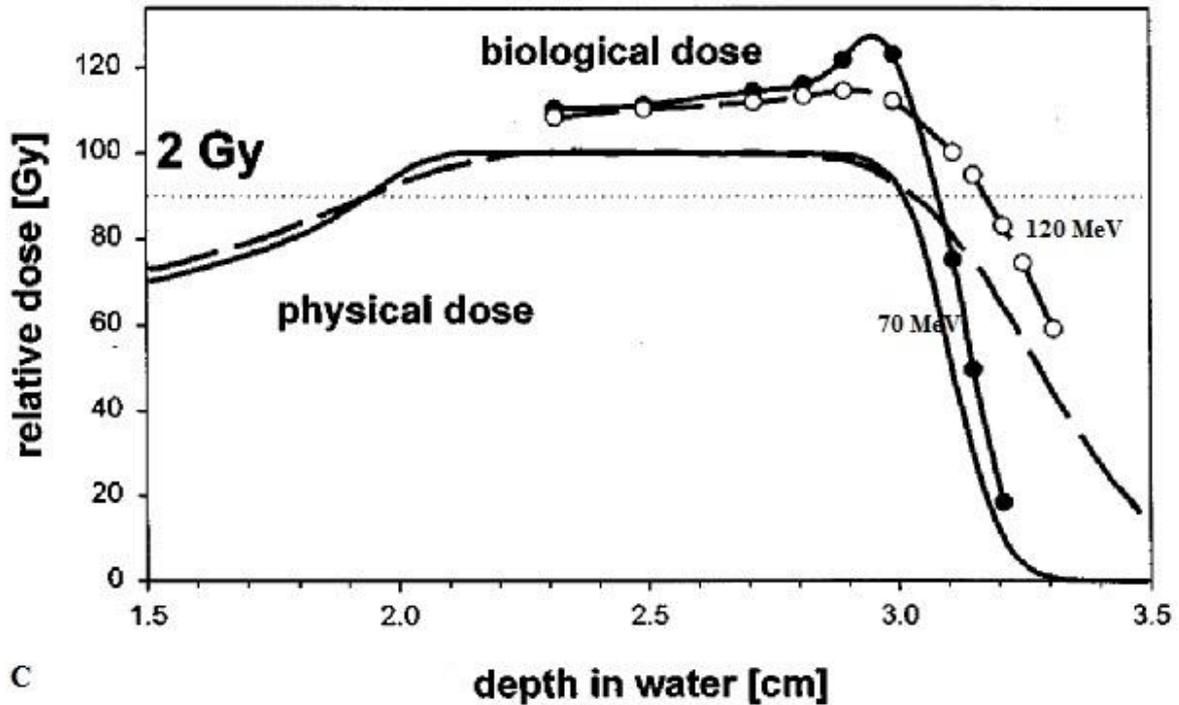


Fig. 53. Relation entre l'EBR, la dose physique et la fluence dans le SOBP des faisceaux de protons (d'après Paganetti et Goiten [150]). A : Fluence calculée pour plusieurs lignes de protons d'énergies différentes (de 70 à 150 MeV) pour la même taille de l'SOBP. B et C : Plateau de Bragg modulé (SOBP) des faisceaux, et les valeurs de l'EBR calculées en fonction de l'inactivation de cellules V79 après exposition à 2 Gy à différentes profondeurs du SOBP.

La fluence diminue plus vite à la fin du SOBP pour le faisceau de protons de 76 MeV que pour le faisceau de 201 MeV. Or, la probabilité pour que les électrons générés dans les traces des protons interagissent avec l'ADN cellulaire, est en première approximation proportionnelle à la fluence. Nos résultats montrent clairement une baisse significative du nombre de *foci* de trois protéines effectrices de la réparation des CDB par suture non-homologue, à savoir ATM, H2AX et Artemis, 30 min après l'exposition à 3 Gy en P3 pour le faisceau de 76 MeV, mais simultanément une augmentation pour le faisceau de 201 MeV. Les résultats de l'éluion alcaline sur filtre montrent pour leur part une différence significative de l'incidence des dommages alcali-labiles (cassures simple-brin + désoxyribose oxydé + bases oxydées) dans la profondeur du SOBP de 76 MeV ($P1 > P2 > P3$). En revanche, on ne trouve pas de différence significative du nombre de CDB pour les deux faisceaux de protons de 76 MeV et de 201 MeV en fonction de la position dans le SOBP (voir Fig. 4 de l'article), bien qu'on puisse noter une tendance qui va dans le même sens que la variation du nombre de *foci*. Par ailleurs, l'EBR pour la létalité augmente avec la profondeur dans le SOBP de 76 MeV, mais pas dans celui de 201 MeV (voir Fig. 3 de l'article).

L'ensemble de ces résultats suggère que les lésions de l'ADN induites en fin parcours du SOBP de 76 MeV sont moins nombreuses à dose déposée constante mais que leur létalité intrinsèque est plus élevée. Cette observation conforte indirectement le concept de *dommages multiples localisés* de l'ADN (LMDS)[18] (voir également ci-dessus). Nous pensons que la différence entre les deux faisceaux de 76 et 201 MeV en position distale s'explique par la différence de TEL d'une part, de fluence d'autre part, les deux paramètres dépendant de la manière dont sont construits les SOBP des deux faisceaux (Fig. 23).

Nous suggérons en conséquence que pour le calcul de la dose biologique équivalente dans un volume de traitement donné, il faut connaître non seulement la valeur attendue de l'EBR pour les points distaux du SOBP, mais également celle de la fluence particulière de la ligne de faisceau utilisé, ce qui dépend de la manière dont il est construit.

5. CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES

L'exposition de la population aux irradiations médicales, à la fois pour des raisons diagnostiques et thérapeutiques, augmente partout dans le monde. Dans les pays développés, environ 50 % de l'ensemble des patients atteints d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie à visée curative ou palliative.

Différents types de rayonnement sont utilisés dans les traitements, dont les protons de haute énergie. Dans la pratique clinique, les différents centres de protonthérapie à travers le monde utilisent pour les plans de traitement une valeur d'EBR générique estimée à 1,10 - c'est à dire 10% supérieure à celle des photons du Cobalt-60. Cette valeur a été déterminée par mesure de la régénération des cryptes intestinales chez la souris après exposition à une dose unique de l'ordre de 15 Gy [81]. Notre opinion, qui a motivé toute l'étude décrite dans cette thèse, est que cette méthode est contestable en raison du modèle et de la non-linéarité de la réponse biologique en fonction de la dose. Elle n'est, d'autre part, pas en mesure d'apporter la moindre information sur les mécanismes sous-jacents à la réponse aux hauts TEL.

Nos résultats ont fait apparaître une différence de la valeur de l'EBR relative à la survie au rayonnement dans la partie distale du SOBP en fonction de l'énergie incidente, ainsi qu'une absence de corrélation biunivoque entre l'EBR pour la survie et l'incidence globale des cassures double-brin de l'ADN mesurée par électrophorèse en champs pulsés. Ces observations, inattendues, posaient la question de la nature des lésions létales de l'ADN. Dans la seconde partie de notre travail, nous avons montré, grâce à l'utilisation de lignées déficientes dans les voies de détection et de réparation des cassures double-brin de l'ADN par le D-NHEJ, que ces voies déterminent la réponse aux protons. Plus spécifiquement, comme nous l'avons discuté au chapitre 4.2.3 – (ii), la nucléase Artemis paraît déterminer la réponse aux dommages spécifiquement créés dans la partie distale du faisceau de 76 MeV, suggérant que ces dommages appartiennent à la classe des “lésions complexes” (LMDS) de l'ADN. Ce point appelle une investigation approfondie à la lumière de ce qui est connu du mode d'action d'Artemis, et encourage à explorer d'autres voies de réparation par la même technique “knock-down” que celle que nous avons utilisée.

La baisse significative du nombre de foci d'ATM, H2AX et Artemis à 30 min post-irradiation en position distale du faisceau de 76 MeV - phénomène qui n'est pas observé dans le faisceau de 201 MeV - peut paraître de prime abord totalement incohérente avec les données de survie. Nous postulons que cet effet est lié à la baisse très importante de la fluence particulaire à la position considérée (Fig. 53a). Si le nombre de traces dans le noyau des cellules cibles baisse fortement avec la fluence particulaire, il faut alors considérer que le pouvoir létal intrinsèque des dommages créé par chaque particule augmente très fortement, bien au-delà de la valeur de l'EBR moyenne déterminée par la survie au rayonnement et qui se réfère à la dose absorbée.

Cinq axes de recherche peuvent être proposés pour tenter, d'une part d'apporter une réponse aux problèmes fondamentaux soulevés par ces observations, d'autre part de porter jusqu'à la planification des traitements les conséquences prévisibles.

(i) Les logiciels de dosimétrie utilisés pour la planification des traitements par les protons ne tiennent compte que de la dose physique moyenne, corrigée d'une EBR générique de 1,10. Un de nos objectifs est d'intégrer nos observations aux calculs de microdosimétrie en vue de corrélérer la dosimétrie physique et la dosimétrie biologique. Cette démarche a été entreprise par *Grassberger et al.* [73] en proposant une modulation du faisceau en fonction du TEL qui pourrait conduire à aménager le profil du SOBP, en particulier dans la partie distale du faisceau et d'anticiper ainsi les effets liés au changement des méthodologies de construction des faisceaux (*pencil beam protontherapy*). Les équipes du *GSI Helmholtz Centre for Heavy Ion Research GmbH* de Darmstadt et du *Heidelberg Ion Therapy Center (HIT)* [204] utilisent déjà en routine pour les calculs dosimétriques des traitements par ions carbone un logiciel LEM (*Local Effect Model*) qui tient compte de l'EBR moyenne dans les calculs de distribution de dose [57]. Cependant, la démarche qui consiste à tenir compte de la fluence reste à engager à la suite de *Paganetti et al.* [150] et de nos travaux. Les approches expérimentales que nous avons testées (*foci*, mutants) peuvent permettre de valider ces calculs sur une base expérimentale.

(ii) Mesurer l'EBR relative à la particule isolée en fonction de la profondeur dans le SOBP pour établir une relation tenant compte de la fluence. La technique d'immunofluorescence que nous avons utilisée est applicable à cette fin, à condition de réduire la dose jusqu'à obtenir en moyenne une seule trace par noyau dans les régions de plus faible fluence. Nous envisageons également de développer un modèle H2AX-GFP pour suivre les cinétiques de formation et déclin des foci de γ H2AX (time-lapse).

(iii) Poursuivre l'étude de lignées défectives dans d'autres voies de réparation ou de remodelage de la chromatine que celles que nous avons testées, en vue d'identifier une voie spécifique des lésions caractéristiques des protons de haut TEL.

(iv) Prévoir une étude cytogénétique pour tenter d'établir une corrélation entre l'incidence des lésions de l'ADN, la létalité et les aberrations chromosomiques instables en fonction de la nature du rayonnement, de l'énergie et de la position des cellules dans le SOBP. En effet, l'instabilité génomique (chromosomique) est considérée comme un bon marqueur du potentiel carcinogène des radiations ionisantes [86,114]. Elle se traduit par des réarrangements chromosomiques qui peuvent aboutir à l'amplification de gènes et à une instabilité des mini-satellites. Nous projetons d'analyser dans une première phase les remaniements précoces sur des lymphocytes humains normaux (micronoyaux, échange de chromatides sœurs, aberrations d'échange létales) à la première mitose post-irradiation.

(v) Poursuivre, en y introduisant les données de microdosimétrie évoquées ci-dessus, l'étude de la carcinogenèse radio-induite par différentes sources de rayonnements, dont les protons, réalisée par Frédéric Pouzoulet (Inserm U612) en collaboration avec l'UPRES EA 27-10 (Institut Gustave Roussy, Villejuif) sur un modèle de souris Balb/C p53+/- [132].

L'ensemble de ce projet devrait permettre de poser de nouveaux jalons pour une étude de la radiosensibilité interindividuelle et de sa variabilité en fonction de la qualité du rayonnement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S.Z. Aghamohammadi, D.T. Goodhead, J.R. Savage, Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in G0 lymphocytes by plutonium-238 alpha-particles, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53 (6) (1988) 909-915.
- [2] P. Ahnesorg, P. Smith, S.P. Jackson, XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining, *Cell* 124 (2) (2006) 301-313.
- [3] G. Ahnstrom, Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review, *Int J Radiat Biol* 54 (5) (1988) 695.
- [4] C. Alapetite, Individual radiosensitivity and DNA repair proficiency: the value of the comet assay, *Cancer Radiother* 2 (1998) 534-540.
- [5] Y. Andegeko, L. Moyal, L. Mittelman, I. Tsarfaty, Y. Shiloh, G. Rotman, Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks, *J Biol Chem* 276 (41) (2001) 38224-38230.
- [6] D. Anderson, T.W. Yu, D.B. McGregor, Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure, *Mutagenesis* 13 (6) (1998) 539-555.
- [7] M. Audebert, B. Salles, P. Calsou, Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining, *J Biol Chem* 279 (53) (2004) 55117-55126.
- [8] M. Audebert, B. Salles, M. Weinfeld, P. Calsou, Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway, *J Mol Biol* 356 (2) (2006) 257-265.
- [9] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, B. Cedervall, N. Chavaudra, G. Pantelias, C. Arlett, E.P. Malaise, Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines, *Radiat Res* 144 (1995) 26-35.
- [10] C.J. Bakkenist, M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature* 421 (6922) (2003) 499-506.
- [11] G.W. Barendsen, The relationships between RBE and LET for different types of lethal damage in mammalian cells: biophysical and molecular mechanisms, *Radiat Res* 139 (3) (1994) 257-270.
- [12] P. Barthez, Radiobiologie - Effets biologiques des radiations ionisantes, Cours D1 - ENVL - Radiologie - Imagerie, 2006.
- [13] H. Beamish, P. Kedar, H. Kaneko, P. Chen, T. Fukao, C. Peng, S. Beresten, N. Gueven, D. Purdie, S. Lees-Miller, N. Ellis, N. Kondo, M.F. Lavin, Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM, *J Biol Chem* 277 (34) (2002) 30515-30523.
- [14] M. Belli, A. Campa, I. Ermolli, A semi-empirical approach to the evaluation of the relative biological effectiveness of therapeutic proton beams: the methodological framework, *Radiat Res* 148 (6) (1997) 592-598.
- [15] C.R. Bertocini, R. Meneghini, DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini, *Nucleic Acids Res* 23 (15) (1995) 2995-3002.
- [16] D. Bettega, P. Calzolari, P. Chauvel, A. Courdi, J. Herault, N. Iborra, R. Marchesini, P. Massariello, G.L. Poli, L. Tallone, Radiobiological studies on the 65 MeV

- therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells, *Int J Radiat Biol* 76 (10) (2000) 1297-1303.
- [17] M. Beuve, G. Alphonse, M. Maalouf, A. Colliaux, P. Battiston-Montagne, P. Jalade, E. Balanzat, A. Demeyer, M. Bajard, C. Rodriguez-Lafrasse, Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71 (2) (2008) 635-642.
- [18] M. Biaggi, F. Ballarini, W. Burkard, E. Egger, A. Ferrari, A. Ottolenghi, Physical and biophysical characteristics of a fully modulated 72 MeV therapeutic proton beam: model predictions and experimental data, *Nuclear instruments and methods in physics research. Section B, Beam interactions with materials and atoms* 159 (1-2) (1999) 89-100.
- [19] D.S. Biard, Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones, *Nucleic Acids Res* 35 (11) (2007) 3535-3550.
- [20] D.S. Biard, E. Despras, A. Sarasin, J.F. Angulo, Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing, *Mol Cancer Res* 3 (9) (2005) 519-529.
- [21] D.S.F. Biard, Diplôme National d'Habilitation à Diriger des Recherches, Université Paris -Sud 11, 2008.
- [22] D. Blöcher, In CHEF electrophoresis a linear induction of dsb corresponds to a nonlinear fraction of extracted DNA with dose, *Int J Radiat Biol* 57 (1990) 7-12.
- [23] D. Blocher, M. Kunhi, DNA double-strand break analysis by CHEF (clamped homogeneous electrical field) electrophoresis, *Int J Radiat Biol* 58 (1) (1990) 23-34.
- [24] E. Blomquist, K.R. Russell, B. Stenerlow, A. Montelius, E. Grusell, J. Carlsson, Relative biological effectiveness of intermediate energy protons. Comparisons with ⁶⁰Co gamma-radiation using two cell lines, *Radiother Oncol* 28 (1) (1993) 44-51.
- [25] J.J. Boei, S. Vermeulen, L.H. Mullenders, A.T. Natarajan, Impact of radiation quality on the spectrum of induced chromosome exchange aberrations, *Int J Radiat Biol* 77 (8) (2001) 847-857.
- [26] C. Boskos, L. Feuvret, G. Noel, J.L. Habrand, P. Pommier, C. Alapetite, H. Mammar, R. Ferrand, G. Boisserie, J.J. Mazeron, Combined proton and photon conformal radiotherapy for intracranial atypical and malignant meningioma, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75 (2) (2009) 399-406.
- [27] D. Boucher, I. Testard, D. Averbek, Low levels of clustered oxidative DNA damage induced at low and high LET irradiation in mammalian cells, *Radiat Environ Biophys* 45 (4) (2006) 267-276.
- [28] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, L. Sanche, Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons, *Science* 287 (5458) (2000) 1658-1660.
- [29] A. Bouyon-Monteau, J.L. Habrand, J. Datchary, C. Alapetite, S. Bolle, R. Dendale, L. Feuvret, S. Helfre, V. Calugaru, J.M. Cosset, P. Bey, [Is proton beam therapy the future of radiotherapy? Part I: clinical aspects], *Cancer Radiother* 14 (8) (2010) 727-738.
- [30] W.H. Bragg, On the ionisation curves of radium, *Phil Mag A* (8) (1904) 726-738.

- [31] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *J Biol Chem* 276 (45) (2001) 42462-42467.
- [32] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, J.L. Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131 (1997) 1-87.
- [33] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.L. Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat Res* 531 (1-2) (2003) 5-23.
- [34] I. Callebaut, L. Malivert, A. Fischer, J.P. Mornon, P. Revy, J.P. de Villartay, Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1, *J Biol Chem* 281 (20) (2006) 13857-13860.
- [35] C.T. Carson, R.A. Schwartz, T.H. Stracker, C.E. Lilley, D.V. Lee, M.D. Weitzman, The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint, *Embo J* 22 (24) (2003) 6610-6620.
- [36] C.Z. Chen, J.C. Sutherland, Gel electrophoresis method for quantitation of gamma ray induced single- and double-strand breaks in DNA irradiated in vitro, *Electrophoresis* 10 (1989) 318-326.
- [37] L. Chen, T. Morio, Y. Minegishi, S. Nakada, M. Nagasawa, K. Komatsu, L. Chessa, A. Villa, D. Lecis, D. Delia, S. Mizutani, Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage, *Cancer Sci* 96 (2) (2005) 134-141.
- [38] N. Cheong, A.R. Perrault, H. Wang, P. Wachsberger, P. Mammen, I. Jackson, G. Iliakis, DNA-PK-independent rejoining of DNA double-strand breaks in human cell extracts in vitro, *Int J Radiat Biol* 75 (1) (1999) 67-81.
- [39] A. Chetioui, I. Despiney, L. Guiraud, L. Adoui, L. Sabatier, B. Dutrillaux, Possible role of inner-shell ionization phenomena in cell inactivation by heavy ions, *Int J Radiat Biol* 65 (5) (1994) 511-522.
- [40] M. Christmann, M.T. Tomicic, W.P. Roos, B. Kaina, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193 (1-2) (2003) 3-34.
- [41] H.H. Chun, R.A. Gatti, Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype, *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9) (2004) 1187-1196.
- [42] C.S. Chung, N. Keating, T. Yock, N. Tarbell, Comparative analysis of second malignancy risk in patients treated with proton therapy versus conventional photon therapy., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72 (Suppl. 1) (2008) S8, abstr. 17.
- [43] A. Collins, M. Dusinska, M. Franklin, M. Somorovska, H. Petrovska, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslova, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ Mol Mutagen* 30 (2) (1997) 139-146.
- [44] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol Biotechnol* 26 (3) (2004) 249-261.
- [45] S.V. Costes, A. Boissiere, S. Ravani, R. Romano, B. Parvin, M.H. Barcellos-Hoff, Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts, *Radiat Res* 165 (5) (2006) 505-515.
- [46] A. Courdi, N. Brassart, J. Herault, P. Chauvel, The depth-dependent radiation response of human melanoma cells exposed to 65 MeV protons, *Br J Radiol* 67 (800) (1994) 800-804.

- [47] G. Coutrakon, J. Cortese, A. Ghebremedhin, J. Hubbard, J. Johanning, P. Koss, G. Maudsley, C.R. Slater, C. Zuccarelli, Microdosimetry spectra of the Loma Linda proton beam and relative biological effectiveness comparisons, *Med Phys* 24 (9) (1997) 1499-1506.
- [48] D. D'Amours, S.P. Jackson, The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (5) (2002) 317-327.
- [49] F. Darroudi, W. Wiegant, M. Meijers, A.A. Friedl, M. van der Burg, J. Fomina, J.J. van Dongen, D.C. van Gent, M.Z. Zdzienicka, Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle, *Mutat Res* 615 (1-2) (2007) 111-124.
- [50] J. Debus, E.B. Hug, N.J. Liebsch, D. O'Farrel, D. Finkelstein, J. Efird, J.E. Munzenrider, Brainstem tolerance to conformal radiotherapy of skull base tumors, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39 (1997) 967-975.
- [51] T.F. DeLaney, H.M. Kooy (Eds.), *Proton and Charged Particle Radiotherapy*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008.
- [52] R. Dendale, L. Lumbroso-Le Rouic, G. Noel, L. Feuvret, C. Levy, S. Delacroix, A. Meyer, C. Nauraye, A. Mazal, H. Mammar, P. Garcia, F. D'Hermies, E. Frau, C. Plancher, B. Asselain, P. Schlienger, J.J. Mazon, L. Desjardins, Proton beam radiotherapy for uveal melanoma: results of Curie Institut-Orsay proton therapy center (ICPO), *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65 (3) (2006) 780-787.
- [53] P. Dent, A. Yacoub, J. Contessa, R. Caron, G. Amorino, K. Valerie, M.P. Hagan, S. Grant, R. Schmidt-Ullrich, Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways, *Radiat Res* 159 (3) (2003) 283-300.
- [54] A. Desai-Mehta, K.M. Cerosaletti, P. Concannon, Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization, *Mol Cell Biol* 21 (6) (2001) 2184-2191.
- [55] E. Despras, P. Pfeiffer, B. Salles, P. Calsou, S. Kuhfittig-Kulle, J.F. Angulo, D.S. Biard, Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair, *Cancer Res* 67 (6) (2007) 2526-2534.
- [56] J. Drouet, P. Frit, C. Delteil, J.P. de Villartay, B. Salles, P. Calsou, Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends, *J Biol Chem* 281 (38) (2006) 27784-27793.
- [57] T. Elsasser, M. Kramer, M. Scholz, Accuracy of the local effect model for the prediction of biologic effects of carbon ion beams in vitro and in vivo, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71 (3) (2008) 866-872.
- [58] M.D. Evans, M. Dizdaroglu, M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance, *Mutat Res* 567 (1) (2004) 1-61.
- [59] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res* 339 (1) (1995) 37-59.
- [60] E. Feldmann, V. Schmiemann, W. Goedecke, S. Reichenberger, P. Pfeiffer, DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining, *Nucleic Acids Res* 28 (13) (2000) 2585-2596.
- [61] J. Filipinski, K.W. Kohn, Ellipticine-induced protein-associated DNA breaks in isolated L1210 nuclei, *Biochim Biophys Acta* 698 (3) (1982) 280-286.

- [62] N. Foray, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Dose-rate effect on induction and repair rate of radiation-induced DNA double-strand breaks in a normal and an ataxia telangiectasia human fibroblast cell line, *Biochimie* 77 (11) (1995) 900-905.
- [63] N. Foray, A. Priestley, G. Alsbeih, C. Badie, E.P. Capulas, C.F. Arlett, E.P. Malaise, Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks, *Int J Radiat Biol* 72 (3) (1997) 271-283.
- [64] K.K. Fu, T.L. Phillips, D.C. Heilbron, G. Ross, L.J. Kane, Relative biological effectiveness of low- and high-LET radiotherapy beams for jejunal crypt cell survival at low doses per fraction, *Radiology* 132 (1) (1979) 205-209.
- [65] M. Fuss, E.B. Hug, R.A. Schaefer, M. Nevinny-Stickel, D.W. Miller, J.M. Slater, J.D. Slater, Proton radiation therapy (PRT) for pediatric optic pathway gliomas: comparison with 3D planned conventional photons and a standard photon technique, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (5) (1999) 1117-1126.
- [66] M. Gatei, D. Young, K.M. Cerosaletti, A. Desai-Mehta, K. Spring, S. Kozlov, M.F. Lavin, R.A. Gatti, P. Concannon, K. Khanna, ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure, *Nat Genet* 25 (1) (2000) 115-119.
- [67] M. Gatei, B.B. Zhou, K. Hobson, S. Scott, D. Young, K.K. Khanna, Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies, *J Biol Chem* 276 (20) (2001) 17276-17280.
- [68] L.E. Gerweck, S.V. Kozin, Relative biological effectiveness of proton beams in clinical therapy, *Radiother Oncol* 50 (2) (1999) 135-142.
- [69] C. Godon, Rôle de la poly(ADP-ribose) polymérase 1 dans la réponse aux radiations ionisantes dans la phase S du cycle cellulaire, PhD Thèse, ED Cancérologie Biologie-Médecine-Santé (ED 418), Paris XI, 2008.
- [70] A.A. Goodarzi, A.T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Lobrich, P.A. Jeggo, ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin, *Mol Cell* 31 (2) (2008) 167-177.
- [71] A.A. Goodarzi, Y. Yu, E. Riballo, P. Douglas, S.A. Walker, R. Ye, C. Harer, C. Marchetti, N. Morrice, P.A. Jeggo, S.P. Lees-Miller, DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity, *EMBO J* 25 (16) (2006) 3880-3889.
- [72] D.T. Goodhead, Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA, *Int J Radiat Biol* 65 (1) (1994) 7-17.
- [73] C. Grassberger, A. Trofimov, A. Lomax, H. Paganetti, Variations in linear energy transfer within clinical proton therapy fields and the potential for biological treatment planning, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80 (5) (2011) 1559-1566.
- [74] D.M. Green, E.D. D'Angio (Eds.), Effects on irradiation on skeletal growth and development., Wiley Liss Pub, New York, 1992.
- [75] C.S. Griffin, A.N. Harvey, J.R. Savage, Chromatid damage induced by ²³⁸Pu alpha-particles in G2 and S phase Chinese hamster V79 cells, *Int J Radiat Biol* 66 (1) (1994) 85-98.
- [76] J. Gu, S. Li, X. Zhang, L.C. Wang, D. Niewolik, K. Schwarz, R.J. Legerski, E. Zandi, M.R. Lieber, DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis, *DNA Repair (Amst)* 9 (4) (2010) 429-437.
- [77] J. Gueulette, L. Bohm, B.M. De Coster, S. Vynckier, M. Octave-Prignot, A.N. Schreuder, J.E. Symons, D.T. Jones, A. Wambersie, P. Scalliet, RBE variation as a

- function of depth in the 200-MeV proton beam produced at the National Accelerator Centre in Faure (South Africa), *Radiother Oncol* 42 (3) (1997) 303-309.
- [78] J. Gueulette, V. Gregoire, M. Octave-Prignot, A. Wambersie, Measurements of radiobiological effectiveness in the 85 MeV proton beam produced at the cyclotron CYCLONE of Louvain-la-Neuve, Belgium, *Radiat Res* 145 (1) (1996) 70-74.
- [79] J. Gueulette, M. Octave-Prignot, B.M. De Costera, A. Wambersie, V. Gregoire, Intestinal crypt regeneration in mice: a biological system for quality assurance in non-conventional radiation therapy, *Radiother Oncol* 73 Suppl 2 (2004) S148-154.
- [80] J. Gueulette, J.P. Slabbert, L. Bohm, B.M. De Coster, J.F. Rosier, M. Octave-Prignot, A. Ruifrok, A.N. Schreuder, A. Wambersie, P. Scalliet, D.T. Jones, Proton RBE for early intestinal tolerance in mice after fractionated irradiation, *Radiother Oncol* 61 (2) (2001) 177-184.
- [81] J. Gueulette, J.P. Slabbert, L. Bohm, B.M. De Coster, J.F. Rosier, M. Octave-Prignot, A. Ruifrok, A.N. Schreuder, A. Wambersie, P. Scalliet, D.T. Jones, Proton RBE for early intestinal tolerance in mice after fractionated irradiation, *Radiother Oncol* 61 (2001) 177-184.
- [82] J.L. Habrand, S. Bolle, J. Datchary, C. Alapetite, S. Petras, S. Helfre, L. Feuvret, V. Calugaru, L. De Marzi, A. Bouyon-Monteau, R. Dendale, C. Kalifa, J. Grill, F. Doz, [Proton beam therapy in pediatric radiotherapy], *Cancer Radiother* 13 (6-7) (2009) 550-555.
- [83] J.L. Habrand, P.Y. Bondiau, O. Dupuis, C. Levy-Piedbois, J.L. Marin, O. Oberlin, [Late effects of radiotherapy in children], *Cancer Radiother* 1 (6) (1997) 810-816.
- [84] M. Hada, A.G. Georgakilas, Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review, *J Radiat Res (Tokyo)* 49 (3) (2008) 203-210.
- [85] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop, *Mutagenesis* 18 (1) (2003) 45-51.
- [86] J.H. Hendry, Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy, *Radiother Oncol* 59 (2001) 117-126.
- [87] M.A. Herve du Penhoat, B. Fayard, F. Abel, A. Touati, F. Gobert, I. Despiney-Bailly, M. Ricoul, L. Sabatier, D.L. Stevens, M.A. Hill, D.T. Goodhead, A. Chetioui, Lethal effect of carbon K-shell photoionizations in Chinese hamster V79 cell nuclei: experimental method and theoretical analysis, *Radiat Res* 151 (6) (1999) 649-658.
- [88] J.H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* 411 (6835) (2001) 366-374.
- [89] E.B. Hug, L.N. Loreda, J.D. Slater, A. DeVries, R.I. Grove, R.A. Schaefer, A.E. Rosenberg, J.M. Slater, Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base, *J Neurosurg* 91 (1999) 432-439.
- [90] F. Huguet, Etude de l'altération de la réponse aux radiations ionisantes par deux inhibiteurs de tyrosine kinase : le STI571 (GlivecR) et le BIBW 2992, PhD Thèse, ED Cancérologie Biologie-Médecine-Santé (ED 418), Paris XI, 2010.
- [91] ICRU, Prescribing, Recording, and Reporting Proton-Beam Therapy (ICRU Report 78), *Journal of the ICRU*, Vol. 7, ICRU, 2007.
- [92] ICRU, The quality factor in radiation protection, ICRU Report 40, Bethesda, Maryland (E.U.), 1986.
- [93] C. Institut, Le Centre de Protonthérapie, <http://protontherapie.curie.fr/>, 2010.

- [94] P.S. Institut, OPTIS -- A proton therapy facility for eye tumors, <http://p-therapie.web.psi.ch/e/optis.html>, 2009.
- [95] M. Jasin, Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection, *Oncogene* 21 (58) (2002) 8981-8993.
- [96] A.P. Johnson, M.P. Fairman, The identification and purification of a novel mammalian DNA ligase, *Mutat Res* 383 (3) (1997) 205-212.
- [97] K.H. Karlsson, B. Stenerlow, Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions, *Radiat Res* 161 (5) (2004) 517-527.
- [98] T. Kawamoto, K. Araki, E. Sonoda, Y.M. Yamashita, K. Harada, K. Kikuchi, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Nozaki, N. Hashimoto, S. Takeda, Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis, *Mol Cell* 20 (5) (2005) 793-799.
- [99] S.S. Kim, D.W. Choo, D. Shin, H.J. Baek, T.H. Kim, N. Motoyama, B.M. De Coster, J. Gueulette, Y. Furusawa, K. Ando, K.H. Cho, In vivo radiobiological characterization of proton beam at the National Cancer Center in Korea: effect of the Chk2 mutation, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79 (2) (2011) 559-562.
- [100] D.G. Kirsch, N.J. Tarbell, New technologies in radiation therapy for pediatric brain tumors: the rationale for proton radiation therapy, *Pediatr Blood Cancer* 42 (2004) 461-464.
- [101] K.W. Kohn, DNA filter elution: a window on DNA damage in mammalian cells, *Bioessays* 18 (6) (1996) 505.
- [102] K.W. Kohn, Principles and practice of DNA filter elution, *Pharmacol.Ther.* 49 (1-2) (1991) 55.
- [103] K.W. Kohn, L.C. Erickson, R.A. Ewig, C.A. Friedman, Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution, *Biochemistry* 15 (21) (1976) 4629-4637.
- [104] K.W. Kohn, L.C. Erickson, R.A. Ewig, C.A. Friedman, Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution, *Biochemistry* 15 (21) (1976) 4629.
- [105] K.W. Kohn, R.A. Ewig, DNA-protein crosslinking by trans-platinum(II)diamminedichloride in mammalian cells, a new method of analysis, *Biochim.Biophys.Acta* 562 (1) (1979) 32.
- [106] K.W. Kohn, R.A. Grimek-Ewig, Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells, *Cancer Res* 33 (1973) 1849-1853.
- [107] M. Kuhne, E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P.A. Jeggo, M. Lobrich, A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity, *Cancer Res* 64 (2) (2004) 500-508.
- [108] P. Labhart, Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems, *Eur J Biochem* 265 (3) (1999) 849-861.
- [109] E.L. Leatherbarrow, J.V. Harper, F.A. Cucinotta, P. O'Neill, Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation, *Int J Radiat Biol* 82 (2) (2006) 111-118.
- [110] J.H. Lee, T.T. Paull, ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex, *Science* 308 (5721) (2005) 551-554.
- [111] J.H. Lee, T.T. Paull, Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex, *Science* 304 (5667) (2004) 93-96.

- [112] M.R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination, *DNA Repair (Amst)* 3 (8-9) (2004) 817-826.
- [113] D.S. Lim, S.T. Kim, B. Xu, R.S. Maser, J. Lin, J.H. Petrini, M.B. Kastan, ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway, *Nature* 404 (6778) (2000) 613-617.
- [114] J.B. Little, Radiation carcinogenesis, *Carcinogenesis* 21 (2000) 397-404.
- [115] H. Liu, X. Sun, S. Zhang, W. Ge, Y. Zhu, J. Zhang, S. Zheng, The dominant negative mutant Artemis enhances tumor cell radiosensitivity, *Radiother Oncol* (2011).
- [116] M. Lobrich, P.K. Cooper, B. Rydberg, Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation, *Int J Radiat Biol* 70 (5) (1996) 493-503.
- [117] Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, M.R. Lieber, Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination, *Cell* 108 (6) (2002) 781-794.
- [118] Y. Ma, K. Schwarz, M.R. Lieber, The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps, *DNA Repair (Amst)* 4 (7) (2005) 845-851.
- [119] S. Madhusudan, M.R. Middleton, The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer, *Cancer Treat Rev* 31 (8) (2005) 603-617.
- [120] L. Maloisel, F. Fabre, S. Gangloff, DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension, *Mol Cell Biol* 28 (4) (2008) 1373-1382.
- [121] S. Matsumura, A. Jikko, S. Ozeki, J.T. Tang, S. Fukushima, H. Yamazaki, T. Inoue, K. Hatanaka, H. Fuchihata, Differences in the biological effects of in vitro irradiation by 65 MeV protons and ¹³⁷cesium gamma-rays, *Anticancer Res* 19 (1A) (1999) 477-480.
- [122] A. Mazal, J.L. Habrand, S. Delacroix, J. Datchary, R. Dendale, L. Desjardins, R. Ferrand, V. Malka, A. Fourquet, [Protontherapy: basis, indications and new technologies], *Bull Cancer* 97 (7) (2010) 831-846.
- [123] A.V. Mazin, A.A. Alexeev, S.C. Kowalczykowski, A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament, *J Biol Chem* 278 (16) (2003) 14029-14036.
- [124] M.J. McIlwraith, A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate, S.C. West, Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination, *Mol Cell* 20 (5) (2005) 783-792.
- [125] V.J. McKelvey-Martin, M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo, A. Collins, The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review, *Mutat Res* 288 (1) (1993) 47-63.
- [126] T.E. Merchant, C.H. Hua, H. Shukla, X. Ying, S. Nill, U. Oelfke, Proton versus photon radiotherapy for common pediatric brain tumors: comparison of models of dose characteristics and their relationship to cognitive function., *Pediatr Blood Cancer* 51 (2008) 110-117.
- [127] B.D. Michael, P. O'Neill, Molecular biology. A sting in the tail of electron tracks, *Science* 287 (5458) (2000) 1603-1604.
- [128] J.R. Milligan, J.A. Aguilera, T.T. Nguyen, R.A. Paglinawan, J.F. Ward, DNA strand-break yields after post-irradiation incubation with base excision repair endonucleases

- implicate hydroxyl radical pairs in double-strand break formation, *Int J Radiat Biol* 76 (11) (2000) 1475-1483.
- [129] R. Miralbell, L. Cella, D. Weber, A. Lomax, Optimizing radiotherapy of orbital and paraorbital tumors: intensity-modulated X-ray beams vs. intensity-modulated proton beams, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47 (4) (2000) 1111-1119.
- [130] R. Miralbell, A. Lomax, L. Cella, U. Schneider, Potential reduction of the incidence of radiation-induced second cancers by using proton beams in the treatment of pediatric tumors, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54 (2002) 824-829.
- [131] E. Mladenov, G. Iliakis, Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways, *Mutat Res* 711 (1-2) (2011) 61-72.
- [132] N. Mori, J. Yamate, S. Umesako, D.P. Hong, M. Okumoto, R. Nakao, Preferential induction of mammary tumors in p53 hemizygous BALB/c mice by fractionated irradiation of a sub-lethal dose of X-rays, *J Radiat Res (Tokyo)* 44 (3) (2003) 249-254.
- [133] D. Moshous, I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, O. Sanal, Y. Bertrand, N. Philippe, A. Fischer, J.P. de Villartay, Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency, *Cell* 105 (2) (2001) 177-186.
- [134] J.E. Munzenrider, Proton therapy for uveal melanomas and other eye lesions, *Strahlenther Onkol* 175 Suppl 2 (1999) 68-73.
- [135] H. Nikjoo, P. O'Neill, W.E. Wilson, D.T. Goodhead, Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation, *Radiat Res* 156 (5 Pt 2) (2001) 577-583.
- [136] G. Noël, M. Bollet, V. Calugaru, L. Feuvret, C. Haie-Meder, F. Dhermain, R. Ferrand, G. Boisserie, A. Beaudré, J. Mazon, J. Habrand, Functional outcome of patients with benign meningioma treated by 3D conformal irradiation a combination of photons and protons, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63 (2005) in press.
- [137] G. Noel, L. Feuvret, V. Calugaru, F. Dhermain, H. Mammar, C. Haie-Meder, D. Ponvert, D. Hasboun, R. Ferrand, C. Nauraye, G. Boisserie, A. Beaudre, G. Gaboriaud, A. Mazal, J.L. Habrand, J.J. Mazon, Chordomas of the base of the skull and upper cervical spine. One hundred patients irradiated by a 3D conformal technique combining photon and proton beams, *Acta Oncol* 44 (7) (2005) 700-708.
- [138] G. Noël, L. Feuvret, R. Ferrand, G. Boisserie, J.J. Mazon, J.L. Habrand, Radiotherapeutic factors in the management of cervical-basal chordomas and chondrosarcomas, *Neurosurgery* 55 (2004) 1252-1262.
- [139] G. Noel, L. Feuvret, R. Ferrand, J.J. Mazon, [Treatment with charged particles beams: hadrontherapy part I: physical basis and clinical experience of treatment with protons], *Cancer Radiother* 7 (5) (2003) 321-339.
- [140] G. Noël, N. Giocanti, M. Fernet, F. Mégnin-Chanet, V. Favaudon, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery, *BMC Cell Biol* 4 (2003) 7.
- [141] G. Noël, J.L. Habrand, S. Helfre, H. Mammar, C. Kalifa, R. Ferrand, A. Beaudre, G. Gaboriaud, J.J. Mazon, Proton beam therapy in the management of central nervous system tumors in childhood: the preliminary experience of the Centre de Protontherapie d'Orsay, *Med Pediatr Oncol* 40 (2003) 309-315.
- [142] G. Noël, J.L. Habrand, E. Jauffret, R. de Crevoisier, S. Dederke, H. Mammar, C. Haie-Meder, D. Pontvert, D. Hasboun, R. Ferrand, G. Boisserie, A. Beaudre, G. Gaboriaud,

- F. Guedea, L. Petriz, J.J. Mazon, Radiation therapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and the cervical spine. Prognostic factors and patterns of failure, *Strahlenther Onkol* 179 (2003) 241-248.
- [143] G. Noël, J.L. Habrand, H. Mammar, D. Pontvert, C. Haie-Meder, D. Hasboun, P. Moisson, R. Ferrand, A. Beaudre, G. Boisserie, G. Gaboriaud, A. Mazal, K. Kerody, M. Schlienger, J.J. Mazon, Combination of photon and proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base: the Centre de Protontherapie D'Orsay experience, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51 (2001) 392-398.
- [144] M. O'Driscoll, P.A. Jeggo, The role of double-strand break repair - insights from human genetics, *Nat Rev Genet* 7 (1) (2006) 45-54.
- [145] M. Ogrunc, A. Sancar, Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease, *J Biol Chem* 278 (24) (2003) 21715-21720.
- [146] P.L. Olive, The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation, *Radiat Res* 150 (5 Suppl) (1998) S42-51.
- [147] O. Ostling, K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1984) 291-298.
- [148] A. Ottolenghi, M. Merzagora, H.G. Paretzke, DNA complex lesions induced by protons and alpha-particles: track structure characteristics determining linear energy transfer and particle type dependence, *Radiat Environ Biophys* 36 (2) (1997) 97-103.
- [149] R.J. Packer, A.T. Meadows, L.B. Rorke, J.L. Goldwein, G. D'Angio, Long-term sequelae of cancer treatment on the central nervous system in childhood, *Med Pediatr Oncol* 15 (5) (1987) 241-253.
- [150] H. Paganetti, M. Goitein, Radiobiological significance of beamline dependent proton energy distributions in a spread-out Bragg peak, *Med Phys* 27 (5) (2000) 1119-1126.
- [151] H. Paganetti, A. Niemierko, M. Ancukiewicz, L.E. Gerweck, M. Goitein, J.S. Loeffler, H.D. Suit, Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53 (2) (2002) 407-421.
- [152] H. Paganetti, P. Olko, H. Kobus, R. Becker, T. Schmitz, M.P. Waligorski, D. Filges, H.W. Muller-Gartner, Calculation of relative biological effectiveness for proton beams using biological weighting functions, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37 (3) (1997) 719-729.
- [153] T.T. Paull, M. Gellert, The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks, *Mol Cell* 1 (7) (1998) 969-979.
- [154] T.T. Paull, M. Gellert, Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex, *Genes Dev* 13 (10) (1999) 1276-1288.
- [155] L. Pellegrini, D.S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T.L. Blundell, A.R. Venkitaraman, Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex, *Nature* 420 (6913) (2002) 287-293.
- [156] J.H. Petrini, T.H. Stracker, The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators, *Trends Cell Biol* 13 (9) (2003) 458-462.
- [157] I. Petrovic, A. Ristic-Fira, D. Todorovic, L. Koricanac, L. Valastro, P. Cirrone, G. Cuttone, Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak, *Int J Radiat Biol* 86 (9) (2010) 742-751.

- [158] C. Poinsignon, R. de Chasseval, S. Soubeyrand, D. Moshous, A. Fischer, R.J. Hache, J.P. de Villartay, Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage, *Eur J Immunol* 34 (11) (2004) 3146-3155.
- [159] J.P. Pouget, S. Frelon, J.L. Ravanat, I. Testard, F. Odin, J. Cadet, Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles, *Radiat Res* 157 (5) (2002) 589-595.
- [160] J.P. Pouget, S.J. Mather, General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation, *Eur J Nucl Med* 28 (4) (2001) 541-561.
- [161] L.F. Povirk, T. Zhou, R. Zhou, M.J. Cowan, S.M. Yannone, Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease, *J Biol Chem* 282 (6) (2007) 3547-3558.
- [162] K.M. Prise, C.H. Pullar, B.D. Michael, A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: detection of alpha-particle-induced oxidative damage, *Carcinogenesis* 20 (5) (1999) 905-909.
- [163] S.C. Raghavan, J. Tong, M.R. Lieber, Hybrid joint formation in human V(D)J recombination requires nonhomologous DNA end joining, *DNA Repair (Amst)* 5 (2) (2006) 278-285.
- [164] M.R. Raju, E. Bain, S.G. Carpenter, R.A. Cox, J.B. Robertson, A heavy particle comparative study. Part II: cell survival versus depth, *Br J Radiol* 51 (609) (1978) 704-711.
- [165] D. Ristic, M. Modesti, R. Kanaar, C. Wyman, Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair, *Nucleic Acids Res* 31 (18) (2003) 5229-5237.
- [166] J.B. Robertson, J.R. Williams, R.A. Schmidt, J.B. Little, D.F. Flynn, H.D. Suit, Radiobiological studies of a high-energy modulated proton beam utilizing cultured mammalian cells, *Cancer* 35 (6) (1975) 1664-1677.
- [167] E. Rojas, M.C. Lopez, M. Valverde, Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 722 (1-2) (1999) 225-254.
- [168] P. Rubin, P. Van Houtte, L. Constine, Radiation sensitivity and organ tolerances in pediatric oncology: a new hypothesis, *Front Radiat Ther Oncol* 16 (1981) 62-82.
- [169] B. Rydberg, B. Cooper, P.K. Cooper, W.R. Holley, A. Chatterjee, Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation, *Radiat Res* 163 (5) (2005) 526-534.
- [170] B. Rydberg, M. Lobrich, P.K. Cooper, Repair of clustered DNA damage caused by high LET radiation in human fibroblasts, *Phys Med* 14 Suppl 1 (1998) 24-28.
- [171] N. Saleh-Gohari, T. Helleday, Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells, *Nucleic Acids Res* 32 (12) (2004) 3683-3688.
- [172] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 39-85.
- [173] D.C. Schwartz, C.R. Cantor, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 37 (1984) 67-75.

- [174] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-191.
- [175] G.C. Smith, R.B. Cary, N.D. Lakin, B.C. Hann, S.H. Teo, D.J. Chen, S.P. Jackson, Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20) (1999) 11134-11139.
- [176] J.M. Song, J.R. Milligan, B.M. Sutherland, Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelength ultraviolet (290-400 nm) radiation?, *Biochemistry* 41 (27) (2002) 8683-8688.
- [177] G. Speit, A. Hartmann, The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods Mol Biol* 113 (1999) 203-212.
- [178] W.H. St Clair, J.A. Adams, M. Bues, B.C. Fullerton, S. La Shell, H.M. Kooy, J.S. Loeffler, N.J. Tarbell, Advantage of protons compared to conventional X-ray or IMRT in the treatment of a pediatric patient with medulloblastoma, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004) 727-734.
- [179] T.D. Stamato, N. Denko, Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Radiat Res* 121 (1990) 196-205.
- [180] B. Stenerlow, K.H. Karlsson, B. Cooper, B. Rydberg, Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: results for cells deficient in nonhomologous end joining, *Radiat Res* 159 (4) (2003) 502-510.
- [181] D. Stoppa-Lyonnet, A. Aurias, [Ataxia telangiectasia: what impact in clinical oncology?], *Bull Cancer* 79 (7) (1992) 645-650.
- [182] B.M. Sutherland, P.V. Bennett, N.S. Cintron, P. Guida, J. Laval, Low levels of endogenous oxidative damage cluster levels in unirradiated viral and human DNAs, *Free Radic Biol Med* 35 (5) (2003) 495-503.
- [183] B.M. Sutherland, P.V. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks, *Biochemistry* 39 (2000) 8026-8031.
- [184] B.M. Sutherland, P.V. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks, *Biochemistry* 39 (27) (2000) 8026-8031.
- [185] L. Syllaba, K. Hennen, Contribution à l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique., *Rev Neurol (Paris)* 1 (1926) 541-562.
- [186] T.L. Tan, R. Kanaar, C. Wyman, Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination, *DNA Repair (Amst)* 2 (7) (2003) 787-794.
- [187] J.T. Tang, T. Inoue, H. Yamazaki, S. Fukushima, N. Fournier-Bidoz, M. Koizumi, S. Ozeki, K. Hatanaka, Comparison of radiobiological effective depths in 65-MeV modulated proton beams, *Br J Cancer* 76 (2) (1997) 220-225.
- [188] J. Tepper, L. Verhey, M. Goitein, H.D. Suit, In vivo determinations of RBE in a high energy modulated proton beam using normal tissue reactions and fractionated dose schedules, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2 (11-12) (1977) 1115-1122.
- [189] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for

- in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen* 35 (3) (2000) 206-221.
- [190] R.R. Tice, P.W. Andrews, O. Hirai, N.P. Singh, The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, *Adv Exp Med Biol* 283 (1991) 157-164.
- [191] R.R. Tice, G.H. Strauss, The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells* 13 Suppl 1 (1995) 207-214.
- [192] M. Tubiana, *Radiobiologie*, Hermann/Médecine, Paris, 2008.
- [193] C. Turmel, E. Brassard, G.W. Slater, J. Noolandi, Molecular detrapping and band narrowing with high frequency modulation of pulsed field electrophoresis, *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 569-575.
- [194] K. Valerie, L.F. Povirk, Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair, *Oncogene* 22 (37) (2003) 5792-5812.
- [195] E. Van Dyck, A.Z. Stasiak, A. Stasiak, S.C. West, Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein, *Nature* 398 (6729) (1999) 728-731.
- [196] N.S. Verkaik, R.E. Esveldt-van Lange, D. van Heemst, H.T. Bruggenwirth, J.H. Hoeijmakers, M.Z. Zdzienicka, D.C. van Gent, Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells, *Eur J Immunol* 32 (3) (2002) 701-709.
- [197] C. von Sonntag, *The chemical basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London (1987).
- [198] A. Wambersie, P. Pihet, H.G. Menzel, The role of microdosimetry in radiation therapy., *Radiation Protection Dosimetry* 31 (1990) 421-432.
- [199] H. Wang, Z.C. Zeng, A.R. Perrault, X. Cheng, W. Qin, G. Iliakis, Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 29 (8) (2001) 1653-1660.
- [200] J. Wang, J.M. Pluth, P.K. Cooper, M.J. Cowan, D.J. Chen, S.M. Yannoni, Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression, *DNA Repair (Amst)* 4 (5) (2005) 556-570.
- [201] J.F. Ward, *Biochemistry of DNA lesions*, *Radiat Res Suppl* 8 (1985) S103-111.
- [202] J.F. Ward, DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35 (1988) 95-125.
- [203] J.F. Ward, W.F. Blakely, E.I. Joner, Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide, *Radiat Res* 103 (3) (1985) 383-392.
- [204] J.J. Wilkens, U. Oelfke, Direct comparison of biologically optimized spread-out bragg peaks for protons and carbon ions, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70 (1) (2008) 262-266.
- [205] R.R. Wilson, Radiological use of fast protons, *Radiology* 47 (5) (1946) 487-491.
- [206] L. Woodbine, H. Brunton, A.A. Goodarzi, A. Shibata, P.A. Jeggo, Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair, *Nucleic Acids Res* (2011).

- [207] B.G. Wouters, G.K. Lam, U. Oelfke, K. Gardey, R.E. Durand, L.D. Skarsgard, Measurements of relative biological effectiveness of the 70 MeV proton beam at TRIUMF using Chinese hamster V79 cells and the high-precision cell sorter assay, *Radiat Res* 146 (2) (1996) 159-170.
- [208] X. Wu, V. Ranganathan, D.S. Weisman, W.F. Heine, D.N. Ciccone, T.B. O'Neill, K.E. Crick, K.A. Pierce, W.S. Lane, G. Rathbun, D.M. Livingston, D.T. Weaver, ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response, *Nature* 405 (6785) (2000) 477-482.
- [209] T. Yock, R. Schneider, A. Friedmann, J. Adams, B. Fullerton, N. Tarbell, Proton radiotherapy for orbital rhabdomyosarcoma: clinical outcome and a dosimetric comparison with photons, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63 (4) (2005) 1161-1168.
- [210] X. Zhang, Y. Zhu, L. Geng, H. Wang, R.J. Legerski, Artemis is a negative regulator of p53 in response to oxidative stress, *Oncogene* 28 (22) (2009) 2196-2204.

ANNEXES

Curriculum Vitae

Valentin CALUGARU

Adresse professionnelle : Institut Curie – Hôpital, Département d’Oncologie – Radiothérapie,
26 rue d’Ulm, 75005 Paris

Téléphone : +33 (0)144324621

E-mail : valentin.calugaru@curie.net

FORMATION ET DIPLOMES

2007 – 2011	Thèse ès Sciences , Ecole Doctorale de Cancérologie Biologie – Médecine – Santé, Université Paris 11 Paris-Sud
Mai 2007	Qualifié Spécialiste en Oncologie option Radiothérapie par le Conseil Départemental de la Ville de Paris de l’Ordre des Médecins
2004 –2005	Master (M2) de Cancérologie, filière Radiobiologie , Université Paris 11 Paris-Sud
2003 – 2004	A.F.S.A Oncologie Radiothérapie , Université Paris 6 Pierre et Marie Curie
2002 – 2003	D.U. de Cancérologie Clinique , Université Paris 11 Paris-Sud
2002 – 2003	A.F.S.A. Cancérologie , Université Paris 7 Denis Diderot
2000 – 2002	A.F.S. Oncologie Radiothérapie , Université Paris 6 Pierre et Marie Curie
2001	Diplôme de Médecin spécialiste en Radiothérapie , Bucarest, Roumanie
1997 – 2001	Internat en radiothérapie , l’Institut d’Oncologie de Bucarest, Roumanie

- 1996 **D.U. de Cancérologie Digestive**, Université de Craiova, Faculté de médecine, Craiova, Roumanie
- 1995 **Diplôme de Docteur Médecin**, Université de Médecine et Pharmacie Carol Davila, Bucarest, Roumanie
- 1989 – 1995 **Etudes de médecine**, Université de Médecine et Pharmacie Carol Davila, Bucarest
- 1987 **Baccalauréat**, Lycée de Mathématique – Physique «Nicolae Balcescu », profil mathématique - physique, Craiova, Roumanie

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- Mai 2010-à ce jour Médecin, Praticien Spécialiste des CLCC, **Institut Curie, Paris**
- Nov. 2009-Avril 2010 Médecin, Praticien des CLCC, **Institut Curie, Paris**
- Nov. 2007-Oct. 2009 Médecin, Praticien Assistant Spécialiste, **Institut Curie, Paris.**
- Fév. 2007-Oct. 2007 Médecin, Praticien Attaché, **Centre des Tumeurs, Cancérologie Radiothérapique et Médicale, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.**
- Juin 2005-Mai 2007 Ingénieur d'étude dans le cadre de S.T.I.C. (Soutien aux Techniques Innovantes Coûteuses), **Centre des Tumeurs, Cancérologie Radiothérapique et Médicale, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.**
- Nov.2004–Juin2005 Stage du Master (M2) de Cancérologie, filière Radiobiologie - **Inserm U612, Génotoxicologie, signalisation et radiothérapie expérimentale, Institut Curie – Recherche, Orsay.**
- 2003 – 2004 Médecin - **Centre de Protonthérapie d'Orsay – Institut Curie.**
- 2000 – 2003 Médecin - **Centre des Tumeurs, Cancérologie Radiothérapique et Médicale, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.**
- 1997 – 2000 Médecin interne en radiothérapie, **Institut d'Oncologie Bucarest, Roumanie.**
- 1995 – 1997 Médecin généraliste, Motatei, Roumanie.

ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT

D. U. Radiochirurgie et radiothérapie en conditions stéréotaxiques intra et extracrâniennes - Faculté de médecine Paris 6 Pierre et Marie Curie – *Radiobiologie des protons* – 1h – Juin 2006, 2007, 2008, 2009 et 2010

TRAVAUX ET PUBLICATIONS

I. Publications dans des revues avec comité de lecture :

- 2010 *Role of Chemotherapy and Molecularly Targeted Agents in the Treatment of Adenoid Cystic Carcinoma of the Lacrimal Gland* - Christophe Le Tourneau, Albiruni AR Razak, Christine Levy, Valentin Calugaru, Olivier Galatoire, Remi Dendale, Laurence Desjardins, and Hui K Gan - British Journal of Ophthalmology - article sous presse
- 2010 *Radiobiological characterization of two therapeutic proton beams with different initial energy spectra used at the Institut Curie- Proton therapy Center in Orsay* - Valentin Calugaru, Catherine Nauraye, Georges Noël, Nicole Giocanti, Vincent Favaudon et Frédérique Megnin-Chanet - Int J Radiat Oncol Biol Phys – article sous presse
- 2010 Dec. *La protonthérapie : avenir de la radiothérapie ? Première partie : aspects cliniques* - A. Bouyon-Monteau, J.-L. Habrand, J. Datchary, C. Alapetite, S. Bolle, R. Dendale, L. Feuvret, S. Helfre, V. Calugaru, J.-M. Cosset, P. Bey - Cancer/Radiothérapie, 14 (8) pp.727–738
- 2010 Mars *Anomalous Phosphenes in Ocular Protontherapy* – E. Khan, F. Maréchal, R. Dendale, C. Mabit, V. Calugaru, L. Desjardin, L. Narici – Advances in Space Research, Vol. 45, Issue 7, pp. 823-948
- 2009 Oct. *La protonthérapie en radiothérapie pédiatrique* - J.-L. Habrand, S. Bolle, J. Datchary, C. Alapetite, S. Petras, S. Helfre, L. Feuvret, V. Calugaru, L. De Marzi, A. Bouyon-Monteau, R. Dendale, C. Kalifa, J. Grill, F. Doz - Cancer/Radiothérapie, 13 (6-7), pp. 550-555
- 2008 Sept. *Les effets de la liste d'attente sur la survie des patients atteints de glioblastome traité par irradiation* - S. Lopez, V. Calugaru, I. Lamproglou, C. Boskos, S. Taillibert, J.-M. Simon, J.-J. Mazon - Cancer/Radiothérapie, 12 (5), pp. 497–499

- 2007 Mai ***Chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une radiothérapie adaptée à la réponse tumorale dans les tumeurs germinales séminomateuses du système nerveux central : expérience de l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière et revue de la littérature*** – V. Calugaru, S. Taillibert, P. Lang, J.-M. Simon, J.-Y. Delattre, J.-J. Mazon - Cancer/Radiothérapie, 11 (3), pp. 122-128
- 2006 Nov. ***Proton beam therapy for iris melanomas*** - L Lumbroso-Le Rouic, S Delacroix, R Dendale, C Levy-Gabriel, L Feuvret, G Noel, C Plancher, C Nauraye, P Garcia, V Calugaru, B Asselain and L Desjardins – Eye, Vol. 20, Issue 11, pp.1300-1305
- 2006 Juin ***Giant cell tumor of the base of the skull: a report of two cases and review of the literature*** – Noël G., Ben Jelloun H., Feuvret L., Calugaru V., Mazon J.J., Habrand J.L. – Cancer/Radiothérapie 10 (4), pp. 175-184
- 2005 Oct. ***Chordomas of the base of the skull and upper cervical spine. One hundred patients irradiated by a 3D conformal technique combining photon and proton beams*** - Noel G, Feuvret L, Calugaru V, Dhermain F, Mammar H, Haie-Meder C, Ponvert D, Hasboun D, Ferrand R, Nauraye C, Boisserie G, Beaudre A, Gaboriaud G, Mazal A, Habrand JL, Mazon JJ - Acta Oncologica Oct 2005, Vol. 44, No. 7, pp. 700-708(9)
- 2005 Sept. ***Chondromyxoid fibroma of the skull base: Differential diagnosis and radiotherapy. Two case reports and a review of the literature.*** – Feuvret L., Noël G., Calugaru V., Terrier P., Habrand J. L. - Acta Oncologica Sept 2005; Vol. 44 No. 6, pp. 545-553
- 2005 Août ***Functional outcome of patients with benign meningioma treated by 3D conformal irradiation with a combination of photons and protons*** – Georges Noël, Marc Bollet, Valentin Calugaru, Loïc Feuvret, Christine Haie-Meder, Frédéric Dhermain, Régis Ferrand, Gilbert Boisserie, Anne Beaudré, Jean-Jacques Mazon, Jean-Louis Habrand – Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 62, No. 5, pp. 1412-1422
- 2005 Fév. ***Protonthérapie dans les chordomes de la base du crâne et du rachis cervical haut. Résultats du centre de Protonthérapie d'Orsay*** - G. Noël, L. Feuvret, V. Calugaru, F. Dhermain, H. Mammar, J .L. Habrand, J.J. Mazon - Neurochirurgie, Vol. 51, No. 1, pp. 52 –53
- 2004 Déc. ***Le centre de protonthérapie d'Orsay : une réponse médicale à un paradoxe technico-scientifique*** – Loïc Feuvret, Sandrine Charrier, Valentin Calugaru, Georges Noël - Revue Francophone de Psycho – Oncologie, Vol. 3, No. 4 : 182 – 187

- 2004 Déc. ***Chondrosarcomas of the Base of the Skull in Ollier's Disease or Maffucci's Syndrome – Three Case Reports and Review of the Literature*** – Georges Noël, Loïc Feuvret, Valentin Calugaru, Khalid Hadadi, François Baillet, Jean-Jacques Mazon and Jean-Louis Habrand – Acta Oncologica (2004), Vol. 43, No. 8, pp. 705 – 710
- 2004 Déc. ***Clinical complementarities between proton and carbon therapies*** – Jean-Jacques Mazon, Georges Noel, Loic Feuvret, Valentin Calugaru, Severine Racadot - Radiotherapy and Oncology, Vol. 73 (supplement 2), S50-52
- 2004 Oct. ***La protonterapia : indicaciones y perspectivas*** – A.J. Conde Moreno, L. Feuvret, G. Noël, V. Calugaru, R. Ferand, S. Delacroix, J.J. Mazon – Revista de Oncologia, Vol. 6, No. 7, pp. 403 – 414

II. Chapitres de livre :

- 2006 Fév. ***Suboccipital and Cervical Chordomas : the Value of Dosimetric Parameters and Review of Prognostic Factors in the Literature*** – Georges Noel, Loic Feuvret, Jean-Louis Habrand, Valentin Calugaru, Jean-Jacques Mazon, Pierre Bey – New Developments in Bone Cancer Research, Editor Catherine E. O'Neill, 2005, Vol. 22, Chapter II, pp. 29-42, Horizons in Cancer Research, Nova Science Publishers Inc.
- 2005 Nov. ***Chimioradiothérapie des cancers du cavum : étude rétrospective sur 84 patients.*** – Dessard-Diana B., Noël G., Racadot S., Toubiana T., Calugaru V., Guet S., Mazon J.J., Baillet F. – Tumeurs de la langue mobile. Radiochimiothérapie des cancers des voies aéro-digestives supérieures, Editor P. Marandas, 2005, pp.253-263, EDK, Paris

III. Communications orales :

- 2010 Oct. ***Proton Therapy (PT) in Pediatric Malignancies : The Orsay Experience*** – Jean-Louis Habrand, Stephanie Bolle, Jean Datchary, Claire Alapetite, Slavo Petras, Sylvie Helfre, Ludovic De Marzi, Loic Feuvret, Valentin Calugaru, Remi Dendale, Jacques Grill, Anne Beaudre, François Doz – 20 – 24 Oct 2010, 42nd Congress of the International Society of Paediatric Oncology, SIOP 2010, Boston, Etats-Unis
- 2010 Fév. ***Efficacité biologique relative (EBR) des faisceaux de protons utilisés au Centre de protonthérapie de l'Institut Curie*** - V. Calugaru, C. Nauraye, F. Cordelières, V. Favaudon, F. Mégnin-Chanet – 10 – 11 Fév. 2010, 7es Journées scientifiques et médicales de l'Institut Curie, JSM 2010
- 2009 Oct. ***Long-term results of chemoradiation therapy with photons/protons for***

- locally advanced nasopharyngeal carcinoma* - S. Bolle, A. Levy, V. Calugaru, L. Feuvret and G. Noël - PTCOG 48 2009, 28 Sept. - 03 Oct. 2009, Heidelberg, Allemagne
- 2009 Sept. *Basic principles of radiotherapy in ophthalmic oncology* - Dendale R., Fournier - Bidoz N., Campitelli M., Calugaru V., Lumbroso - Le Rouic L., Levy C., Mazal A., Desjardins L. - Congrès d'EVER (European Association for Vision and Eye Research) 2009, 30 Sept. - 03 Oct. 2009, Portoroz, Slovenie
- 2006 Janv. *Protonthérapie ciblée pour des tumeurs pédiatriques et adultes* - Calugaru V., Noël G., Mazal A., Buron C., Habrand JL., Nauraye C., Favaudon V. - 31 janvier 2006, Meeting du Cancéropôle Ile-de-France, Paris
- 2004 Nov. *Le centre de protonthérapie d'Orsay : une réponse médicale à un paradoxe technico-scientifique* – Loïc Feuvret, Sandrine Charrier, Valentin Calugaru, Georges Noël – 21^e Congrès de la Société Française de Psycho - Oncologie (S.F.P.O.), Paris
- 2004 Nov. *Chimioradiothérapie concomitante dans les cancers du cavum. Etude rétrospective de 84 patients.* – Dessard-Diana B., Noël G., Racadot S., Toubiana T., Calugaru V., Guet S., Mazon J.J. – 37^e Congrès de la Société Française de Carcinologie Cervico-Faciale, Paris
- 2004 Oct. *Protonthérapie dans les chordomes de la base du crâne et du rachis cervical haut. Résultats du centre de Protonthérapie d'Orsay* - G. Noël, L. Feuvret, V. Calugaru, F. Dhermain, H. Mammar, J.L. Habrand, J.J. Mazon - Réunion de l'ANOCEF, 22-23 Oct. 2004, Paris
- 2004 Juin *Functional outcome of patients with benign meningioma treated by 3D conformal irradiation with a combination of photons and protons* - Valentin Calugaru, Loïc Feuvret, Christine Haie-Meder, Régis Ferrand, Gilbert Boisserie, Jean-Jacques Mazon, Jean-Louis Habrand, Georges Noël – 16-18 Juin 2004, PTCOG 40, Paris
- 2004 Avril *Clinical evaluation of 51 patients treated with a combined photon-proton irradiation for a benign meningioma* – G. Noel, L. Feuvret, V. Calugaru, C. Haie-Meder, J.L. Habrand, J.J. Mazon – 2nd ESTRO meeting on radiotherapy for non-malignant disease, France, Nice – Radiotherapy and Oncology, vol. 71 (supplement 1), S12
- 2003 Mai *L'Ethyol en radiothérapie ORL. Expérience du Service de Radiothérapie de l'Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris* - Pr. F. Baillet, Dr B. Brun, Dr V. Calugaru - Réunion Régionale de la Société Française de Cancérologie Privée, St. Valéry en Caux, Normandie

IV. Posters :

- 2011 Mai *A Dosimetric Comparison of Proton Therapy versus Tomotherapy for Adenoid Cystic Carcinoma of the Lacrimal Gland* – V. Calugaru, L. De Marzi, L. Feuvret, S. Zefkili, M. Amessis, J. Rosier, S. Bolle, C. Levy, C. Le Torneau, O. Galatoire, L. Lumbroso-Le Ruic, L. Desjardins, R. Dendale – 12 – 14 Mai 2011, PTCOG 2011, Philadelphia, Etats-Unis
- 2011 Mai *Increased carcinogenesis induced by 201 MeV protons medical beam* – Frédéric Pouzoulet, Benoit Petit, Valentin Calugaru, Anne Beaudré, Catherine Nauraye, Dominique Violot, Mélanie Polrot, Karine Ser-Leroux, Patrick Gonin, Olivia Bawa, Paule Opolon, Marie-Catherine Vozenin-Brotons, Joseph Jerry, Janet Hall, Vincent Favaudon, Jean Bourhis – 12 – 14 Mai 2011, PTCOG 2011, Philadelphia, Etats-Unis
- 2010 Nov *Proton Total Dose Adaptation According to Dosimetric Parameter in Skull Base and Upper Cervical Spine Chordomas* – C. Hemery, V. Calugaru, S. Bolle, J. Habrand, J. Datchary, C. Alapetite, J. Mazon, R. Dendale, G. Noël and L. Feuvret – 31 Oct - 4 Nov 2010, 52nd Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology, ASTRO, San Diego, Etats-Unis - Int J Radiat Oncol Biol Phys, Vol. 78, Issue 3, Suppl. 1, pp. S807
- 2010 Oct. *Adaptation de la dose totale de protons en fonction des paramètres dosimétriques dans le cadre du traitement des chordomes de la base du crâne et du rachis cervical haut* – C.-G. Hemery, V. Calugaru, S. Bolle, J.-L. Habrand, J. Datchary, C. Alapetite, J.-J. Mazon, R. Dendale, G. Noël et L. Feuvret - 6-8 Oct 2010, 21^e Congrès national de la SFRO, Paris – Cancer/Radiothérapie 14 (2010) – P154, pp. 646-647
- 2009 Oct. *Relative biological effectiveness of the modulated protons beams used at the Institute Curie-Protontherapy Center in Orsay (ICPO)* - V. Calugaru, C. Nauraye, G. Noël, V. Favaudon and F. Mégnin-Chanet – 28 Sept – 03 Oct 2009, PTCOG 48 2009, Heidelberg, Allemagne
- 2009 Mai *Efficacité Biologique Relative (EBR) des faisceaux de protons du Centre de Protonthérapie d'Orsay – Institut Curie* – V. Calugaru, C. Nauraye, G. Noël, V. Favaudon and F. Mégnin-Chanet – 18 – 20 Mai 2009, Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale de Cancérologie Paris XI, Roscoff
- 2005 Déc. *Efficacité Biologique Relative (EBR) en protonthérapie. Resultats de l'utilisation du faisceau clinique du Centre de protonthérapie - Institut Curie* – Calugaru V., Noël G., Nauraye C., Giocanti N., Favaudon V. - 16^e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique (S.F.R.O.), Paris

- 2005 Oct. ***Study of Glucose Metabolism of Chordoma and Chondrosarcoma of the Skull Base Using PET*** – C. Tamas, F. Sarandi, T. Delzescaux, R. Trebossen, G. Boisserie, L. Feuvret, M. J. Ribeiro, V. Calugaru, V. Brulon, F. Semah, A. Syrota, G. Noël – EANM'05 – Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 15 – 19 Oct., 2005, Istanbul, Turquie
- 2004 Nov. ***Comparaison de l'efficacité et de la tolérance de deux schémas d'administration de l'amifostine, quotidien et intermittent, chez des patients recevant une chimioradiothérapie pour cancers ORL. Etude rétrospective chez 60 patients*** – Calugaru V., Bernard B., Dessard-Diana B., Simon J., Noël G., Feuvret L., Mazon J.J., Baillet F. – 15^e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique (S.F.R.O.), Paris - Cancer Radiothérapie, nov. 2004, Vol.8 – Suppl.1 – S 138, P20
- 2004 Juin ***Chondromyxoid fibroma of the base of the skull. Two case reports – Role of radiotherapy*** – L. Feuvret, G. Noel, V. Calugaru, R. Ferrand, J.J. Mazon, P. Bey, J.L. Habrand, 16 – 18 Juin 2004, PTCOG 40, Paris