

# Étude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies

Amelie Freneau

► **To cite this version:**

Amelie Freneau. Étude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS350 . tel-02089152

**HAL Id: tel-02089152**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02089152>**

Submitted on 3 Apr 2019

**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.

# Etude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°577 Structure et Dynamique des Systèmes Vivants  
Spécialité de doctorat: Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 27 Novembre 2018, par

**Amélie Fréneau**

## Composition du Jury :

|  |                       |
|--|-----------------------|
| Pr. Suzanne Sommer<br>Professeur émérite, Université d'Orsay, Paris-Saclay           | Présidente            |
| Pr. Ruth Wilkins<br>Professeur adjoint, Université de Carleton, Canada               | Rapporteur            |
| Pr. Anne Vral<br>Professeur, Université de Ghent, Belgique                           | Rapporteur            |
| Dr. Marie-Anne Hervé Du Penhoat<br>Maitre de conférence, Sorbonne Université, France | Examineur             |
| Dr. Laurence Roy<br>Chercheur, IRSN, Fontenay-aux-Roses                              | Directeur de thèse    |
| Dr. Gaëtan Gruel<br>Chercheur, IRSN, Fontenay-aux-Roses                              | Co-Directeur de thèse |



**SOMMAIRE**

|   |           |
|---|-----------|
| Remerciements.....  | 6         |
| Liste des figures.....  | 8         |
| Liste des tableaux.....   | 11        |
| <b>PARTIE 1 : ETAT DE L'ART.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1. Nature des rayonnements ionisants.....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1. Les particules ionisantes .....  | 14        |
| 1.2. Les rayonnements électromagnétiques .....  | 14        |
| <b>2. Interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière au niveau atomique.....</b>           | <b>17</b> |
| <b>3. Utilisation des rayonnements X par l'Homme .....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1. Imagerie .....   | 23        |
| 3.2. Traitement.....  | 23        |
| 3.3. Notion de bénéfice/risque dans l'utilisation des rayonnements X en médecine .....                      | 24        |
| <b>4. L'interaction directe et indirecte des rayons X avec les différents constituants cellulaires.....</b> | <b>26</b> |
| 4.1. Radiolyse de la molécule d'eau .....   | 26        |
| 4.2. Peroxydation des lipides membranaires .....  | 27        |
| 4.3. Oxydation des protéines .....  | 28        |
| 4.4. Dommages de l'ADN .....  | 28        |
| 4.4.1. Altération des bases nucléotidiques.....   | 30        |
| 4.4.2. Les cassures de l'ADN .....  | 31        |
| <b>5. Signalisation des cassures double brin et prise en charge des dommages.....</b>                       | <b>33</b> |
| 5.1. Organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine .....                                       | 33        |
| 5.2. Modifications post-traductionnelles .....  | 36        |
| 5.3. Signalisation du dommage de l'ADN et sa réparation .....   | 37        |
| 5.3.1. Généralités .....  | 37        |
| 5.3.2. Cas des aberrations chromosomiques.....  | 41        |
| <b>6. Devenir des cellules suite aux dommages de l'ADN.....</b>   | <b>45</b> |
| 6.1. Blocage du cycle cellulaire.....   | 45        |
| 6.1.1. Le cycle cellulaire.....   | 45        |
| 6.1.2. Régulation du cycle cellulaire .....   | 45        |
| 6.1.3. Arrêt du cycle cellulaire .....  | 47        |

---

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| 6.2.             | La catastrophe mitotique .....  | 48        |
| 6.3.             | Mortalité cellulaire .....  | 49        |
| 6.3.1.           | L'apoptose .....  | 50        |
| 6.3.2.           | L'oncose/la nécrose .....   | 52        |
| 6.3.3.           | L'autophagie .....  | 53        |
| 6.4.             | Sénescence .....  | 54        |
| <b>7.</b>        | <b>Etat de l'art sur la comparaison des effets biologiques en fonction des énergies de photons utilisées.....</b> | <b>56</b> |
| 7.1.             | Etudes épidémiologiques et radiobiologiques : bases de la radioprotection .....                                   | 56        |
| 7.2.             | Etudes radiobiologiques comparatives des rayonnements X.....  | 58        |
| 7.2.1.           | Aberrations chromosomiques .....  | 58        |
| 7.2.2.           | Survie clonogénique .....   | 65        |
| 7.2.3.           | Quantification des CDB.....   | 67        |
| 7.2.4.           | Synthèse.....   | 68        |
| <b>PARTIE 2:</b> | <b>OBJECTIFS DE THESE .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>PARTIE 3</b>  | <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>1.</b>        | <b>Stratégie expérimentale .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>2.</b>        | <b>Culture cellulaire .....</b>   | <b>77</b> |
| 2.1.             | Amplification.....  | 77        |
| 2.2.             | Ensemencement cellulaire .....  | 77        |
| <b>3.</b>        | <b>Configurations d'irradiation.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>4.</b>        | <b>Marquages par immunofluorescence .....</b>   | <b>80</b> |
| 4.1.             | Protocole de marquage par immunofluorescence.....   | 80        |
| 4.2.             | Acquisition par microscopie à fluorescence .....  | 81        |
| 4.3.             | Méthodologie analytique .....   | 82        |
| 4.3.1.           | Analyses des images .....   | 82        |
| 4.3.2.           | Analyses des données .....  | 84        |
| 4.3.2.1.         | Analyses des foyers $\gamma$ H2A.X .....  | 84        |
| 4.3.2.2.         | Co-localisation des foyers $\gamma$ H2A.X et 53BP1 .....  | 85        |
| 4.3.3.           | Analyses des cellules binucléées et des anomalies de ségrégation.....   | 86        |
| <b>5.</b>        | <b>Videomicroscopie .....</b>   | <b>86</b> |
| 5.1.             | Acquisition par microscopie en contraste de phase.....  | 86        |
| 5.2.             | Méthodologie analytique .....   | 87        |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>6. Western Blot</b> .....   | <b>87</b>  |
| 6.1. Protocole de Western Blot.....  | 87         |
| 6.2. Validation des anticorps utilisés.....  | 89         |
| 6.3. Acquisition des membranes par chimioluminescence.....   | 91         |
| 6.4. Méthodologie analytique.....  | 91         |
| <br>   |            |
| <b>PARTIE 4: RESULTATS</b> .....   | <b>91</b>  |
| <br>   |            |
| <b>1. Caractérisation des spectres énergétiques des photons et des électrons secondaires</b>                     | <b>93</b>  |
| <b>2. Quantification in situ des CDB</b> .....   | <b>96</b>  |
| 2.1. Foyers $\gamma$ H2A.X/53BP1 .....   | 96         |
| 2.2. Caractérisation des foyers $\gamma$ H2A.X .....   | 98         |
| 2.2.1. Quantification des foyers $\gamma$ H2A.X .....  | 98         |
| 2.2.2. Mesure de l'aire des foyers $\gamma$ H2A.X .....  | 103        |
| 2.2.3. Distribution spatiale des CDB au sein d'un noyau.....   | 103        |
| 2.2.3.1. Distance moyenne du plus proche voisin .....  | 104        |
| 2.2.3.2. Distance minimum du plus proche voisin.....   | 108        |
| 2.2.3.3. Distribution de la distance moyenne et minimale des foyers pour une<br>catégorie de noyaux donnée ..... | 110        |
| <b>3. Devenir cellulaire</b> .....   | <b>113</b> |
| <b>4. Anomalies de ségrégation mitotique</b> .....   | <b>118</b> |
| <br>   |            |
| <b>PARTIE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....   | <b>119</b> |
| <br>   |            |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....   | <b>127</b> |
| <br>   |            |
| <b>ANNEXES</b> .....   | <b>146</b> |
| <br>   |            |
| <b>PUBLICATION ASSOCIEE</b> .....  | <b>151</b> |

---

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : tout d'abord, le Professeur Suzanne Sommer, pour avoir accepté de présider ce jury ; les Professeurs Ruth Wilkins et Anne Vral, pour avoir accepté d'en être les rapportrices ; et enfin le Docteur Marie Anne Hervé du Penhoat, pour avoir accepté d'en être l'examinatrice.

Je tiens à remercier Marc Benderitter de m'avoir accueilli au sein du Service de recherche en radiobiologie et en médecine régénérative (SERAMED) et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet dans de très bonnes conditions. Egalement, j'adresse mes profonds remerciements à ma directrice de thèse, Laurence Roy, pour son soutien infaillible et ses nombreux conseils.

Mes plus grands remerciements vont au Docteur Gaëtan Gruel, chef du laboratoire de Radiobiologie des Expositions Accidentelles mais également, mon co-directeur de thèse, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci pour ta gentillesse, pour ta bienveillance, pour tes nombreux conseils et surtout pour ton incroyable patience (il t'en a fallu avec moi !!!) pendant ces trois années à tes côtés. Tu es un vrai passionné et cela a été un réel plaisir de travailler avec toi.

Merci également à tous mes collègues du LRAcc. Aurélie, merci, merci et encore merci pour tous tes conseils et ton soutien permanent tout au long de cette thèse. Ces remerciements ne suffiront pas à décrire toute ma reconnaissance. Merci pour toujours avoir eu les bons mots pour me reconforter quand ça n'allait pas, pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques. Je te souhaite le meilleur pour ton futur professionnel et personnel. Géraldine, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant ma 1<sup>ère</sup> année de thèse et un peu plus, merci pour toutes tes explications abouties ou non d'ailleurs !! Je te remercie d'avoir su m'écouter lors de mes petites baisses de moral, merci pour tous ces fous rires également, et surtout merci pour m'avoir accompagnée en congrès au fin fond de l'Europe de l'Est : Pécs. Delphine, ma coéquipière de course à pieds dans le bois de Clamart, merci pour ton aide et transmission de savoir pour les Western Blot, pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Je te remercie aussi pour ton sourire quotidien, ta bonne humeur, c'était un bonheur de

---

« presque » partager ton bureau. Eric, merci pour ta bonne humeur, ton rire si communicatif et tes encouragements. Cécile, merci pour ton accueil chaleureux lors de mon arrivée en tant que stagiaire en 2013. Tu as fait en sorte que je sois au plus vite intégrée et opérationnelle au sein du « feu » LDB. Je te souhaite pleins de bonnes choses dans ton nouveau laboratoire. Pascale, merci pour ta douceur et tes conseils bienveillants. Juan et Laure, merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse et vos conseils toujours très justes, merci Laure pour m'avoir nourrie de biscuits quand j'avais un petit creux à 16h ! Bruno, merci pour tes murmures hilarants. Enfin, je tiens à remercier tous ceux que j'ai pu croiser au sein du LDB puis du LRAcc.

Je remercie plus largement les membres du SERAMED pour leur accueil ainsi que l'aide qu'ils ont pu m'apporter à un moment ou à un autre. Merci à Valérie et à Georges pour m'avoir accueillie dans leur bureau quand je voulais faire une pause « détente/rigolade ». Merci à tous les doctorants que j'ai pu rencontrer Stéfania, Cyprien, Elodie, Jérémy, Soysou, Mariam, Alexia et Annaïg etc... Merci pour tous ces bons moments ! Merci (SURTOUT) à Sandra Barth Adecco (comme promis, la petite dédicasse) pour l'ambiance qu'elle a créée au sein du service, à base de Queen B, de licornes, de post-it roses et j'en passe. Je te souhaite plein de bonheur dans ta vie professionnelle et personnelle.

Un très grand merci à ma famille, à ma sœur pour leur soutien. A mes amis également, mention spéciale pour les « petites lunes » : Kervadec, Rima, Mams, Adelouchette et Begorre. A ma super coloc qui m'a supportée pendant 4 ans et demie (quand même !!), merci Rima, tu m'as été d'un très grand soutien pendant tout ce temps, on se retrouve dans 1 mois !!!!!!! Merci à Chachatte, Mich et Toto pour s'être déplacés pour assister à ma soutenance, ça m'a fait très plaisir, et puis merci à Féfé et Mathieu pour leur précieuse relecture.



---

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Interaction d'une particule incidente avec un atome, adaptée du cours "Radioactivité" de l'INSTN.....   | 13 |
| Figure 2: Spectre électromagnétique.....  | 15 |
| Figure 3: Absorption d'un photon d'une énergie inférieure à 100 keV, de rayonnement X ou $\gamma$ par effet photoélectrique.....  | 17 |
| Figure 4 : Collision d'un photon et d'un électron atomique .....  | 18 |
| Figure 5: Création de paires, électron-positron (tirée du manuscrit de thèse d'Issiaka Traore, 2013).....   | 19 |
| Figure 6: Effet des photons sur les atomes et probabilités d'occurrence suivant l'énergie du photon initial. ....   | 20 |
| Figure 7: Répartitions des ionisations dans la matière en fonction de l'énergie initiale des photons, pour une dose donnée de 0,5 Gy dans l'eau. ....   | 21 |
| Figure 8: Les différentes utilisations des rayonnements X en médecin.....   | 22 |
| Figure 9 : Cinétique de la radiolyse de l'eau (Bensasson et al., 1993).....   | 27 |
| Figure 10: Structure d'un brin d'ADN .....  | 29 |
| Figure 11: les différents types de dommages de l'ADN (adapté de (Hoeijmakers, 2001)).....   | 30 |
| Figure 12: Chromatine isolée et observée par microscopie électronique à transmission (D. E. Olins & Olins, 2003) .....  | 34 |
| Figure 13: Structure d'un nucléosom .....   | 35 |
| Figure 14: Illustration d'un noyau de cellules, et de la signalisation du dommage par la phosphorylation de l'histone H2A.X sur la serine 139 (appelée $\gamma$ H2A.X), en réponse aux dommages de l'ADN..... | 37 |
| Figure 15: Modèle de relation antagoniste entre les protéines 53BP1 et BRCA1 pour l'accrochage au niveau d'une CDB (adapté de (Panier & Boulton, 2014)).....  | 39 |
| Figure 16: Les 2 mécanismes majeurs de réparation des CDB.....  | 41 |
| Figure 17: Mécanismes de formation des aberrations intra- et interchromosomiques.....   | 43 |
| Figure 18: Représentation des complexes Cyclines/CDK au cours du cycle cellulaire.....  | 46 |
| Figure 19: Morts cellulaires après exposition aux rayonnements ionisants.....   | 50 |
| Figure 20: Illustration de l'effet biologique relatif (EBR).....  | 57 |
| Figure 22: Schéma de la stratégie expérimentale déployée pour la partie biologique .....  | 76 |
| Figure 23: Analyse des images avec le logiciel Scan^R Analyis (Olympus) et détournage des objets principaux et des sous-objets .....  | 82 |
| Figure 24 : Etape de sélection des noyaux en phase G0/G1 du cycle cellulaire .....  | 83 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Figure 25: Calcul de la distance entre les foyers $\gamma$ H2AX au sein des noyaux. Le même calcul a été réalisé pour les foyers 53BP1 .....  | 85  |
| Figure 26: Analyse des films, obtenus par la vidéomicroscopie, en utilisant le logiciel ImageJ et le plug-in MTrackJ. ....  | 87  |
| Figure 27: Montage en sandwich réalisé pour le transfert liquide .....  | 89  |
| Figure 28: Spectres énergétiques des rayonnements X à 40 kV (courbe bleue) et 220 kVp (courbe rose) en utilisant le logiciel SpeckCalc. ....  | 94  |
| Figure 29: Spectres énergétiques des électrons secondaires au niveau du volume cellulaire, obtenus par simulations Monte Carlo, à l'aide de Geant4, sur le SARRP à 40 kVp (courbe bleue), et 220 kVp (courbe rose) et sur l'accélérateur médical à 4 MVp (courbe noire). .... | 95  |
| Figure 30: Pourcentage moyen de co-localisation $\gamma$ H2A.X et 53BP1 au cours du temps, pour toutes les conditions irradiées.....  | 96  |
| Figure 31: Illustration de la cinétique de relocalisation de la protéine 53BP1 dans le noyau..  | 97  |
| Figure 32: Courbe dose effet à 30 min post-irradiation du nombre moyen de foyers $\gamma$ H2A.X mesurés dans les cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 en fonction de la tension des rayonnements ionisants. ....  | 99  |
| Figure 33: Nombre moyen de foyers $\gamma$ H2A.X par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, 30 min après une irradiation à 0,25, 0,5, 1 et 2 Gy.....                | 100 |
| Figure 34: Nombre moyen de foyers $\gamma$ H2A.X par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, 5 h après une irradiation à 5 Gy.....                                   | 101 |
| Figure 35: Nombre moyen de foyers $\gamma$ H2A.X par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, de 5 h à 72 h après une irradiation à 5 Gy. ....                        | 102 |
| Figure 36: Schémas illustrant les valeurs obtenues de la moyenne des distances du plus proche voisin pour un noyau donné. ....  | 105 |
| Figure 37: Distance du plus proche voisin en fonction du nombre de foyers $\gamma$ H2A.X par noyau, du pourcentage de noyau et des énergies des rayonnements X à des doses 2 Gy, 30 min post-irradiation (panel A) et 5 Gy, 5 h post-irradiation (panel B).....               | 107 |
| Figure 38: Schémas illustrant les valeurs obtenues de la distance minimum par noyau du plus proche voisin .....   | 108 |
| Figure 39: Minimum des distances du plus proche voisin en fonction du nombre de foyers $\gamma$ H2A.X par noyau, et suivant l'énergie des rayonnements X utilisée à des doses 2 Gy, 30 min post-irradiation et 5 Gy, 5 h post-irradiation. ....                               | 109 |
| Figure 40: Distribution des distances du plus proche voisin ( $\mu$ m) sur la population de foyers $\gamma$ H2A.X appartenant aux noyaux comportant 29 foyers (panel A) pour les conditions 2 Gy 30   |     |

---

|   |     |
|---|-----|
| min post-irradiation et 14 foyers (panel B) pour les conditions 5 Gy 5 h post-irradiation à 40 kV (histogrammes bleus), 220 kV (histogrammes roses) et 4 MV (histogrammes noirs).....   | 111 |
| Figure 41: Images représentatives d'un évènement de « division cellulaire » (panel A) et de « mort cellulaire » (panel B) chez les cellules primaires HUVEC, à des temps allant de 0 à 30 min pour la division et de 0 à 85 min pour la mortalité. .... | 113 |
| Figure 42: Fréquences de division cumulées ( $\pm$ écart-type) pour la condition contrôle et pour les conditions irradiées à 5 Gy à 40 kV et 4 MV. ....   | 114 |
| Figure 43: Fréquences de division, par pas de temps de 6 h, jusqu'à 96 h post-ensemencement. ....   | 116 |
| Figure 44: Fréquence mortalité, par pas de temps de 6 h, jusqu'à 96 h post-ensemencement. ....  | 118 |
| Figure 45: Evénements et points de transferts dans un volume cible. ....  | 149 |
| Figure 46: Schéma illustrant la modélisation des configurations d'irradiation effectuées sur le SARRP (panel A) et l'accélérateur médical (panel B). ....   | 151 |

---

## LISTE DES TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1: Dommages de l'ADN induits spontanément après une dose de 1 Gray d'irradiation .....  | 30  |
| Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'état de l'art sur la comparaison de différentes énergies de rayonnements X.....  | 71  |
| Tableau 3: Détails des différentes configurations utilisées .....   | 80  |
| Tableau 4: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le protocole de marquage par immunofluorescence. ....   | 81  |
| Tableau 5: Composition du tampon de lyse utilisé pour le Western Blot.....  | 88  |
| Tableau 6: Détails d'incubation des anticorps et des membranes utilisées .....  | 90  |
| Tableau 7: Aire moyenne des foyers $\gamma$ H2A.X. ....   | 103 |
| Tableau 8: Pourcentage du taux d'anomalies de ségrégation pour la condition contrôle, et les conditions irradiées à 5 Gy à 40 kV ou 4 MV, 48 h post-exposition..... | 119 |

---

## Partie 1 : Etat de l'art

# 1. Nature des rayonnements ionisants

Un rayonnement est défini comme une émission d'énergie et/ou d'un faisceau de particules dans un espace. Les rayonnements, dits « ionisants », ont la propriété de provoquer des ionisations et des excitations atomiques dans la matière qu'ils pénètrent.

Une ionisation se produit lorsque l'énergie ( $E$ ) de la particule est suffisante pour éjecter un électron du cortège électronique de l'atome traversé. L'énergie minimale nécessaire est d'environ 10 eV, correspondant à  $1,60 \cdot 10^{-18}$  J. La particule est alors déviée de sa course avec une énergie ( $E'$ ) moins importante (Figure 1A). Une excitation se produit quand la particule transfère une partie de son énergie à un électron du cortège électronique, le faisant changer de couche électronique. Un rayon X est produit lors de la désexcitation de l'électron, c'est-à-dire lorsqu'il regagne sa position initiale (Figure 1B).

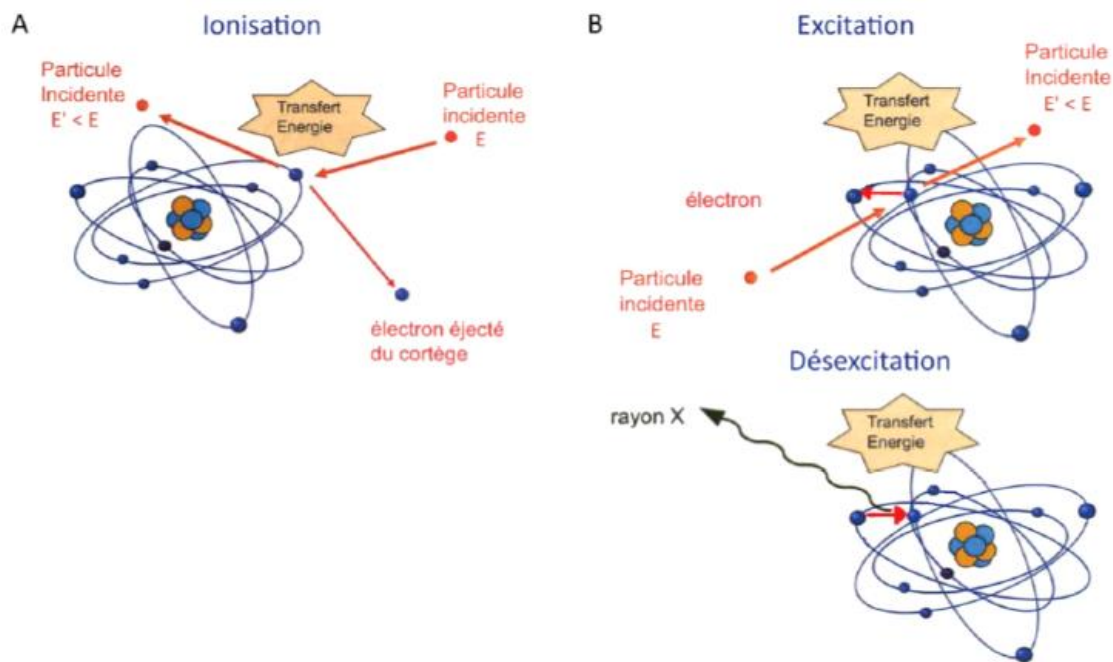


Figure 1: Interaction d'une particule incidente avec un atome, adaptée du cours "Radioactivité" de l'INSTN.

La nature et l'énergie initiale des rayonnements ionisants font varier leur pouvoir de pénétration et d'interactions avec la matière. Nous distinguons les particules ionisantes et les

rayonnements électromagnétiques ionisants.

## 1.1. Les particules ionisantes

Les particules ionisantes possèdent une masse et une charge. Ce sont des particules atomiques ou subatomiques qui portent de l'énergie, exprimée en joule (J), sous forme d'énergie cinétique, du fait de leur mouvement. Les particules ionisantes acquièrent leur énergie cinétique soit par accélération artificielle, soit par désintégration liée à la radioactivité naturelle. Dans le premier cas, les particules ionisantes, de type protons et ions, vont être accélérées à de hautes énergies grâce à des équipements spécialisés tels que les cyclotrons et les accélérateurs, ce qui leur confère leur pouvoir d'ionisation. Dans le deuxième cas, les particules ionisantes sont émises naturellement lors de désintégration de radionucléides, c'est-à-dire lors de la transition d'un atome non stable vers un atome stable ; c'est le cas des électrons/positrons et de l'ion Helium ( $\text{He}^{2+}$ ) (particules  $\beta$  et  $\alpha$ , respectivement). Ces radionucléides peuvent être d'origine naturelle comme l'Uranium 238 et le Carbone 14, ou produits artificiellement comme le Césium 137 et le Cobalt 60.

## 1.2. Les rayonnements électromagnétiques

Les rayonnements électromagnétiques ionisants (rayonnements X et  $\gamma$ ) sont un sous ensemble du spectre d'ondes électromagnétiques. Ce dernier comprend notamment des rayonnements électromagnétiques non ionisants tels que les ondes radio, les micro-ondes, l'infrarouge, la lumière visible et la lumière ultraviolette. Les rayonnements X et  $\gamma$  sont caractérisés par leurs courtes longueurs d'onde (entre  $10^{-10}$  et  $10^{-12}$  m) et leur haute fréquence (entre  $10^{18}$  et  $10^{20}$  Hz) (Figure 2).

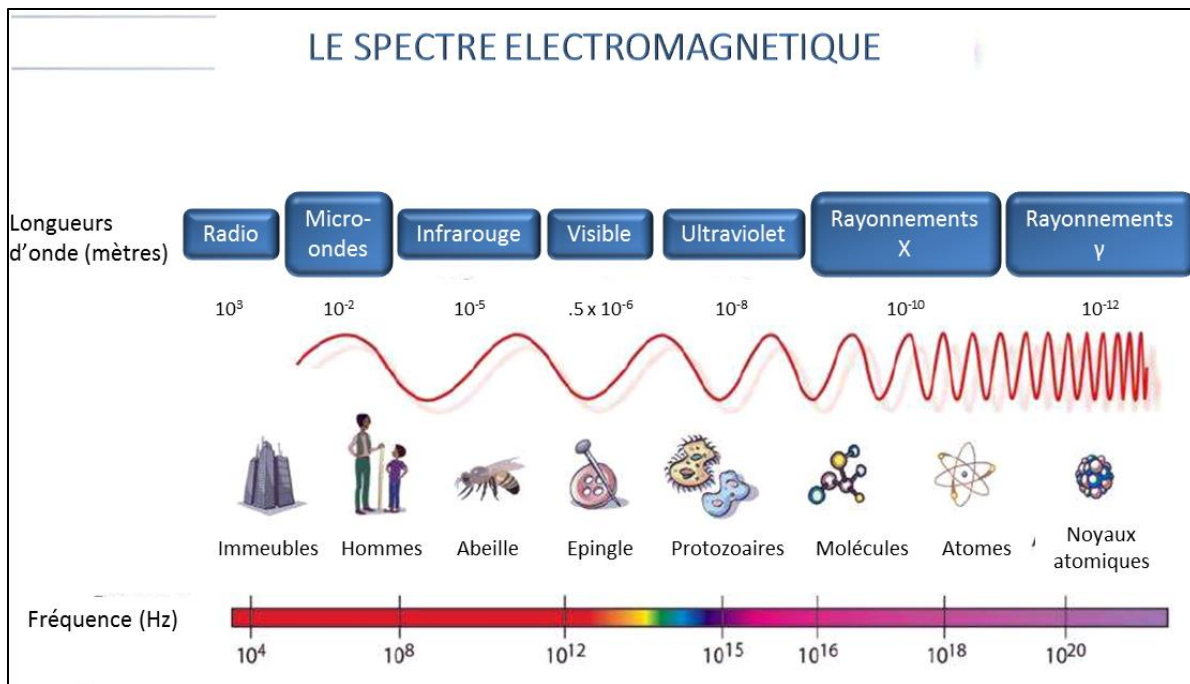


Figure 2: Spectre électromagnétique. Gamme de rayonnements électromagnétiques, y compris les ondes radio, les rayonnements X, la lumière visible, la lumière ultraviolette, les rayonnements infrarouge, les rayonnements gamma et les autres formes de rayonnement (<https://myasadata.larc.nasa.gov/glossary/electromagnetic-spectrum-2/>)

Contrairement aux particules, les rayonnements électromagnétiques n'ont pas de charge ni de masse. Les rayonnements  $\gamma$  ont pour origine une excitation globale du noyau qui se désexcite en émettant un photon (donc en perdant de l'énergie). Cette excitation initiale du noyau est souvent due à une première désintégration par radioactivité  $\alpha$  ou  $\beta$  et la radioactivité  $\gamma$  accompagne donc souvent ces deux premières, comme dans le cas du Césium 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ) et du Cobalt 60 ( $^{60}\text{Co}$ ). Les rayonnements X, quant à eux, ont pour origine la désexcitation d'un électron lorsqu'il change de couche électronique, ce qui peut avoir lieu lors de la désintégration de certains radionucléides ou être induits de manière artificielle. Les rayonnements X peuvent également être produits par le ralentissement des particules chargées (rayonnement de freinage ou bremsstrahlung). Pour la petite histoire, les rayonnements X ont

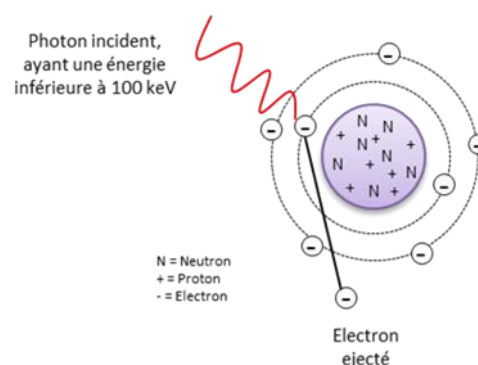


été découverts accidentellement par Wilhelm Röntgen, physicien allemand en 1895 (Röntgen, 1896). Celui-ci procédait alors à des expériences sur les rayons cathodiques, c'est-à-dire le rayonnement produit par un fil transportant un courant électrique à travers un tube vide. Quand ces rayons entrent en collision avec la matière, il en résulte un rayonnement secondaire. Ce rayonnement secondaire est invisible et ne peut être détecté que grâce à son action sur les pellicules photographiques ou sur un appareil, nommé écran fluorescent, lequel produit des étincelles lumineuses lorsque le rayonnement le frappe. Le hasard fit qu'un tel écran se trouvait sur une table voisine alors que Röntgen procédait à son expérience sur les rayons cathodiques. Il constata vite que, quand le tube de Crookes fonctionnait, cet écran devenait fluorescent. C'est ainsi qu'il découvrit le rayonnement secondaire qu'il nomma X. Pour cette découverte, il obtint le prix Nobel de physique en 1901. Les principales constatations sur les rayons X que Wilhelm Röntgen tira de cette découverte sont : ils sont absorbés par la matière ; ils peuvent être diffusés par la matière : c'est le rayonnement de fluorescence ; ils ont la capacité d'impressionner la plaque photographique. Et c'est sur cette dernière constatation que l'utilisation des rayonnements X en médecine commença (Cordoliani, Yves-Sébastien, Foehrenbach, 2014). Désormais, les rayonnements X sont produits par un générateur à rayons X ou par un synchrotron. En bref, un filament métallique chauffé (cathode) émet des électrons qui sont attirés et accélérés par une différence de potentiel vers l'anode, constitué d'un métal lourd (tungstène le plus souvent, molybdène pour les tubes de mammographie). L'énergie des photons sera déterminée en fonction de l'énergie cinétique donnée aux électrons accélérés entre l'anode et la cathode. De par leur origine, les grandeurs énergétiques des rayonnements X et  $\gamma$ , ne sont pas les mêmes (Figure 2). Dans le cas des rayons X, c'est un spectre énergétique continu qui est obtenu alors que pour les rayonnements  $\gamma$  se sont une ou plusieurs raies mono-énergétiques.

## 2. Interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière au niveau atomique

Les rayonnements électromagnétiques peuvent ioniser directement les atomes. Ainsi, ils ont la capacité d'arracher des électrons au cortège électronique selon 3 manières, en fonction de l'énergie du photon incident et de la constitution de la cible: par effet photoélectrique, par effet Compton et par création de paires. Les électrons créés vont eux-mêmes devenir ionisants, et vont eux-mêmes arracher des électrons. C'est ce phénomène en cascade qui est à l'origine de la très grande majorité des ionisations produites dans la matière exposée aux rayonnements X. Les électrons secondaires créés par effet photoélectrique, Compton ou par création de paires n'auront pas le même profil énergétique, et leur énergie initiale va conditionner la distribution spatiale de leurs interactions dans la matière (Galle, P, Paulin, 2000).

L'effet photoélectrique, représenté sur la Figure 3, résulte du transfert de la totalité de l'énergie du photon incident sur un électron des couches K, L, M ou N de l'un des atomes de la cible. L'effet photoélectrique est prédominant à basse énergie (énergies inférieures à 100 keV dans l'eau ; Figure 3) (Gambini, Denis-Jean, Granier, 2007).



### Effet photoélectrique

Figure 3: Absorption d'un photon d'une énergie inférieure à 100 keV, de rayonnement X ou  $\gamma$  par effet photoélectrique.

L'effet Compton, représenté par la Figure 4, résulte de l'interaction entre un photon incident et un électron libre dont l'énergie est négligeable. Au cours de cette interaction qui peut être décrite comme une collision, l'électron dit électron Compton (énergies comprises entre 1 MeV et 15 MeV dans l'eau ; Figure 4), acquiert de l'énergie et génère un photon diffusé. L'effet Compton concerne la plupart des électrons atomiques de la matière. Lors de la collision, l'électron est mis en mouvement selon un certain angle, alors que le photon diffusé selon un autre angle perd de son énergie (Gambini, Denis-Jean, Granier, 2007).

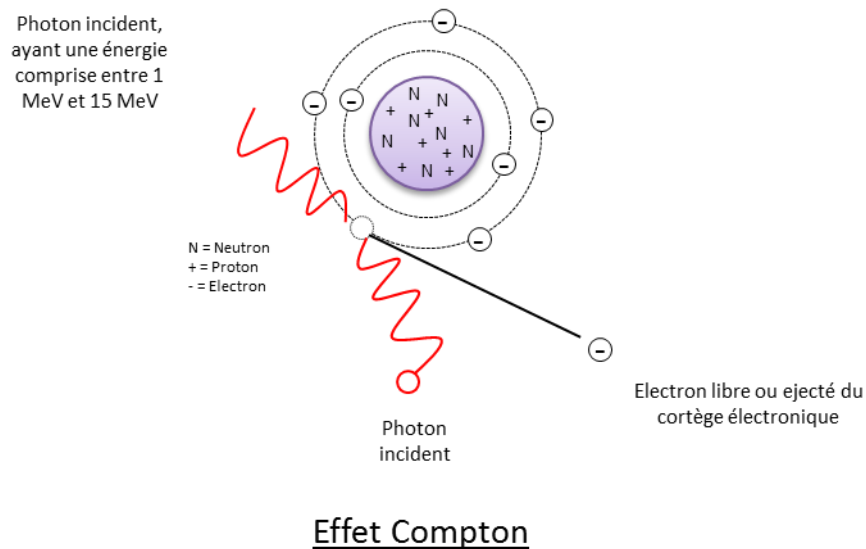


Figure 4 : Collision d'un photon et d'un électron atomique

La création de paires est un processus qui se produit pour des photons très énergétiques (au-dessus de 1,02 MeV dans l'eau ; Figure 5) passant à proximité d'un noyau. Cette production crée une paire de particules, un électron et son antiparticule, un positron (Gambini, Denis-Jean, Granier, 2007).

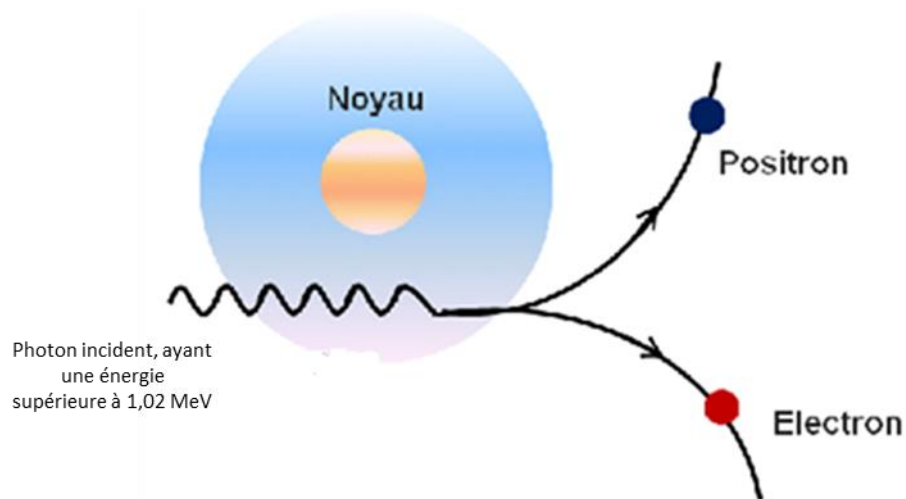


Figure 5: Création de paires, électron-positron (tirée du manuscrit de thèse d'Issiaka Traore, 2013).

La Figure 6 représente la probabilité qu'un photon produise un de ces trois effets lors de son interaction avec les molécules d'eau en fonction de son énergie initiale. Dans les trois cas, il y a arrachage d'électrons ou production d'électrons/positons secondaires qui auront une énergie dépendante de celle du rayon X incident. Cette énergie va conditionner la capacité et la probabilité d'interaction de ces électrons secondaires avec la matière avoisinante. Ainsi, la répartition dans la matière de l'ensemble des ionisations/excitations produites, va dépendre, entre autre, de l'énergie des rayons X incidents (Figure 7).

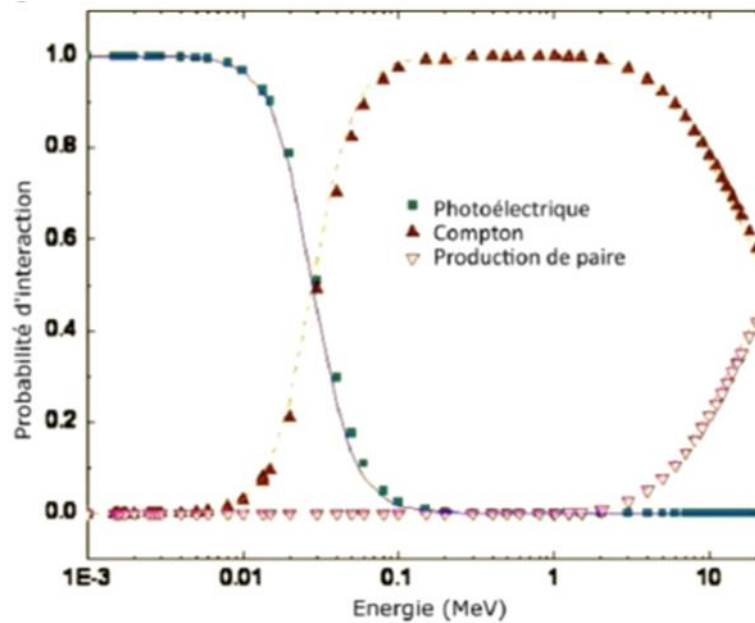


Figure 6: Effet des photons sur les atomes et probabilités d'occurrence suivant l'énergie du photon initial. Graphique représentant la probabilité qu'un photon produise un de ces 3 effets lors de son interaction avec les molécules d'eau en fonction de son énergie initiale. Lorsque l'énergie du photon initial est inférieure à 30 keV, l'effet photoélectrique est majoritaire ; entre 1 MeV et 15 MeV, l'effet Compton est majoritaire ; au-delà de 15 MeV, la création de paires est majoritaire, adaptée de (Gorjiara et al., 2011).

Les photons plus énergétiques, interagissant principalement par effet Compton, vont générer des ionisations au sein de la matière distribuée dans l'espace de manière plus homogène en raison du profil énergétique relativement élevé des électrons secondaires générés (simulation Monte Carlo de la Figure 7, panel A, illustrant la distribution spatiale des ionisations induites par des électrons secondaires issus du Cobalt 60). En revanche, les photons de basse énergie, interagissant dans l'eau majoritairement par effet photoélectrique, vont générer des électrons secondaires moins énergétiques produisant, à l'échelle micrométrique, une distribution spatiale des interactions plus hétérogène, sous forme de trace d'interactions corrélées (simulation Monte Carlo de la Figure 7, panel B, illustrant la distribution spatiale des ionisations induites par des électrons secondaires issus d'un rayonnement mono-énergétique de 12 keV).

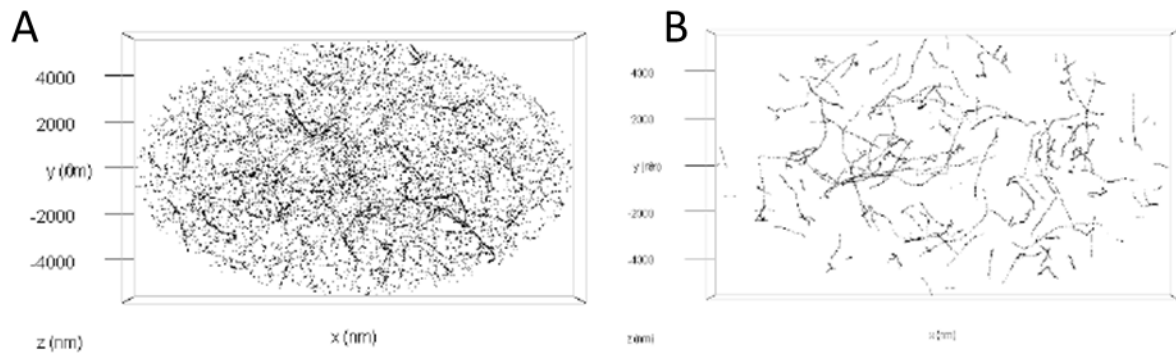


Figure 7: Répartitions des ionisations dans la matière en fonction de l'énergie initiale des photons, pour une dose donnée de 0,5 Gy dans l'eau A) Simulations Monte Carlo d'une irradiation au cobalt 60 ( $Co^{60}$ ), illustrant en majorité l'effet Compton, B) Simulation Monte Carlo d'une irradiation avec des photons monoénergétiques de 12 keV, illustrant en majorité l'effet photoélectrique. Travaux réalisés par Carmen Villagrasa et Gaëtan Gruel à l'IRSN.

La quantité d'énergie cédée à la matière irradiée lors de ces interactions est à l'origine de la grandeur utilisée pour quantifier une irradiation. Ainsi, la somme des énergies cédées (en J ;  $1 \text{ joule} = 6,24 \cdot 10^{18} \text{ eV}$ ) par unité de masse (kg) correspond à la dose absorbée, exprimée en Gray (Gy).

### 3. Utilisation des rayonnements X par l'Homme

Les rayonnements X sont utilisés pour de nombreuses applications dans le domaine industriel ou encore médical. L'utilisation des rayonnements X en médecine peut être définie en fonction de leur énergie. Les rayonnements X de basse énergie et d'énergie intermédiaire (en keV) sont utilisés en radiodiagnostic (mammographie, scannographie, radiographie classique), radiologie interventionnelle et radiothérapie de contact, tandis que les rayonnements X de plus haute énergie (en MeV) sont utilisés lors de radiothérapie (Figure 8, panels A et B).

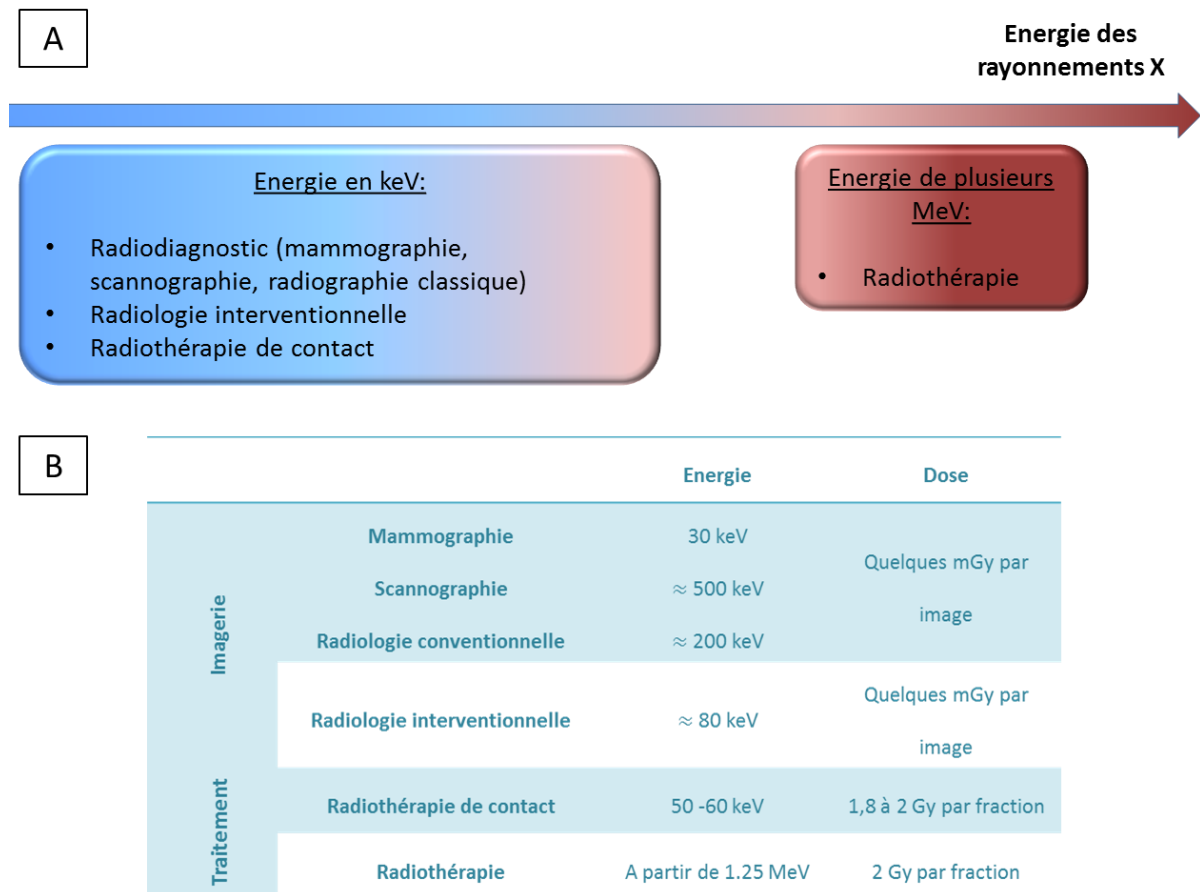


Figure 8: Les différentes utilisations des rayonnements X en médecine A) en fonction de l'énergie des rayonnements X ; B) Différentes techniques de diagnostic et de traitement utilisées avec les rayonnements X, ainsi que leurs énergies et leurs doses utilisées. Informations tirées du (De **Rapport DRPH/SER n°2010-12 de l'IRSN**, 2010), (**Labattu et al., 2013**) et du site de l'**IRSN**.

### 3.1. Imagerie

L'imagerie est fondée sur le principe de l'atténuation différentielle des rayons X par les organes et tissus du corps humain, en fonction de leur densité. La radiologie conventionnelle, la plus ancienne des applications médicales des rayonnements ionisants, permet l'exploration morphologique du corps humain en utilisant les rayons X produits par des générateurs électriques. La mammographie nécessite des appareils spécialisés, adaptés à la glande mammaire. Le scanner utilise les mêmes propriétés des rayonnements mais l'acquisition de l'image est réalisée par la rotation de la source autour du patient, combinée à un déplacement longitudinal, permettant d'obtenir une image du corps humain en volume (INRS, 2011).

La radiologie interventionnelle, dans sa définition la plus générale, associe simultanément une technique d'imagerie et un geste invasif à visée diagnostique et/ou thérapeutique. L'intervention percutanée, effectuée sous anesthésie locale ou générale est en effet préparée, guidée et contrôlée par l'image (Labattu et al., 2013).

### 3.2. Traitement

La radiothérapie est une méthode de traitement localisé des cancers, utilisant des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses tout en épargnant au maximum les tissus sains périphériques. Les protocoles de radiothérapie sont définis principalement en fonction du type de tumeur, de sa localisation, de sa taille, de son extension et de son grade. Une radiothérapie classique délivre la dose par fraction de 2 Gy, une fraction par jour, 5 jours par semaine. Cette approche thérapeutique est fondée sur le fractionnement de la dose d'irradiation pour permettre, entre chaque séance d'irradiation, aux tissus sains traversés par le faisceau d'irradiation de se régénérer plus rapidement que la tumeur (IRSN, n.d.)

Il existe un autre type de traitement qui utilise des rayonnements X de basse énergie : la radiothérapie de contact. C'est une technique d'irradiation dont la source est appliquée au



contact de la lésion à irradier. La radiothérapie de contact est une alternative thérapeutique à la chirurgie. Elle permet techniquement de réaliser des irradiations localisées, précises sur de petits volumes. De ce fait, cette technique s'inscrit dans une stratégie fondamentale en radiothérapie : l'augmentation de la dose sur le tissu tumoral, tout en minimisant celle aux tissus sains (Gambini, Denis-Jean, Granier, 2007).

### **3.3. Notion de bénéfice/risque dans l'utilisation des rayonnements X en médecine**

Tout acte médical, si anodin soit-il en apparence, présente un risque ; celui-ci n'est acceptable que si l'on attend, en contrepartie, un bénéfice de cet acte ; soigner des patients consiste donc, *in fine*, à évaluer à chaque fois le fameux « rapport bénéfice/risque ».

Au fil des années, les rayonnements X se sont révélés un formidable outil au service de la médecine. Elle a d'abord permis de visualiser l'intérieur du corps humain, grâce à la radiographie, ce qui permet de diagnostiquer des fractures. Puis, elle s'est affirmée comme une arme essentielle dans la lutte contre les cancers, grâce à la radiothérapie, qui devient de plus en plus précise et de plus en plus efficace (Science & Santé, 2011).

L'utilisation des rayonnements X en médecine apporte un bénéfice incontestable, seulement, l'exposition des rayonnements X aux tissus doit être limitée. En effet, après leur découverte par Wilhelm Röntgen, en 1895, les rayonnements X ont été abondamment utilisés. Tout d'abord, un célèbre médecin, venu des Etats-Unis, met au point un fluoroscope qui permet d'observer directement à travers le corps. Un marché fructueux s'ouvre, les fabricants offrent eux-mêmes des démonstrations de fluoroscope et ouvrent des cabinets de radiologie où leurs assistantes tiennent souvent le rôle du cobaye (Tissandier, 1894). Des spectacles sont même organisés dans de grands magasins, utilisant des rayonnements X pour visualiser le pied de leurs clientes. Pourtant, dès 1896, les méfaits des rayonnements X commencent à se faire connaître. Un témoin, démonstrateur en rayonnements X pendant l'été à Londres, et

ayant été exposé plusieurs heures par jour, commence à avoir des symptômes. Sur la peau de ses mains apparaît des tâches foncées, 3 semaines après le début de l'exposition. Puis, sa peau et ses ongles tombent, les doigts enflent et les douleurs sont incessantes (Sansare, Khanna, & Karjodkar, 2011). Au printemps 1897, 2 expérimentateurs qui utilisent des rayonnements X, depuis presque un an, signalent que leur peau s'est épaissie et que leurs ongles sont à la limite de tomber. Par la suite, leurs plaies ne cicatrisent plus et des cancers apparaissent au niveau des parties fortement exposées (Sansare et al., 2011). Bientôt, on comprend au fur et à mesure qu'il faut se protéger des rayons X et des dispositifs se mettent en place à partir de 1921.

L'exposition du patient est donc le résultat d'un compromis entre l'exposition minimale requise pour obtenir une image/détruire la tumeur et l'exposition à ne pas dépasser sous peine d'induire des lésions des tissus inversant le rapport bénéfices/risques. Nous avons vu dans le chapitre 2 « Interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière au niveau atomique » que les rayonnements ionisaient la matière. Ces interactions au sein de la matière biologique sont à l'origine des effets délétères observés sur le vivant.

## 4. L'interaction directe et indirecte des rayons X avec les différents constituants cellulaires

Dans la matière vivante, les atomes sont combinés en molécules (l'eau, les protéines, les lipides et les acides nucléiques). Ils partagent des électrons pour former des liaisons covalentes. Les rayonnements ionisants, en arrachant des électrons, vont être susceptibles de casser ces liaisons covalentes et donc d'endommager des molécules.

Quelle que soit la nature du rayonnement, l'interaction avec les différents constituants cellulaires peut conduire à une lésion directe des molécules contenues dans une cellule eucaryote: les lipides constituant les membranes ; cytoplasmiques, nucléaires mais aussi celles de l'appareil de Golgi ou encore des mitochondries ; les protéines qu'elles soient incluses dans ces membranes ou dans des complexes protéiques fonctionnels peuvent également être altérées ainsi que les acides nucléiques de l'ADN nucléaire, mitochondrial et les ARN. En effet, les atomes de ces molécules peuvent directement être ionisés ou excités initiant ainsi une cascade d'évènements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques. De plus, les interactions des rayonnements sur la molécule d'eau, le composant principal de la cellule, conduisent à la production de radicaux libres oxygénés particulièrement agressifs chimiquement. On parlera alors d'effets indirects des rayonnements ionisants.

### 4.1. Radiolyse de la molécule d'eau

La radiolyse de l'eau fait référence au processus de dissociation de la molécule d'eau, sous l'effet d'un rayonnement ionisant. La cellule étant composée à 80 % de molécules d'eau ( $H_2O$ ), l'interaction entre ces dernières et les rayonnements ionisants reste la plus probable. Cette dissociation ne dure que quelques nanosecondes et entraîne la formation d'espèces radicalaires d'hydrogène et d'hydroxyle, respectivement sous forme de radicaux libres  $H\bullet$  et  $OH\bullet$ . Ces espèces radicalaires sont très réactives et peuvent altérer chimiquement les autres constituants cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques). Ces évènements radiolytiques

se produisent en 3 étapes temporelles (Le Caër, 2011). Tout d'abord, la phase physique, les molécules d'eau sont ionisées ou excitées. Ensuite la phase physico-chimique au cours de laquelle il y a réorganisation des molécules d'eau, ionisées ou excitées, générant la formation de radicaux hydrogène  $H\cdot$  ou hydroxyle  $OH\cdot$ . Et enfin, la phase chimique au cours de laquelle les espèces diffusent dans le milieu et réagissent (Figure 9).

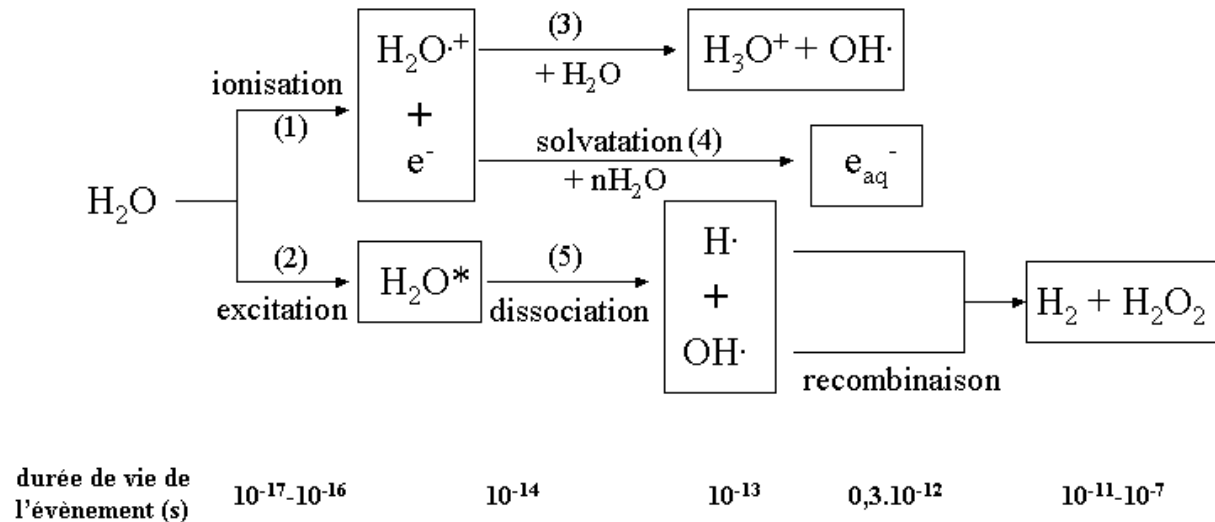


Figure 9 : Cinétique de la radiolyse de l'eau (Bensasson, R, Land, E.J, Truscott, 1993)

Le résultat global de la radiolyse de l'eau est donc l'apparition d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO, ROS en anglais). Les ROS interagissent avec un large panel de molécules organiques à savoir les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Les ROS peuvent induire une altération de la fonction biologique des molécules cibles.

## 4.2 Peroxydation des lipides membranaires

Les membranes cellulaires sont constituées majoritairement de lipides : phospholipides (en double couche), sphingolipides, stérols et glycolipides. Elles permettent de délimiter et maintenir des constituants cellulaires dans des compartiments bien définis.

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. L'irradiation est susceptible, par l'intermédiaire des ROS qu'elle génère, d'induire

de la peroxydation lipidique des constituants membranaires de la cellule. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) (Gutteridge & Halliwell, 1990).

### 4.3 Oxydation des protéines

Les rayonnements ionisants peuvent altérer les protéines cellulaires, impliquées dans les voies de signalisation, et dans le bon fonctionnement de la cellule, directement par impact au niveau des chaînes protéiques ou indirectement via les ROS formés par la radiolyse de l'eau (M. J. Davies, 2003). Il est important de voir que, de par leur fonction dans tous les processus cellulaires, l'altération du pool protéique disponible de la cellule est très délétère pour la réparation des dommages au sens large, donc pour sa survie. Les dommages induits sur les protéines peuvent générer leurs modifications structurales telles que leur fragmentation, leur réarrangement, la modification des acides aminés et la dimérisation par pontages inter- ou intra- protéines ; conduisant à des modifications fonctionnelles telles que la perte d'activité enzymatique, l'altération du processus de protéolyse (Daly, 2012; K. J. Davies, 1987).

### 4.4 Dommages de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique de tous les êtres vivants. Chez l'Homme, chaque cellule contient approximativement 2 mètres d'ADN empaquetés dans un noyau (Wing et al., 1980). La molécule d'ADN est une double hélice composée de deux brins enroulés l'un autour de l'autre. Chaque brin est composé d'une succession de nucléotides qui sont un assemblage de trois molécules : un groupement phosphate, un sucre (désoxyribose) et une base azotée. Chacune de ces chaînes est constituée d'un enchaînement de bases dites puriques (guanine, G ; adénine, A) et pyrimidiques (cytosine, C ; thymine, T). Les bases adénine-thymine (A/T) et cytosine-guanine (C/G) sont complémentaires et cette association est assurée respectivement par deux et trois liaisons hydrogène (Watson & Crick, 1953) (Figure 10).

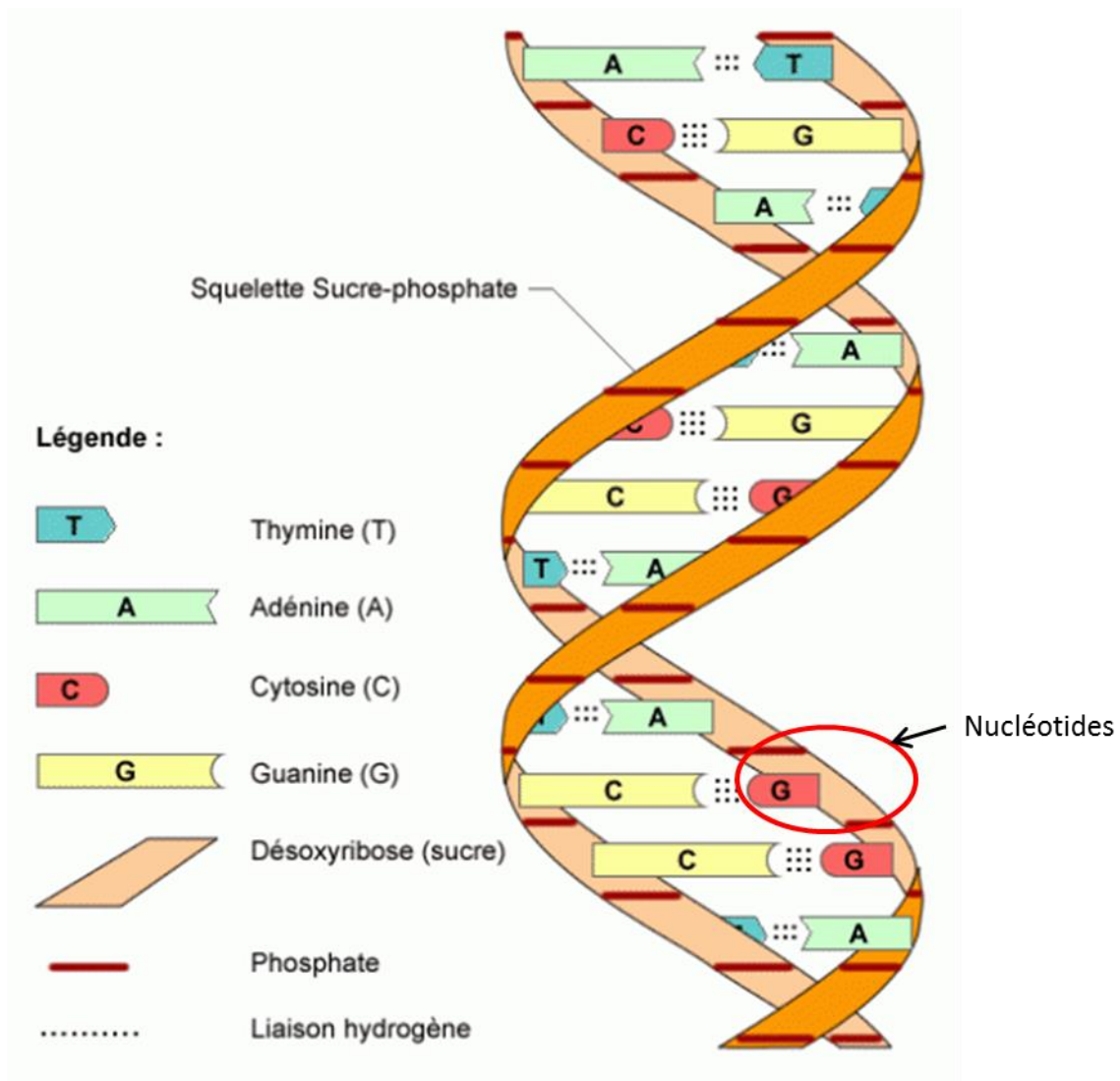


Figure 10: Structure d'un brin d'ADN. L'unité de base est appelé nucléotide et est constitué d'un sucre, d'un phosphate et d'une base Cytosine, Thymine, Adénine ou Guanine. Tirée du site internet « leséditionsdeschavonnes.com ».

Comme l'ensemble des constituants de la cellule, l'ADN peut être endommagé par les rayonnements ionisants de façon directe ou indirecte (ROS), comme illustrés Figure 11. Les altérations peuvent être la formation de sites abasiques, l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques et celles des sucres, la rupture de brin – simple et double –, l'apparition de liaisons covalentes intra-brins ou entre ADN et protéines adjacentes (pontages ADN-protéines) (Figure 11). Les différents types de dommages n'ont pas le même impact sur la cellule et ne seront pas reconnus et traités de la même manière.

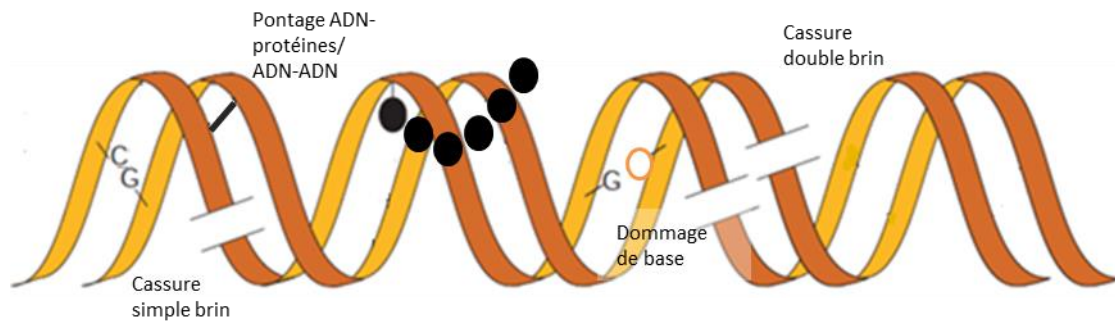


Figure 11: les différents types de dommages de l'ADN (adapté de (Hoeijmakers, 2001))

| Types de dommages                       | Dommages de bases  | Pontages ADN-protéines   | Pontages ADN-ADN   | Cassures simple brin                   | Cassures double brin  |
|---|--|--|--|--|---|
| <b>Nombres d'évènements par cellule</b> | 950  | 150  | 30   | 1000                                   | 40  |
| <b>Système de réparation</b>            | Réparation par excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER) | Réparation par excision de nucléotides (NER) ou Recombinaison Homologue (HR) | Réparation par excision de nucléotides (NER) ou Recombinaison Homologue (HR) | Réparation par excision de bases (BER) | Recombinaison Homologue (HR) ou Jonction des extrémités non homologues (NHEJ) |

Tableau 1: Dommages de l'ADN induits spontanément après une dose de 1 Gray d'irradiation de rayonnements X (d'après (Costes, Chiolo, Pluth, Barcellos-Hoff, & Jakob, 2010; Rothkamm & Löbrich, 2003; Stenerlöw, Karlsson, Cooper, & Rydberg, 2003; Ward, 1988)).

#### 4.4.1 Altération des bases nucléotidiques

Les modifications de bases nucléotidiques résultent essentiellement de l'attaque par les radicaux hydroxyles (Cadet & Wagner, 2013). Les radicaux hydroxyles agissent au niveau du cycle aromatique des pyrimidines (thymine et cytosine) (Cadet, Berger, Douki, & Ravanat, 1997). La lésion la plus fréquente pour la thymine est le glycol de thymine (5,6-dihydrothymine) et pour la cytosine, la 5-hydroxycytosine. Pour les dommages sur les bases puriques, la modification 8-oxoadénine est la modification majeure due à l'oxydation de l'adénine. De la même manière pour la guanine, sa principale modification est la 8-oxoguanine (Singh et al., 2011). Les rayonnements ionisants sont aussi susceptibles de créer des sites abasiques résultant de l'élimination radio-induite d'une base normale.

L'altération du 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles peut provoquer la libération de sucre avec une formation de cassures simple brin. Cependant c'est un phénomène rare (2 à 3 altérations pour 100 cassures simples brins radio induites) (Tubiana, 2008).

#### **4.4.2 Les cassures de l'ADN**

Les cassures simple-brin (CSB) sont les dommages les plus fréquents dans la cellule, soit environ 1000 pour 1 Gy (Tableau 1). Elles surviennent au niveau de la liaison phosphodiester (3' ou 5') entre le phosphate et le désoxyribose, souvent à la suite de l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par un radical OH (Evans, Dizdaroglu, & Cooke, 2004). L'énergie requise pour provoquer une rupture simple brin est de l'ordre de 10 à 20 eV (Hall, Eric J, Giaccia, 2011). Dans les cellules de mammifères, leur induction n'a pas d'impact direct sur la létalité (Dikomey, Dahm-Daphi, Brammer, Martensen, & Kaina, 1998) car leur réparation est très rapide (moins d'une heure).

Une cassure double brin (CDB) est l'association particulière de 2 CSB se produisant simultanément à une distance de moins de 10 paires de bases, dans un temps court, chacune sur un brin différent de la molécule d'ADN (Bernhardt, Friedland, Jacob, & Paretzke, 2003; Nikjoo, O'Neill, Goodhead, & Terrissol, 1997). La fréquence des CDB va donc fortement dépendre de la distribution spatiale des CSB. Cette association va conduire à la rupture de la molécule d'ADN. Du fait de la rupture de la double hélice de l'ADN, les CDB sont beaucoup plus délétères pour le génome, et les mécanismes de réparation qui en découlent sont spécifiques.



## ○ POINT METHODOLOGIQUE : Mesure de la fragmentation de la molécule d'ADN

L'accumulation de CDB se traduit par la fragmentation de la molécule d'ADN. Ainsi, plus la dose augmente, plus la fréquence de CDB augmente, plus le nombre de fragments augmente et plus leur taille diminue. La mesure de la fragmentation de l'ADN permet de quantifier indirectement le nombre de CDB de la molécule d'ADN. Une des premières méthodes utilisées pour quantifier les CDB via la fragmentation de la molécule d'ADN a été l'électrophorèse. L'électrophorèse a été imaginée en 1892 par S.E. Linder et H. Picton. Les fragments d'ADN, étant chargés négativement, placés dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique, migrent vers l'anode, chargée positivement, en fonction de leur taille. Si l'ADN est très endommagé, les fragments seront de plus petites tailles, et migreront plus loin, et inversement. Cette technique nécessite une quantité d'ADN importante pour pouvoir visualiser et quantifier la fragmentation. La mesure est donc réalisée sur un extrait d'ADN provenant de centaines de milliers de cellules.

Le test des comètes découle de l'électrophorèse. Cette technique utilise le même principe de base : si l'ADN n'a pas été endommagé (reste sous forme super enroulé), il sera révélé sous forme d'une sphère compacte dans le gel d'agarose ; si l'ADN a été endommagé, celui-ci présentera en plus des fragments simples et doubles brins (plus légers) qui migreront en dehors de cette sphère formant un "halo" d'ADN qui s'étirent en direction de l'anode et décrivent la queue de la comète. Cette technique permet une mesure cellule par cellule via la taille de la queue de comète (Hall, Eric J, Giaccia, 2011).

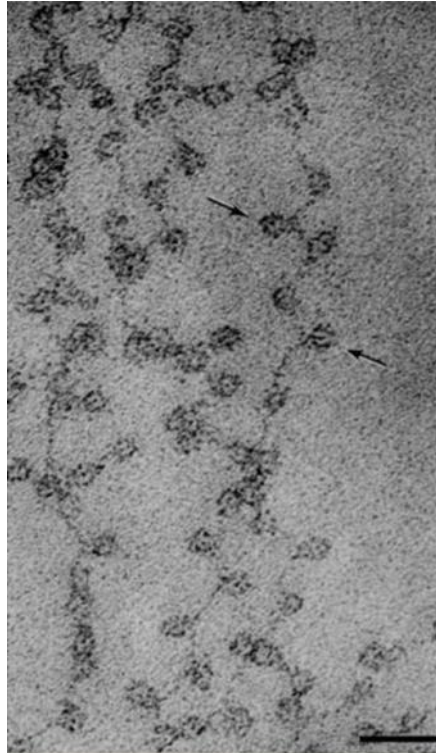
Ces 2 techniques ont le désavantage d'être très peu sensibles, c'est-à-dire que le niveau de dose minimale pour obtenir un niveau de fragmentation quantifiable est de plusieurs dizaine de Gy.

## 5. Signalisation des cassures double brin et prise en charge des dommages

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la molécule d'ADN est organisée sous forme de chromatine. Grâce à la modulation de son architecture, cette structure permet de contrôler l'accessibilité de la molécule d'ADN, aux protéines de réplication, de transcription ou de réparation. Une cassure double-brin de l'ADN implique donc, non seulement, la perte de l'intégrité de la séquence d'ADN mais également la perturbation locale de la structure de la chromatine. Cette modification de la chromatine va induire la relocalisation successive de protéines qui vont signaler à l'endroit du dommage et maintenir les brins d'ADN lésés.

### 5.1. Organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine

L'histoire de la chromatine commence avec Walther Flemming, qui suggère le nom de « chromatine » (Flemming, 1882). Par la suite, Albrecht Kossel continue les recherches, décrivant en 1884, l'histone dans des noyaux d'érythrocytes aviaires. Presque un siècle plus tard, en 1974, Olins & Olins *et al* (A. L. Olins & Olins, 1974), visualisent au microscope électronique la sous-unité répétitive de la chromatine (Figure 12). C'est seulement en 1975 que le terme de « nucléosome » est proposé par Oudet *et al* (Oudet, Gross-Bellard, & Chambon, 1975).



*Figure 12: Chromatine isolée et observée par microscopie électronique à transmission (D. E. Olins & Olins, 2003)*

Le nucléosome est la sous-unité répétitive fondamentale de la chromatine, il lui confère sa structure en « collier de perles » (Happel & Doenecke, 2009). Un nucléosome est composé de protéines appelées histones et couplées en hétérodimères : H2A – H2B et H3 – H4 (Figure 13, panels A et B). Le cœur de l'histone est donc composé d'un octamère d'histones (D. E. Olins & Olins, 2003). L'octamère est enveloppé par 1.7 tours d'ADN (~147 pb) (D. E. Olins & Olins, 2003). L'histone H1, quant à elle, est adjacente au cœur du nucléosome et permet le maintien de l'enroulement de la double hélice d'ADN. Les histones H2A, H2B et H3 possèdent plusieurs isoformes non alléliques. Ces isoformes sont définies comme variant d'histone par homologie de séquence des gènes (Talbert et al., 2012).

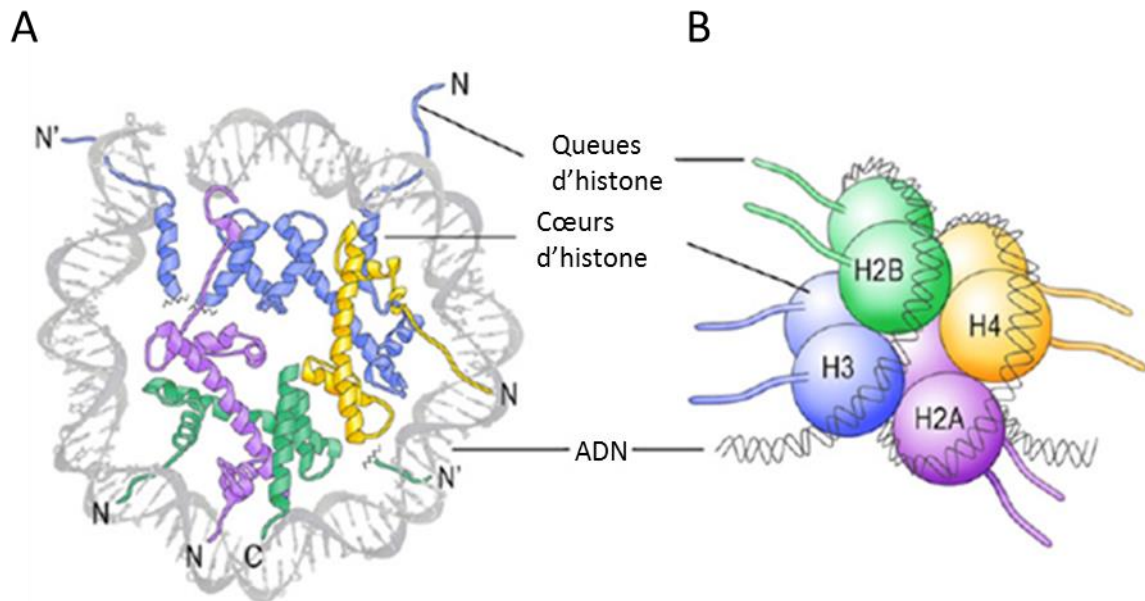


Figure 13: Structure d'un nucléosome. A. Vue d'un nucléosome dans l'axe de la double hélice d'ADN ; B. Représentation schématique d'un octamère, H2A, H2B, H3 et H4 (Gräff & Mansuy, 2008)

La structure précise d'un nucléosome a été déterminée par diffraction aux rayons X (D. E. Olins & Olins, 2003). De part et d'autre du domaine structuré, appelé motif « histone fold », se trouvent les queues N-terminales non structurées et les domaines C-terminaux (Figure 13, panel A).

Les histones ont un rôle important dans les changements d'état de la chromatine participant, entre autres, à la régulation de l'expression des gènes (Allfrey, Faulkner, & Mirsky, 1964). Ces changements interviennent au cours de la transcription, de la phase du cycle cellulaire et de la réparation des dommages (Lusser & Kadonaga, 2003). Pour cela, trois modalités ont été décrites : la modification post-traductionnelle des histones, le remodelage de la chromatine par échange (déposition/reposition) de nucléosomes et celui par déplacement de nucléosomes le long de la double hélice d'ADN (Bhaumik, Smith, & Shilatifard, 2007; Kouzarides, 2007; Strahl & Allis, 2000).

## 5.2. Modifications post-traductionnelles

Dans le but de contrôler l'accessibilité à la molécule d'ADN, la structure de la chromatine doit être modulée dynamiquement. Ces modifications chimiques post-traductionnelles sont majoritairement retrouvées au niveau des queues C et N-terminales des histones. Quatre mécanismes modifiant la compaction de la chromatine sont bien caractérisés. Ces modifications incluent la méthylation des résidus arginine (R) ; l'acétylation , l'ubiquitinylation de la lysine (K) ; et la phosphorylation des serines et thréonines (S et T) (Li, Carey, & Workman, 2007). Ces modifications peuvent directement moduler les interactions histones – ADN.

Les quatre queues d'histones du nucléosome contiennent des sites accepteurs qui peuvent être phosphorylées par des protéines kinases et déphosphorylées par des phosphatases. Plus particulièrement, la phosphorylation du variant d'histone H2A.X joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998). Elle est impliquée dans la signalisation des dommages de l'ADN (van Attikum & Gasser, 2005) qui a lieu quelques minutes après la création d'une CDB (Redon et al., 2010; Thiriet & Hayes, 2005). Les kinases responsables de cette modification font partie de la famille des phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases (PIKK) telles que ATM (ataxia-telangiectasia mutated protein), ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) et DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) (van Attikum & Gasser, 2005).

## ○ POINT METHODOLOGIQUE : Quantification *in situ* des CDB signalisées par la cellule

Lorsqu'une CDB de l'ADN est induite, il y a mise en place d'une cascade de signalisation puis de réparation du dommage. Un certain nombre de protéines sont donc mobilisées et co-localisées au niveau du site de la cassure. La détection par immunofluorescence de ces différentes protéines permet de visualiser de façon indirecte les CDB sous forme de foyers nucléaires. Techniquement, les cellules ou les coupes de tissus sont incubées avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine de signalisation/réparation d'intérêt, puis incubées avec un second anticorps dirigé contre le premier et couplé à un fluorochrome. La quantification du taux de CDB signalisées à un instant  $t$  par la cellule peut être faite de deux manières : la microscopie à fluorescence permettant de localiser et de dénombrer *in situ* les foyers nucléaires (Figure 14); par cytométrie en flux permettant de les quantifier de façon intégrée au noyau par estimation d'une intensité globale.

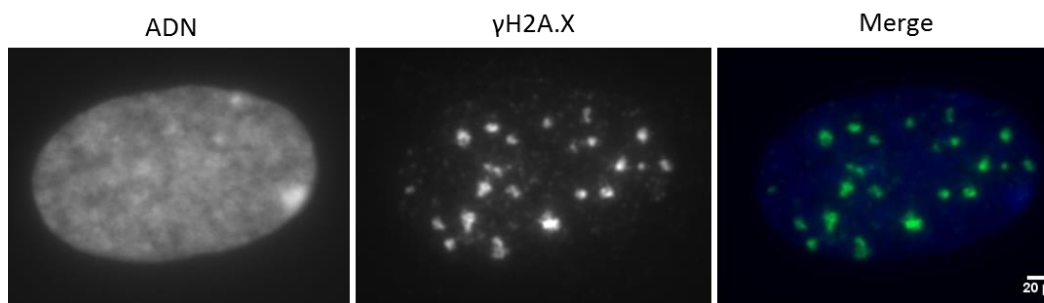


Figure 14: Illustration d'un noyau de cellules, et de la signalisation du dommage par la phosphorylation de l'histone H2A.X sur la serine 139 (appelée  $\gamma$ H2A.X), en réponse aux dommages de l'ADN.

## 5.4. Signalisation du dommage de l'ADN et sa réparation

### 5.4.1. Généralités

ATM, ATR et DNA-PK sont les 3 kinases clés régulatrices de la réponse aux dommages. ATM, ATR et DNA-PK peuvent être activés par des complexes se formant aux sites de cassures comme les complexes Mre-11-Rad50-Nbs1 (MRN), l'hétérodimère Ku70/Ku80 et RPA via ATRIP (Paulsen & Cimprich, 2007; Smith & Jackson, 1999; Uziel et al., 2003).

Dans les cellules humaines, l'activation d'ATM est caractérisée par sa monomérisation et son autophosphorylation sur trois sites (Ser<sup>367</sup>, Ser<sup>1893</sup> et Ser<sup>1981</sup>) (Bakkenist & Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006), ce qui permet son recrutement aux sites de dommages. Une fois activé, ATM peut ensuite phosphoryler une multitude de protéines, et notamment la Ser 139 de l'histone H2A.X. Ceci permet le recrutement de MDC1 (Stucki et al., 2005) qui contribue à l'amplification du signal via le recrutement de la protéine RNF8. Cette E3 ubiquitine ligase permet l'ubiquitinylation de l'histone H2A et H2A.X afin de réguler le recrutement de protéines, comme 53BP1, qui participent à la signalisation du dommage (Kinner, Wu, Staudt, & Iliakis, 2008; Lee, Goodarzi, Jeggo, & Paull, 2010). 53BP1 est un facteur clef de la signalisation et de la réparation de l'ADN, puisque son association avec les CDB favorise la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Une autre protéine de signalisation est la protéine BRCA1 qui est impliquée dans l'autre voie de réparation : la recombinaison homologue (HR) (Figure 15) (Chapman, Taylor, & Boulton, 2012). 53BP1 et BRCA1 sont antagonistes: 53BP1 favorise la voie NHEJ et inhibe la voie HR, et inversement pour BRCA1 (Chapman et al., 2012; Daley & Sung, 2014). La protéine 53BP1 possède des domaines de reconnaissance de l'histone H4 méthylée 2 fois sur la lysine 20 (H4K20me2) et de l'histone H2A ubiquitinylée sur la lysine 15 (H2AK15ub), permettant son maintien au niveau du dommage (Panier & Boulton, 2014) et recrute des effecteurs RIF1 (RAP1-interacting factor 1) et PTIP (PAX transactivation activation domain-interacting protein). A contrario, au niveau de la zone lésée, l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16 (H4K16) serait un des acteurs de l'exclusion de la protéine 53BP1 (Hsiao & Mizzen, 2013) car elle rendrait inaccessible le groupement diméthyle de sa lysine 20 (Panier & Boulton, 2014). L'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16 (H4K16ac), en empêchant la fixation de la protéine 53BP1, permettrait l'association de la protéine BRCA1 au niveau de la cassure double brin (Figure 15).

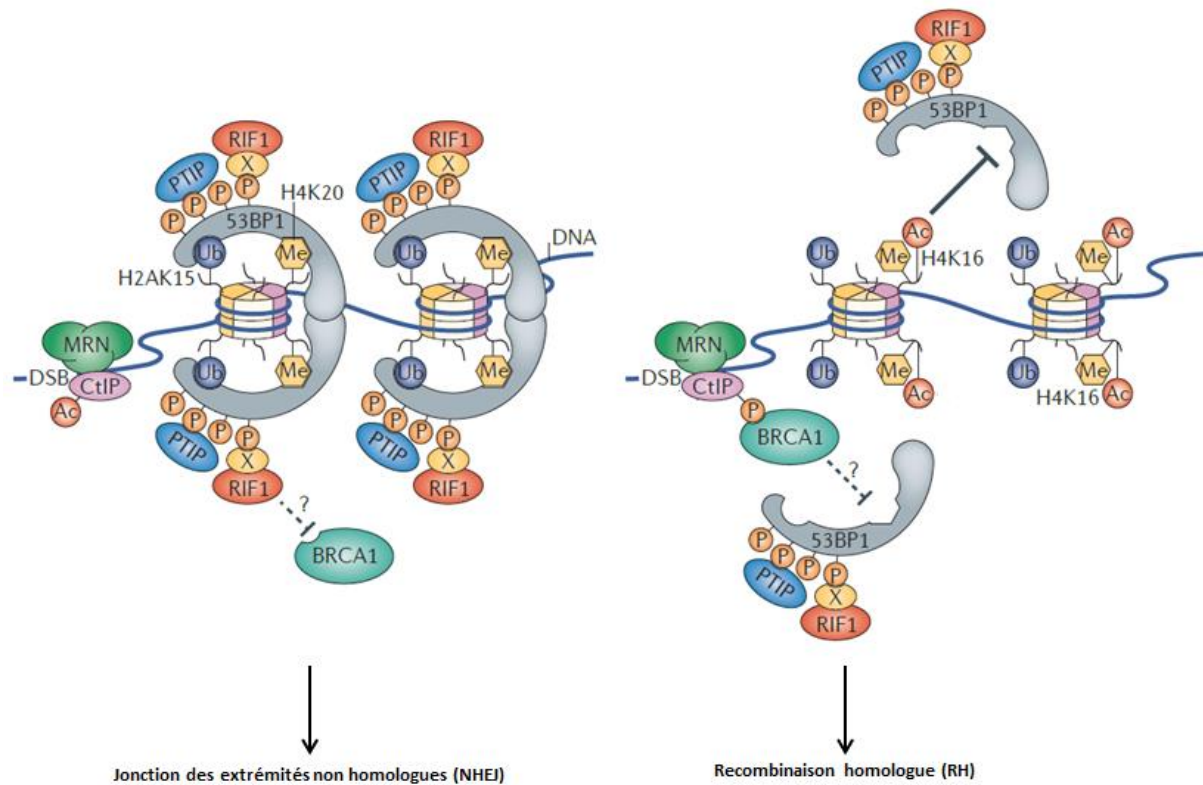


Figure 15: Modèle de relation antagoniste entre les protéines 53BP1 et BRCA1 pour l'accrochage au niveau d'une CDB (adapté de (Panier & Boulton, 2014))

A l'issu de ce processus de signalisation des dommages de l'ADN, deux mécanismes majeurs de réparation des CDB se mettent en place: la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (RH) (Figure 16).

La jonction des extrémités non homologues est le mécanisme majoritaire de réparation des CDB. Il peut avoir lieu tout au long du cycle cellulaire, car contrairement au RH, il ne requiert pas d'homologie de séquence. Ce processus commence par la reconnaissance de la cassure par le complexe senseur Ku (Ku70/Ku80). Cet hétérodimère qui possède une structure en anneau est capable d'entourer l'ADN lésé sur environ deux tours d'hélice. La partie C-terminale de Ku80 possède douze acides aminés interagissant directement avec DNA-PKcs (Williams et al., 2014). Ensuite, DNA-PKcs, accompagnée de la protéine Artemis, est recrutée sur le lieu de la CDB. DNA-PKcs, en phosphorylant Artemis, lui permet d'acquérir une activité d'endonucléase. Ainsi, Artemis « nettoie » la CDB en 3' et 5' permettant la



formation d'extrémités franches (Ma, Pannicke, Schwarz, & Lieber, 2002). Le complexe ligase IV-XRCC4 peut ensuite agir en ligant les deux extrémités de la double hélice d'ADN (Ma et al., 2004).

La voie de réparation la plus fidèle est basée sur la recherche d'homologie entre les brins d'ADN pour réparer l'ADN lésé et s'appelle la recombinaison homologue (RH). Lorsque les CDB ont lieu en phase S, après le passage de la fourche de réplication, et au début de la phase G2, les deux chromatides sœurs sont présentes dans le noyau, et situées « géographiquement » proche l'une de l'autre. La partie d'ADN lésée peut être réparée à l'aide de la séquence homologue située sur la chromatide sœur non endommagée (Karanam, Kafri, Loewer, & Lahav, 2012). Ce mécanisme nécessite une grande résection des extrémités 3' permettant la formation d'ADN simple-brin. Dans ce cas, pKu70/80 sont éliminés pour permettre la résection, des brins dans le sens 3'-5', faite par des protéines ayant des activités d'exonucléase et endonucléase telles qu'Exo 1, Mre11 et CtIP. Ensuite, la formation des filaments de RPA (replication protein A), protéine qui se lie à l'ADN simple brin et qui va permettre de protéger l'ADN de l'action des nucléases. RPA est ensuite remplacée par la protéine Rad 51 permettant l'initiation de l'appariement et l'invasion du brin de la chromatide homologue pour former un duplex d'ADN homologue (jonction de Holliday). Les jonctions de Holliday sont ensuite résolues par des endonucléases appelées résolvas, telles que MUS81 et MMS4 (McIlwraith et al., 2005).

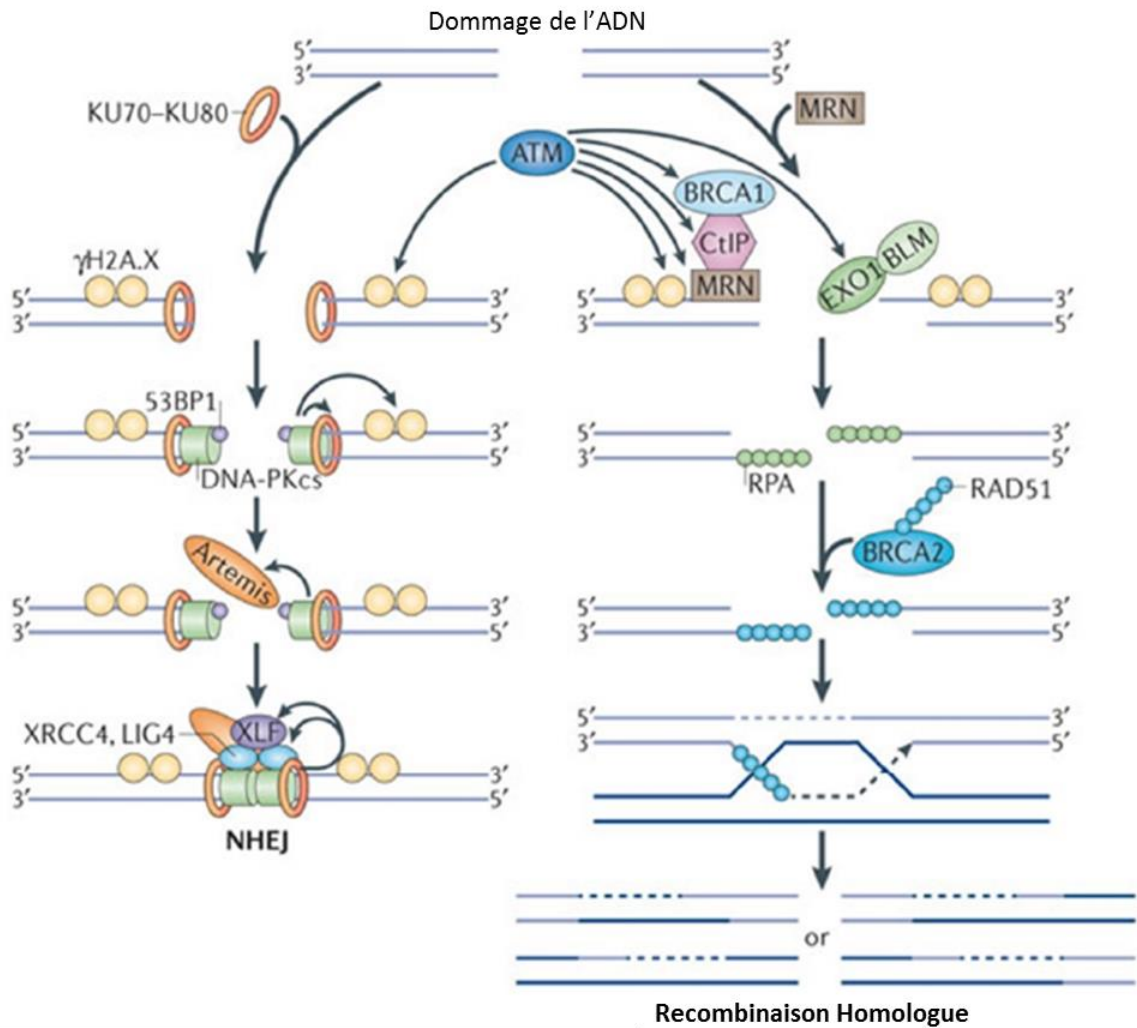


Figure 16: Les 2 mécanismes majeurs de réparation des CDB. Les CDB sont reconnues soit par le MRN soit par le complexe Ku, ce qui active la signalisation des dommages et leur réparation par Recombinaison Homologue ou NHEJ (d'après (Chowdhury, Choi, & Brault, 2013)).

#### 5.4.2. Cas des aberrations chromosomiques

Les aberrations chromosomiques radioinduites se forment principalement lors du processus de réparation des CDB de l'ADN. En effet, la réparation de CDB peut conduire soit à la restauration du chromosome altéré soit à l'apparition d'aberrations chromosomiques. La formation des aberrations chromosomiques est dépendante de la répartition spatiale et temporelle des CDB dans le noyau puisque pour former une aberration chromosomique, il faut que 2 CDB soient formées simultanément et proches l'une de l'autre. La principale cause

de la formation des aberrations chromosomiques est une mauvaise suture des deux morceaux de chromosomes via la voie de réparation NHEJ. Différents paramètres sont susceptibles d'influencer la formation d'aberrations chromosomiques suite à une exposition aux rayonnements X. Le premier paramètre concerne la dose utilisée, plus elle augmente, plus la densité de CDB augmente, et donc plus la probabilité de former des aberrations chromosomiques augmente. Le deuxième paramètre est le débit dose, car comme mentionné plus haut, pour former une aberration chromosomique, il faut que 2 CDB soient formées simultanément, dans un volume critique. Ainsi, à dose égale, plus le débit dose diminue et moins il y a de chance de former une aberration chromosomique. Le dernier paramètre influençant la formation d'aberrations chromosomiques est l'énergie du rayonnement utilisé, car la densité d'ionisation n'est pas la même entre une particule  $\alpha$  et un électron, par exemple. L'énergie des particules va conditionner la probabilité de formation de CDB dans l'espace et donc la formation d'aberrations chromosomiques (Hone, Edwards, Lloyd, & Moquet, 2005; Loucas, Eberle, Bailey, & Cornforth, 2004).

Lors de la réparation des CDB de l'ADN, plusieurs types d'aberrations chromosomiques peuvent être générés. Si les 2 CDB à l'origine de la formation d'une aberration chromosomique sont situées sur un même chromosome, ces aberrations sont appelées intrachromosomiques, et mènent à la formation d'anneaux centriques et de fragments acentriques. Si les 2 CDB à l'origine de la formation d'une aberration chromosomique sont situées sur 2 chromosomes différents, ces aberrations sont appelées interchromosomiques et génèrent des chromosomes dicentriques, des fragments acentriques et des translocations (Figure 17).

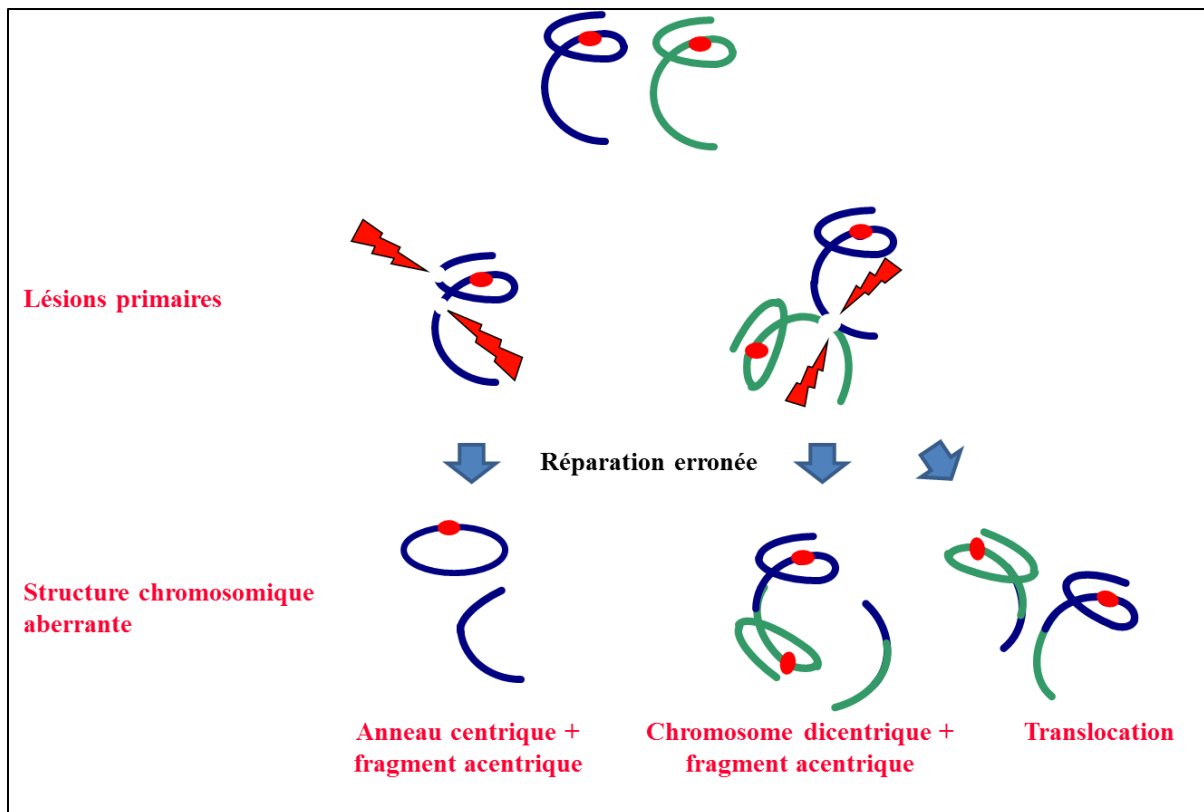


Figure 17: Mécanismes de formation des aberrations intra- et interchromosomiques.

Lorsqu'il y a plus de 3 CDB dans un certain volume critique, cela va entraîner une augmentation de la complexité des aberrations chromosomiques susceptibles d'être formées, comme par exemple l'apparition de chromosomes tricentriques ou encore des insertions.

La formation d'aberrations chromosomiques a des conséquences sur le vivant. Lorsque la cellule survie malgré la présence d'aberrations chromosomiques, un remaniement génétique va avoir lieu, ce qui peut entraîner la modification de l'expression des gènes (activation ou inactivation de ceux-ci) et ainsi potentiellement conduire à une modification/perturbation de l'homéostasie cellulaire. De plus, le changement morphologique des chromosomes peut poser problème au moment de la division cellulaire. En effet, comme expliqué dans le chapitre suivant, la structure des chromosomes (centromères, télomères) est un élément essentiel à la bonne répartition du matériel génétique dans les cellules filles. Toutes les perturbations de ces structures, comme la formation de chromosomes dicentriques,

d'anneaux centriques, etc..., risquent donc de perturber cette répartition. La mauvaise répartition de ces éléments chromosomiques, comme les fragments, peuvent conduire à la formation de structures telles que les micronoyaux, observables après la division cellulaire.

## 6. Devenir des cellules suite aux dommages de l'ADN

### 6.1. Blocage du cycle cellulaire

#### 6.1.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire représente l'ensemble des étapes permettant à une cellule de former deux cellules filles génétiquement identiques. Ce mécanisme est hautement régulé et conservé chez les eucaryotes. Afin d'aboutir à une division, le cycle cellulaire comprend une phase de quiescence (G0) ainsi que quatre phases successives : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M. Deux évènements principaux définissent le cycle cellulaire eucaryote : la réplication du matériel génétique (phase S, Synthesis) et la répartition du matériel génétique répliqué entre les deux cellules filles (phase M, Mitosis). Entre ces deux phases, S et M, deux temps de pause ou « Gaps », les phases G1 et G2, dans lesquelles les cellules augmentent de taille, et préparent la molécule d'ADN pour la réplication ou organisent les chromosomes pour entrer en mitose, respectivement. Parmi ces 4 phases, on distingue celles où l'ADN nucléaire est sous forme décondensée (interphase : G1, S et G2) de celles où l'ADN se trouve sous forme de chromosomes condensés (phase M). L'étape mitotique se subdivise en 5 étapes : la prophase (condensation des chromosomes), la métaphase (alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique), l'anaphase (ségrégation des chromosomes), la télophase (décondensation des chromosomes) et enfin la cytotélerèse (séparation des deux cellules filles). Après la mitose, les cellules filles sont de nouveau en phase G1.

#### 6.1.2. Régulation du cycle cellulaire

Ces 4 phases du cycle cellulaire s'enchainent de façon coordonnée grâce à un ensemble de protéines. Les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont les kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-dependant kinase, CDK), les cyclines ainsi que des activateurs et inhibiteurs de CDK. Les CDK ne sont actives que sous la forme complexée avec les cyclines. L'expression des cyclines variant au cours du cycle cellulaire, les

complexes CDK/cycline ne se forment que transitoirement, permettant une activation transitoire des CDK selon la phase du cycle cellulaire. L'activité des CDK peut également être régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, déphosphorylation) par les kinases (Wee1, Myt1) et par les phosphatases (Cdc25) ou par leur complexation avec des inhibiteurs comme p21 (Bruyère & Meijer, 2013) (Figure 18).

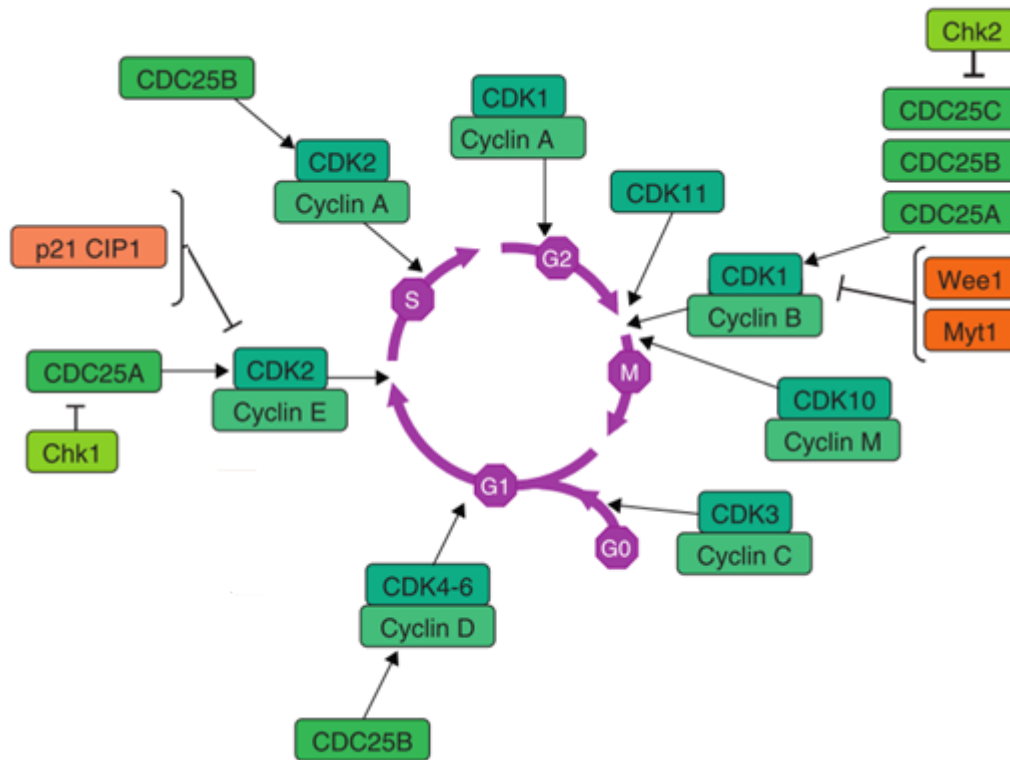


Figure 18: Représentation des complexes Cyclines/CDK au cours du cycle cellulaire. Les complexes cyclines/CDK contrôlent les transitions d'une phase à l'autre du cycle cellulaire, ces complexes sont régulés en amont par des kinases et des phosphatases (Bruyère & Meijer, 2013)

Chacune des phases du cycle possède un point de contrôle permettant la vérification de la présence de conditions environnementales favorables (phase G1), de l'intégrité du génome (phases G1 et G2), du déroulement de la réplication (phase S), et de l'alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique (phase M) (Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, 2008). La détection d'une anomalie par l'un des

quatre points de contrôle entraîne l'arrêt du cycle cellulaire jusqu'à la résolution du problème.

### 6.1.3. Arrêt du cycle cellulaire

L'endommagement de l'ADN est l'un des motifs de l'arrêt du cycle cellulaire. Les mécanismes d'arrêt du cycle diffèrent en fonction de la phase du cycle dans laquelle sont générés les dommages.

Le point de contrôle G1/S est important pour empêcher les cellules, ayant un dommage en G1, d'entrer en phase S. La réaction qui initie l'arrêt en G1 est l'autophosphorylation de ATM sur deux sites, Thr383 et Thr387. ATM va ensuite phosphoryler Chk2, sur la Tyr 68. Cette phosphorylation de Chk2 va inactiver les cyclines D / Cdh4/6 et E / Cdk2. Il en résulte la phosphorylation inhibitrice par Chk2 de la phosphatase Cdc25A aboutissant à son expulsion du noyau et à sa dégradation. L'inactivation de Cdc25A entraîne une accumulation de la forme phosphorylée (inactive) de Cdk2. Cette dernière se retrouve ainsi incapable de phosphoryler la Cdc45 et d'initier la réplication de l'ADN, requise en phase S. ATM, en parallèle de la phosphorylation de Chk2, va également activer p53. La protéine p53 est une cible directe à la fois de la kinase ATM, qui phosphoryle p53 sur la Serine 15, et de la kinase Chk2, qui phosphoryle p53 sur la Serine 20. Ceci aboutit à la stabilisation de P53 phosphorylé ; le produit de l'un des gènes cibles de ce facteur de transcription, CDKN1A, alias p21<sup>WAF1</sup>, désactive les complexes cyclines E / Cdk2 impliqués dans la transition G1/S (Bartek & Lukas, 2001; Falck, Mailand, Syljuåsen, Bartek, & Lukas, 2001).

Le point de contrôle du passage de la phase G2 à M est décisif puisqu'il va faire en sorte que la mitose ne soit pas déclenchée tant que la réplication n'est pas totalement et correctement achevée. Le complexe cycline B/ Cdk1 assure ce point de contrôle. Les deux voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 s'activent respectivement et contribuent à la phosphorylation et, donc, à l'inactivation des phosphatases Cdc25A. De plus, Chk1 inhibe l'activité de la



kinase Wee1 conduisant à l'inactivation de la Cdk1 (Boutros, Lobjois, & Ducommun, 2007; O'Connell, Walworth, & Carr, 2000).

Les points de contrôle intra-S sont les moins connus. Ils s'activent à la fois en présence de dommages générés durant la phase S ou de dommages générés en amont de la phase S et ayant échappé aux points de contrôle G1/S. L'activation des points de contrôle intra-S n'aboutit pas à un arrêt total du cycle cellulaire comme celui obtenu suite à l'activation des checkpoints G1/S et G2/M (Rhind & Russell, 2000). En revanche, elle entraîne une diminution de la synthèse d'ADN par l'intermédiaire de l'inhibition de l'organisation des origines de réplication et de la diminution de la vitesse de progression, le long de la molécule d'ADN, des fourches de réplication. La suppression des origines de réplication est orchestrée par l'activation de la voie ATR-Chk1, la phosphorylation de Cdc25A, l'inactivation des complexes cycline E / Cdk2 et l'arrêt de l'accumulation de Cdc45 et de l'ADN polymérase  $\alpha$  au niveau des complexes de pré-réplication. En ce qui concerne la progression des fourches de réplication, elle diminue et semble être un phénomène local affectant uniquement les fourches rencontrant le dommage (Grallert & Boye, 2008; Willis & Rhind, 2009).

## 6.2. La catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique a été initialement décrite chez *Schizosaccharomyces pombe* comme un phénotype létal associé à des altérations de la ségrégation chromosomique dans certaines souches mutantes (Ayscough, Hayles, MacNeill, & Nurse, 1992; Molz, Booher, Young, & Beach, 1989). La catastrophe mitotique des cellules, chez les mammifères, est décrite comme étant une défaillance du déroulement de la mitose et peut être induit par un agent générant des dommages de l'ADN tels que l'irradiation (Vitale, Galluzzi, Castedo, & Kroemer, 2011). Deux mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'induction de la catastrophe mitotique. Le premier modèle résulte d'une hyperamplification des centrosomes (Dodson, Wheatley, & Morrison, 2007). Cette hyperamplification des centrosomes conduit

alors à la formation de fuseaux mitotiques multipolaires responsables de micronoyaux et de cellules géantes binuclées (Hanashiro, Kanai, Geng, Sicinski, & Fukasawa, 2008). Le second mécanisme moléculaire de la catastrophe mitotique résulte d'un dommage de l'ADN mal réparé qui conduit à la formation de structures ayant une grande probabilité de mal s'aligner sur le fuseau mitotique ou de ne pas s'y aligner du tout (se référer au paragraphe précédent 5.4.2. « cas des aberrations chromosomiques ») (Ianzini, Bertoldo, Kosmacek, Phillips, & Mackey, 2006).

Dans tous les cas, une mauvaise ségrégation des chromosomes est un vecteur d'aneuploïdie et d'instabilité génomique important pouvant conduire à terme à une mort cellulaire dite différée ou à la sénescence (Favaudon, 2000; Vitale et al., 2011).

### **6.3. Mortalité cellulaire**

La mort cellulaire est l'arrêt définitif des métabolismes et des fonctions vitales, puis la destruction de la cellule (unité de base des processus vitaux). Il a été décrit plusieurs types de morts cellulaires suite à l'exposition aux rayonnements ionisants : l'apoptose, l'oncose/la nécrose et l'autophagie (Figure 19). Nous appelons apoptose la mort cellulaire programmée, c'est à dire l'autodestruction des cellules en réponse à un stimulus. Au cours du processus apoptotique, un bourgeonnement de la membrane plasmique se crée, ce qui entraîne la condensation et la fragmentation du noyau, et ainsi à la formation de corps apoptotiques, dont leurs membranes et leurs organelles sont fonctionnelles. Ces derniers sont ensuite détruits ou phagocytés par d'autres cellules voisines. On oppose l'apoptose à l'oncose/nécrose, qui est une mort cellulaire initiée par l'épuisement total des réserves énergétiques de la cellule, ce qui entraîne une rupture de la membrane cellulaire. La libération du contenu cellulaire dans la matrice extracellulaire active le système immunitaire local ce qui entraîne une inflammation et conduit à la nécrose. Dans le cas de l'oncose/nécrose, la fragmentation de l'ADN génomique n'est jamais observée tandis que cette caractéristique est observée dans le cas de

l'apoptose. Un troisième type de mort cellulaire également décrit est l'autophagie. Ce type de mort cellulaire consiste en une digestion d'une partie du cytoplasme cellulaire par ses propres lysosomes.

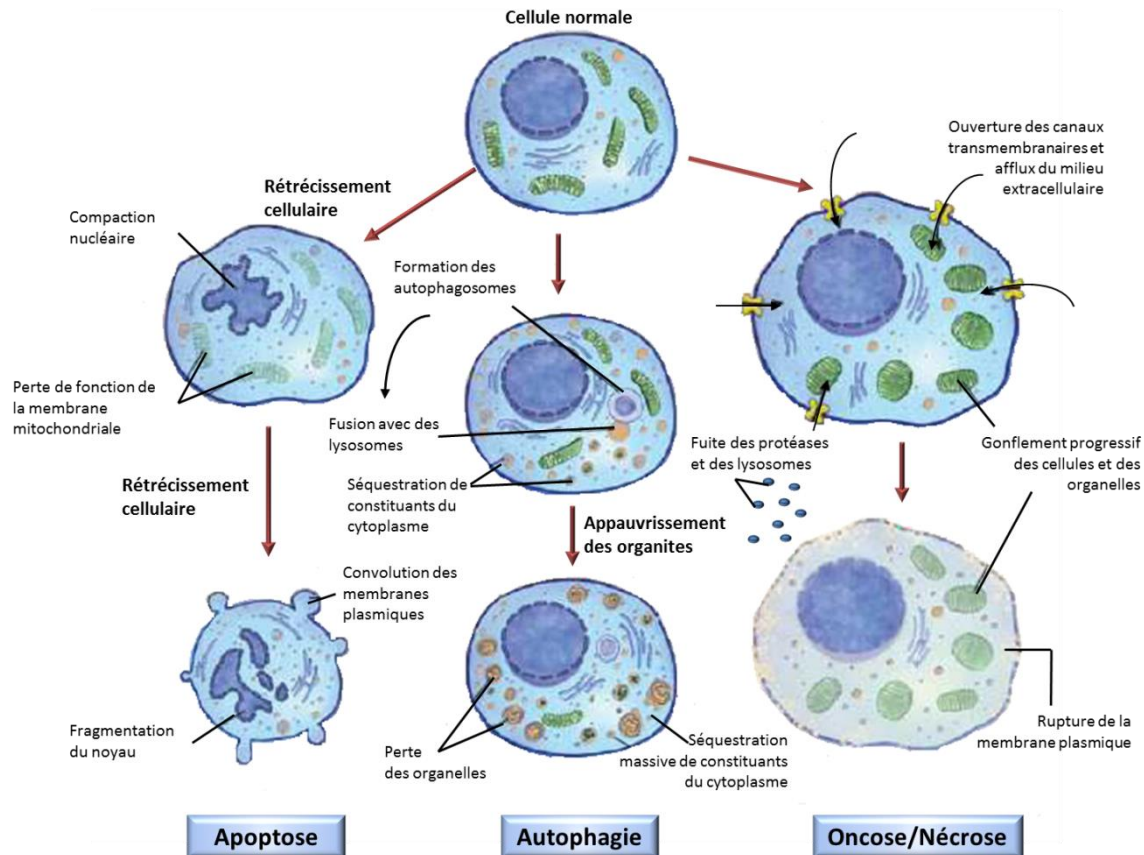


Figure 19: Morts cellulaires après exposition aux rayonnements ionisants. Représentation simplifiée de trois morts cellulaires : l'apoptose, l'autophagie et l'oncose/nécrose. Dans le processus de mort apoptotique, des corps sont formés et les membranes peuvent être dégradées avec libération du contenu dans le milieu extracellulaire (nécrose apoptotique). Dans le processus d'autophagie, la cellule libère des lysosomes qui seront, au sein d'un organisme entier, phagocytés. L'oncose/nécrose, se traduit par un gonflement général des organelles de la cellule, elle se finit en nécrose lorsque la membrane plasmique est lysée et libère son contenu dans le milieu extracellulaire. Adaptée de (Hotchkiss, Strasser, McDunn, & Swanson, 2009).

### 6.3.1. L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme indispensable au développement des organismes pluricellulaires et au maintien de leur homéostasie. Chez l'Homme, elle permet par exemple lors de l'embryogénèse l'élimination des espaces interdigitaux et la séparation des doigts. Dans les organismes adultes, l'apoptose joue un rôle essentiel de régulation de l'homéostasie ;

c'est-à-dire le contrôle de l'espace dédié à chaque type de tissu et population cellulaire. L'apoptose constitue également un mode de réponse cellulaire à une agression externe, chimique ou physique, incluant les rayonnements ionisants. L'apoptose est aussi responsable de l'élimination de cellules à l'âge adulte, et notamment de cellules dont l'ADN est endommagé, pour maintenir l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire (Conradt, 2009). Ce processus, essentiel à la vie des organismes pluricellulaires, a été identifié au cours des années 60 et nommé « apoptose » par John F. R. Kerr et al en 1972 (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Il a été mis en évidence sur la base de caractéristiques morphologiques particulières, comme l'arrondissement de la cellule avec rétractation des pseudopodes, réduction du volume cellulaire (pyknosis), condensation de la chromatine, fragmentation nucléaire (karyorrhexis), pas ou peu de modifications de la structure des organites cytoplasmiques, un « bourgeonnement » membranaire et une internalisation par les phagocytes. Le terme « apoptose » est utilisé pour des événements de mort cellulaire qui combinent plusieurs de ces changements morphologiques (G Kroemer et al., 2009).

L'apoptose est déclenchée par des signaux de morts qui entraînent des cascades de signalisations intracellulaires dites extrinsèques lorsque les signaux de mort sont transmis par des récepteurs de surface et intrinsèques lorsque les signaux proviennent d'un endommagement cellulaire, comme par exemple des dommages de l'ADN.

Ces deux voies vont toutes les deux conduire à l'enclenchement du processus apoptotique, et ce à travers l'activation de protéines appartenant à trois familles principales : la famille Bcl-2, les caspases et Apaf-1. La voie extrinsèque implique l'activation de récepteurs de mort de la superfamille du TNF (Tumoral necrosis factor) situés au niveau de la membrane plasmique, elle est principalement décrite lors des processus immunologiques. La deuxième voie est principalement décrite en réponse à un stress génotoxique (comme l'irradiation). Ces signaux de stress cellulaire sont reconnus par la protéine p53 qui va activer

la voie intrinsèque. L'élément déclencheur repose sur la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie impliquant la famille de protéines Bcl-2 (Danial & Korsmeyer, 2004). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie et sont donc, soit pro-apoptotiques (Bax, Bak), soit anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, McI-I) (Guido Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007). La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale aboutit au relargage de nombreuses molécules mitochondriales dans le cytosol, en particulier de cytochrome C qui se lie à la protéine APAF-1 et à la caspase 9 pour générer une plate-forme moléculaire appelé apoptosome (Garrido et al., 2006). La phase finale de ce processus est l'activation de protéines, les caspases 3 et 7, qui initient les processus irréversibles (la fragmentation de l'ADN, de la membrane nucléaire etc...) conduisant à la mort cellulaire (Guido Kroemer et al., 2007).

### ***6.3.2. L'oncose/la nécrose***

L'oncose/la nécrose est décrite généralement comme une mort accidentelle non physiologique. C'est un processus dégénératif lié à une rupture de l'homéostasie cellulaire. L'oncose a lieu à l'échelle cellulaire, tandis que la nécrose a lieu à l'échelle du tissu. L'oncose est caractérisée morphologiquement par une augmentation du volume cellulaire, une dilatation des organites, une rupture de la membrane cellulaire et un relargage du contenu intracellulaire (Golstein & Kroemer, 2007). C'est le relargage du contenu intracellulaire qui active la réponse du système immunitaire conduisant à la nécrose. Considéré pendant longtemps comme un processus non contrôlé, la nécrose est également induite par différentes voies de signalisation telles que celles impliquées dans l'apoptose, comme les voies des récepteurs de mort CD95/Fas, TNF-R1 et TRAIL pouvant induire la formation du « nécrosome », complexe protéique capable de médier la nécrose (Hitomi et al., 2008; Panganiban & Day, 2013). La nécrose radio-induite aboutit à une augmentation de

l'inflammation pouvant favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale, mais également provoquer des effets délétères pour le tissu sain avoisinant (Kaczmarek, Vandenabeele, & Krysko, 2013).

### **6.3.3. L'autophagie**

L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation métabolique au cours duquel les protéines cellulaires et des organites intracellulaires sont absorbés par des vacuoles contenant des constituants du cytoplasme, des autophagosomes, digérés par les lysosomes puis recyclés pour maintenir le métabolisme de la cellule (Hait, Jin, & Yang, 2006). Ce phénomène peut se déclencher en condition physiologique, dans des cellules normales en privation de nutriments ou de facteurs de croissance (Galluzzi, Pietrocola, Levine, & Kroemer, 2014; Mancias & Kimmelman, 2016), mais également en réponse à différents stress cellulaires tels que les rayonnements ionisants.

Le complexe de protéines kinases appelées ULK contrôle l'initiation du processus autophagique, associant la protéine ULK 1 elle-même et les protéines atg13 et atg17 (Jung et al., 2009). Ce complexe est lui-même régulé par la protéine mTOR 1 dont l'inhibition de l'activité kinase conduit à la formation des autophagosomes (Mizushima, 2010). La protéine p53 joue également un rôle dans la régulation de l'autophagie en fonction de sa localisation cellulaire : si elle est nucléaire, elle joue le rôle de facteurs de transcription de gènes activant l'autophagie (Maiuri et al., 2009); si elle est cytoplasmique, elle inhibe au contraire l'autophagie par un mécanisme inconnu actuellement (Tasdemir et al., 2008).

C'est récemment qu'un lien a été mis en évidence entre le phénomène d'autophagie et des protéines entrant dans la réponse cellulaire aux dommages telles que ATM, PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase), avec une accumulation de  $\gamma$ H2A.X (Rodríguez-Vargas et al., 2012), et également p53 par l'activation de la transcription de gènes pro-autophagiques (Vessoni, Filippi-Chiela, Menck, & Lenz, 2013).

## 6.4. Sénescence

La sénescence n'est pas une mort cellulaire effective conduisant à la disparition de la cellule, mais une perte définitive de la capacité de division cellulaire. Contrairement aux lignées cellulaires tumorales, les cellules normales ne sont capables d'effectuer qu'un nombre de divisions limité. Cette limitation du potentiel prolifératif a été originalement décrite par Léonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961 (Hayflick & Moorhead, 1961). Ils observèrent que des fibroblastes extraits d'embryons humains présentaient en culture une phase de croissance exponentielle suivie d'une phase terminale caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire ou sénescence répllicative (Hayflick, 1965). Ce phénomène a été décrit par la suite dans divers types cellulaires dont les cellules gliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules du cristallin, les cellules endothéliales et les lymphocytes (Cristofalo, Lorenzini, Allen, Torres, & Tresini, 2004). Il existe un deuxième type de sénescence, appelée sénescence prématurée. Les cellules entrent en sénescence prématurée lorsqu'elles sont exposées à certains stress cellulaires, dont l'hyperactivation oncogénique, le stress oxydant, le dysfonctionnement télomérique et les lésions de l'ADN (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Ainsi, la sénescence radio-induite peut provenir directement des dommages de l'ADN ou faire suite à une catastrophe mitotique.

Les cellules sénescents possèdent des caractéristiques morphologiques et moléculaires bien particulières. Leur volume augmente, avec également une augmentation de la taille du noyau et des nucléoles (Cristofalo, 1988). Ainsi, les cellules sénescents ont une activité métabolique et surtout sécrétoire impliquant une possible action sur les cellules voisines. En effet, elles accumulent des vacuoles dans le cytoplasme et développent une activité SA- $\beta$ -galactosidase, due à l'augmentation de la masse lysosomiale (Kurz, Decary, Hong, & Erusalimsky, 2000), elles excrètent des facteurs de croissance (Coppé, Kauser, Campisi, & Beauséjour, 2006), de protéases, de cytokines (IL-6, IL-8) (Kuilman et al., 2008). Les cellules sénescents ont la particularité de former des foyers d'hétérochromatine associés

à la sénescence (SAHF ou Senescence Associated Heterochromatin Foci en anglais). Les SAHF sont constitués de plusieurs couches distinctes d'hétérochromatine reflétant une organisation complexe de la chromatine (Chandra et al., 2012).

Fonctionnellement, les SAHF semblent être dépendants d'une activation de la voie p16<sup>INK4A</sup>/Rb, et les foyers d'hétérochromatine semblent réprimer les gènes cibles de E2F impliqués dans la prolifération (Narita et al., 2003). Une fois les SAHF formés, des inhibiteurs du cycle cellulaire ne sont plus nécessaires pour maintenir la sénescence (Bakkenist & Kastan, 2003). Il a été montré que les SAHF, en protégeant l'ADN et en diminuant les réponses aux dommages de l'ADN permettraient la survie cellulaire (Di Micco et al., 2011).



## 7. Etat de l'art sur la comparaison des effets biologiques en fonction des énergies de photons utilisées

### 7.1. Etudes épidémiologiques et radiobiologiques : bases de la radioprotection

Comme nous venons de le voir, les rayonnements ionisants ont des impacts au niveau cellulaire, et génèrent ainsi des effets biologiques (se référer aux précédents chapitres). Il en découle des risques associés. Ainsi, des recommandations de radioprotection ont vu le jour et se sont construites progressivement depuis la découverte de la radioactivité au début du 20<sup>ème</sup> siècle. Créée en 1928, la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) est une organisation non-gouvernementale dont l'objectif est d'apprécier l'état des connaissances sur les effets des rayonnements ionisants afin d'identifier leurs implications du point de vue des règles de protection à adopter. La CIPR analyse les résultats des recherches effectuées dans le monde et prend en compte les travaux d'autres organisations internationales, notamment ceux de l'UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation).

Aujourd'hui, il existe 2 sources d'informations sur les effets sur l'Homme des rayonnements ionisants : les études épidémiologiques et les études radiobiologiques.

Les études épidémiologiques proviennent de 3 principales sources : les survivants des bombardements nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki au Japon, les patients exposés aux rayonnements pour des traitements médicaux ou des diagnostics et les groupes de travailleurs exposés aux rayonnements ou à des substances radioactives du fait de leur activité professionnelle (ICRP, 1991). La principale limite de l'épidémiologie est la taille des cohortes nécessaires pour évaluer un risque, éventuellement faible, lié à une exposition spécifique. Les études de radiobiologie sont donc complémentaires et peuvent permettre d'identifier des

situations d'expositions potentiellement à risque et ainsi guider ou orienter les sujets des études épidémiologiques.

Concrètement, la probabilité des risques stochastiques est connue pour être dépendante de la dose. Mais d'autres caractéristiques des rayonnements ionisants sont susceptibles d'intervenir comme la qualité du rayonnement. Cela est bien décrit notamment à travers des études et mesures de l'effet biologique relatif pour les rayonnements de types protons,  $\alpha$  ou neutrons. L'effet biologique relatif (EBR) est le rapport entre la dose d'un rayonnement de référence et du rayonnement étudié nécessaire pour induire le même effet biologique (Figure 20).

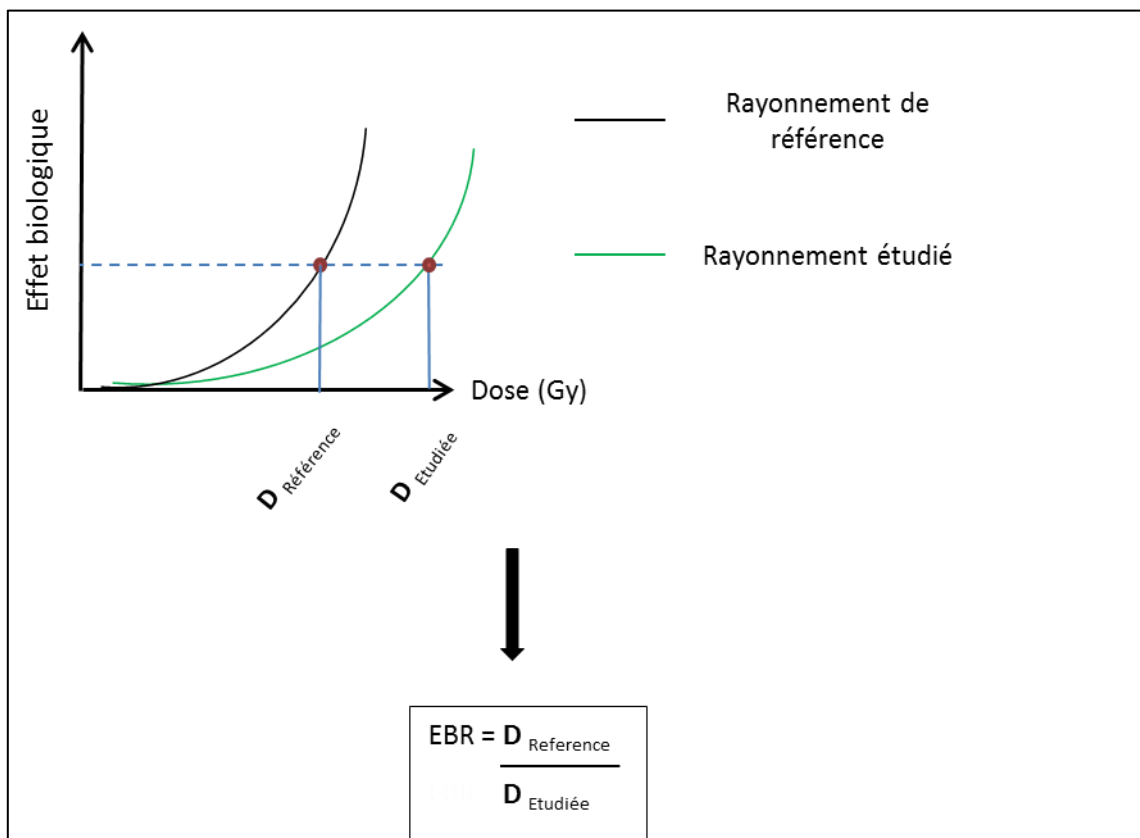


Figure 20: Illustration de l'effet biologique relatif (EBR)

La notion d'EBR, issue de la radiobiologie, peut être illustrée en radioprotection à travers la notion de dose équivalente qui consiste à pondérer la dose absorbée, qui est une grandeur physique, par le facteur WR dont la valeur est fixée pour chaque qualité de

rayonnements ionisants par la CIPR. Cette valeur est égale à 1 pour l'ensemble des ondes électromagnétiques ionisantes (rayonnements X et  $\gamma$ ), et peut aller jusqu'à 20 pour les particules chargées de type  $\alpha$  et plus lourde.

## 7.2. Etudes radiobiologiques comparatives des rayonnements X

Dans le monde médical, différentes énergies de rayonnements X sont utilisées (cf chapitre 2 : « Utilisation des rayonnements X dans le médical »). A l'heure actuelle, on considère que le risque associé à ces natures différentes d'exposition sont les mêmes (Publication 60, CIPR, 1991). Cependant, dans les années 80, des études microdosimétriques ont apporté des éléments susceptibles de remettre en question ces hypothèses. En microdosimétrie, Kliauga *et al.* rapporte des différences significatives dans le spectre de dépôt d'énergie mesuré en fonction de l'énergie des photons utilisés (A M Kellerer & Rossi, 1971; Kliauga & Dvorak, 1978). En effet, l'énergie des électrons secondaires émis diminue lors des interactions des photons de basse énergie, et leur densité d'ionisation augmente. En d'autres termes, les électrons secondaires créés déposent plus d'énergie sur une plus courte distance (Brenner & Amols, 1989).

La mise en évidence de ces différences micro-dosimétriques entre les différentes énergies de rayonnements X a ainsi conduit à s'interroger sur d'éventuelles différences d'effets biologiques. Ainsi, à partir de 1989 jusqu'à aujourd'hui, plusieurs études de radiobiologie comparatives ont fait l'objet de publications. Ces travaux se sont intéressés principalement à comparer les effets différentiels pour les aberrations chromosomiques, la survie clonogénique, et les dommages de l'ADN.

### 7.2.1. Aberrations chromosomiques

Neuf études se sont ainsi concentrées sur la mesure du taux d'aberrations chromosomiques, en fonction de l'énergie des rayonnements X (Beyreuther, Dörr, Lehnert,

Lessmann, & Pawelke, 2009; Krumrey, Ulm, & Schmid, 2004; Lehnert, Dörr, Lessmann, & Pawelke, 2008; Lehnert, Lessmann, Pawelke, & Dörr, 2006; Mestres et al., 2011; Mestres, Caballín, Barrios, Ribas, & Barquinero, 2008; Sasaki et al., 1989; Slonina et al., 2003; Verhaegen & Vral, 1994).

Ainsi, Sasaki et *al.* en 1989, étudient des rayonnements X mono-énergétiques de 4,8 keV, 6,9 keV, 12,4 keV, 13,8 keV et 14,6 keV, obtenus à partir du synchrotron du National Laboratory for High Energy Physics au Japon (Sasaki et al., 1989). Pour comparer les effets biologiques de ces expositions, ils les mettent en parallèle à ceux induits par un rayonnement de référence, dans leur cas, celui issu du  $^{60}\text{Co}$  (2 raies mono-énergétiques de 1,1732 et 1,3325 MeV). La dosimétrie des irradiations est réalisée grâce à une chambre d'ionisation. Ils utilisent des cellules du sang circulant, des lymphocytes en suspension, qu'ils laissent sédimenter sur un film de polycarbonate afin de les irradier. Pour quantifier les effets biologiques induits, ils réalisent des courbes dose-effet, de 0,5 à 3 Gy, basée sur le dénombrement des chromosomes dicentriques. Ils concluent, à partir de la comparaison du coefficient  $\alpha$  des courbes avec celui obtenu pour le  $^{60}\text{Co}$ , à une augmentation de l'EBR associée à la décroissance de l'énergie des photons jusqu'à 6,9 keV. Cette augmentation de l'EBR est suivie d'une diminution de celui-ci pour des énergies inférieures à 6,9 keV.

Verhaegen, Vral *et al.*, en 1994 comparent 4 rayonnements différents, 3 rayonnements X, 14 kVp, 50 kVp et 350 kVp en utilisant également comme référence le rayonnement  $\gamma$  issu du  $^{60}\text{Co}$  (Verhaegen & Vral, 1994). Pour les irradiations de rayonnements X, ils utilisent un irradiateur Philips MG420. La calibration dosimétrique est réalisée grâce à des chambres d'ionisation, et la dose administrée est suivie pendant l'irradiation grâce à une chambre d'ionisation en position adjacente à l'échantillon biologique. Pour les rayonnements X de 350 kVp, les facteurs de conversion pour obtenir la dose dans le sang à partir de la dose dans l'eau (obtenue à partir des chambres d'ionisation dans l'eau) sont dérivés de simulations

Monte Carlo. Pour les rayonnements X de 50 kVp et 14 kVp, la dose dans l'air est convertie en dose dans le sang à l'aide de simulations Monte Carlo prenant en compte les géométries d'irradiation. Les doses utilisées sont de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3 et 4 Gy. Le débit dose utilisé est de 0,25 Gy/min pour toutes les conditions d'irradiation. Des lymphocytes du sang circulant sont utilisés, et irradiés en suspension. Ils réalisent des courbes dose-effets basées sur le nombre de micronoyaux par cellules binucléées. Ils concluent, grâce à la comparaison des pentes des relations linéaires obtenues, à une augmentation du taux d'induction de micronoyaux dans des lymphocytes humains plus l'énergie des photons diminue. Ils obtiennent des valeurs d'EBR par rapport au rayonnement  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ , de 2,1 pour 14 kVp, 1,8 pour 50 kVp et 1,3 pour 350 kVp.

Slonina *et al.* en 2003, comparent également les relations dose-effets d'induction de micronoyaux pour 2 tensions de rayonnements X à savoir, 25 kVp et 200 kVp (rayonnement de référence) (Slonina et al., 2003). Pour cela, ils utilisent 2 irradiateurs différents pour chacune des 2 tensions : Forward Raytech pour 25 kVp et Roentgen Seifert pour 200 kVp. La dosimétrie est réalisée grâce à des chambres d'ionisation et les débits doses utilisés sont de 1,2 Gy/min pour la tension de 200 kVp et 1,3 Gy/min pour 25 kVp, pour des doses de 1, 2, 3, 4 et 5 Gy. Pour définir leur différentes conditions d'irradiation, ils mentionnent dans leur publication avoir caractérisé la contribution du dépôt de dose des photons en fonction de leur énergie. Ainsi pour leur configuration d'irradiation à 200 kVp, les photons d'une énergie comprise entre 20 et 80 keV et 80 et 150 keV contribuent au dépôt de dose, respectivement de 41 % et 44 %. Aucun photon d'une énergie inférieure à 20 keV ne contribue au dépôt de dose. Pour la tension de 25 kVp, la principale contribution du dépôt de dose (76%) est réalisée par des photons d'une énergie comprise entre 10 et 20 keV. Ils utilisent des cellules primaires humaines de l'épiderme (HEKn) des fibroblastes humains (HFIB) et murins (NIH/3T3), non synchronisés au moment de l'irradiation. Les valeurs d'EBR pour l'induction des

micronoyaux sont calculées à partir du ratio des pentes des courbes dose-réponse obtenues pour chaque type cellulaire pour 25 kVp comparé à 200 kVp. Ils observent une légère augmentation du taux de micronoyaux après irradiation à des rayonnements X de 25 kVp comparé à 200 kVp, pour les 3 types cellulaires avec une valeur d'EBR comprise entre 1,2 et 1,3.

Krumrey *et al* en 2004 s'intéressent, comme Sasaki *et al* en 1989, à l'effet de différentes énergies de rayonnements X mono-énergétiques issus d'un synchrotron (Electron Storage Ring BESSY II à Berlin) sur l'induction de chromosomes dicentriques (Krumrey *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 1989). Ils étudient ainsi des énergies de 1,83 keV, 3,1 keV, 4,8 keV, 6,9 keV, 10 keV et 17,4 keV pour approfondir notamment l'effet biologique d'énergies inférieures à 6,9 keV. Cette fois encore, la référence considérée est le rayonnement  $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ . La dosimétrie est réalisée à partir de chambres d'ionisation. Ils ajoutent que le temps nécessaire pour déposer 1 Gy est compris entre 30 sec et 600 sec, en fonction du débit dose et des dimensions du faisceau. Ils utilisent des cellules du sang circulant, des lymphocytes, qu'ils laissent sédimenter pendant 3h sur un film de culture (biofoil) de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, afin de les irradier. Pour leurs configurations d'irradiation, les photons traversent le biofoil avant d'attendre les cellules. De ce fait, ils calculent le pourcentage d'absorption des photons par le biofoil et obtiennent les valeurs suivantes : 27 % pour 4,8 keV, 10 % pour 6,9 keV, 3 % pour 10 keV et l'absorption des photons par le biofoil à 17,4 keV peut être négligée. Ils réalisent des courbes dose-effet, de 0,25 à 2 Gy, basées sur le dénombrement des chromosomes dicentriques après irradiation. Sur la base d'un rayonnement de référence issu du  $\text{Co}^{60}$  et du coefficient  $\alpha$  des courbes dose-effets, ils confirment l'observation faite en 1989 par Sasaki *et al*, c'est à dire une augmentation de l'EBR (de 3,58 à 7,70) avec une énergie de photons décroissante jusqu'à 6,9 keV, suivie d'une diminution de celui-ci à des énergies inférieures à 6,9 keV (Sasaki *et al.*, 1989).

Lehnert *et al.*, en 2006, s'intéressent également à l'effet différentiel des tensions 25 kVp et 200 kVp sur l'induction de micronoyaux, mais cette fois sur une lignée de cellules épithéliales cancéreuses de glande mammaire humaine (Lehnert *et al.*, 2006). Comme pour l'étude de Slonina *et al* en 2003, un irradiateur différent pour chacune des 2 tensions est utilisé : le Forward Raytech pour 25 kVp et le Röntgen Seifert pour 200 kVp (Slonina *et al.*, 2003). La dosimétrie des irradiations, en kerma dans l'eau est réalisée à l'aide de chambres d'ionisation, et de films dosimétriques EBT3, afin de s'assurer de l'uniformité de la dose sur le champ d'irradiation. Pour caractériser leur configuration d'irradiation à 25 kVp, ils calculent que l'énergie moyenne des photons est 16 keV et que la principale contribution (>92%) de la dose provient de l'énergie des photons comprise entre 5 keV et 20 keV. Pour la tension de 200 kVp, ils mentionnent que la distribution du spectre des photons est très étalée avec une énergie moyenne de 90 keV, et que seule 2% de la dose déposée est issue de photons d'une énergie inférieure à 40 keV. Les doses utilisées sont de 0,5, 1, 1,5, 2, 3 et 3,5 Gy. Pour la tension de 25 kVp, les cellules sont recouvertes de 1,4 mm de milieu au moment de l'irradiation et les débits dose sont de 1,5 Gy/min. Pour la tension de 200 kVp, le débit dose est de 1,2 Gy/min excepté pour la dose de 0,5 Gy où le débit dose est de 0,3 Gy/min. Ils réalisent des courbes dose-effets basées sur le dénombrement des cellules binucléées possédant des micronoyaux (BNC + MN) et sur le nombre de micronoyaux par cellule binucléée (MN/BNC). Pour chacun de ces 2 types de mesures, ils déterminent une relation dose-effet quadratique et sur la base de leur coefficient  $\alpha$ , ils rapportent un EBR de 1,40 pour BNC + MN et 1,44 pour MN/BNC pour 25 kVp comparé à 200 kVp.

Mestres *et al.*, en 2008, mesurent, pour des tensions de 30 kVp, 80 kVp et 120 kVp, les fréquences de chromosomes dicentriques, de translocations et le calcul du nombre minimum de cassures nécessaire pour former les aberrations observées (Mestres *et al.*, 2008). Ces irradiations sont toutes réalisées à l'aide du même irradiateur (Therapax SXT model 150).

La dosimétrie est réalisée à l'aide de chambres d'ionisation M23342 et Unidos electrometer modèle 1001. Ils utilisent des échantillons de sang, qu'ils irradient à 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,7, 0,8, 1, 2 et 3Gy, à des débits de dose relativement différents pour chacune des tensions, notamment pour 30kVp (1,15, 0,95 et 0,25 Gy/min pour 120 kVp, 80 kVp et 30 kVp, respectivement). Le nombre important de doses inférieures à 1 Gy leur permettent d'estimer particulièrement précisément les coefficients  $\alpha$  des relations quadratiques des courbes dose-effet obtenues. A partir de ces coefficients, ils concluent à une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques stables et instables à 30 kVp comparé à 120 kVp et calculent un EBR de 1,73. Ils remarquent également une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques complexes pour 30 kVp.

En 2008, Lehnert *et al.*, étudient l'effet sur le taux de micronoyaux d'un voltage de 10 kVp, toujours en comparaison avec un rayonnement de référence obtenu à 200 kVp (Lehnert et al., 2008). Pour cela, ils utilisent les mêmes irradiateurs ainsi que la même lignée cellulaire épithéliale de glande mammaire (MCF-12A) qu'en 2006 (Lehnert et al., 2006). Les débits de doses utilisés sont de 0,53 Gy/min et 1,2 Gy/min pour 10 kVp et 200 kVp, respectivement. Afin de limiter l'atténuation du milieu dans la dosimétrie des irradiations à 10 kVp, les cellules sont irradiées sans milieu, mais uniquement lors des irradiations à cette tension. Les doses utilisées sont 0,5, 1, 1,5, 2, 3 et 3,5 Gy. Ils obtiennent ainsi des courbes dose-effets de types quadratiques basées, soit sur le nombre de cellules binucléées ayant des micronoyaux (BNC + MN), soit sur le nombre de micronoyaux par cellule binucléées (MN/BNC). Sur la base des coefficients  $\alpha$  des 2 courbes obtenues pour 10 kVp, respectivement comparés à ceux obtenus pour 200 kVp, ils calculent un EBR de 2,6 pour BNC + MN et 4,1 pour MN/BNC.

Beyreuther *et al.* en 2009, comparent les taux de fragments chromosomiques excédentaires, de chromosomes dicentriques et d'anneaux centriques induits par des



expositions à des rayonnements X générés par des tensions de 200 kVp, 25 kVp et 10 kVp (Beyreuther, Dörr, et al., 2009). Pour se faire, ils utilisent un irradiateur Roentgen Seifert pour le rayonnement X de référence, 200 kVp, et un irradiateur Forward Raytech pour les tensions de 25 kVp et 10 kVp. La dosimétrie est réalisée à l'aide de chambres d'ionisation et de films dosimétriques EBT3 afin de vérifier l'homogénéité et la distribution de la dose dans les flasks de culture. Pour la tension de 200 kVp, les débits doses utilisés sont de 0,3 Gy/min pour la dose de 0,5 Gy et 1,2 Gy/min pour les doses allant de 1 à 5 Gy. Pour les tensions de 25 kVp et 10 kVp, les débits doses utilisés sont de 2 Gy/min et 0,5 Gy/min respectivement, pour toutes les doses. Ils utilisent des lignées cellulaires épithéliales de glande mammaire humaine, des cellules adhérentes et immortalisées mais pas cancéreuses (184A1) et des cellules non cancéreuses mais possédant un taux basal d'aberrations chromosomiques élevé (MCF-12A). Ils concluent, pour les 2 lignées cellulaires épithéliales étudiées, à une augmentation de fragments chromosomiques par métaphase pour 10 kVp et 25 kVp comparé à 200 kVp, et calculent à partir du coefficient  $\alpha$  de la courbe dose-effet obtenue sur les fragments chromosomiques des valeurs de EBR de  $1.92 \pm 0.26$  et  $1.40 \pm 0.12$  pour les 184A1 et  $1.17 \pm 0.12$  et  $0.97 \pm 0.10$  pour les MCF-1A. Ils concluent également à une augmentation de la fréquence de chromosomes dicentriques et d'anneaux centriques, uniquement pour les doses les plus fortes, et ceci sur la base des coefficients  $\beta$  des différentes courbes effet-dose obtenues pour les chromosomes dicentriques et les anneaux centriques.

En 2011, Mestres *et al.* s'intéressent à nouveau aux configurations de leur étude de 2008, mêmes voltages, à savoir 30, 80 et 120 kVp, délivrés sur les mêmes irradiateurs, aux mêmes débits dose et toujours sur du sang total, mais cette fois, en se concentrant sur des doses fortes (2, 4 et 6 Gy) (Mestres et al., 2011, 2008). Tout d'abord, ils cherchent à savoir si, en fonction de l'énergie utilisée, la probabilité de former des aberrations inter- ou intra-chromosomiques au sein des lymphocytes variait. Pour cela, à l'aide de sondes

pancélochromiques et pancentromériques, ils font un ratio entre le nombre de chromosomes dicentriques et le nombre d'anneaux centriques. Ils mettent en évidence une plus grande induction d'aberrations intra-chromosomiques à 30 kVp. Ils étudient également la probabilité de former des translocations complètes ou incomplètes en fonction de l'énergie utilisée. Pour cela, ils calculent un ratio entre le nombre de translocations complètes et le nombre de translocations incomplètes et obtiennent un ratio plus important à 30 kVp. Enfin, à l'aide du m-FISH, ils cherchent à savoir si, en fonction de l'énergie des rayonnements X utilisée, la probabilité de former des aberrations chromosomiques complexes changeaient. Ils observent une légère augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques complexes à 30 kVp comparé à 80 kVp et 120 kVp.

### 7.2.2. *Survie clonogénique*

Une conséquence biologique régulièrement étudiée en radiobiologie est la survie clonogénique. Cette mesure reflète la capacité d'une cellule irradiée, et de ses descendantes, à réaliser des divisions après l'exposition, en nombre suffisant pour former une colonie cellulaire. Trois études ont comparé les courbes de survie obtenues pour des rayonnements X obtenus à différents voltages (Lehnert et al., 2008, 2006; Panteleeva et al., 2003).

Tout d'abord, Panteleeva *et al.*, en 2003, s'intéressent à 2 rayonnements X différents, 25 kVp et 200 kVp (Panteleeva et al., 2003). Ils utilisent 2 irradiateurs, le Forward Raytech pour la tension de 25 kVp et le Roentgen Seifert, pour la tension de 200 kVp. La dosimétrie est réalisée grâce à des chambres d'ionisation en kerma dans l'eau. Les débits doses utilisés sont de 1,67 Gy/min pour 25 kVp et 1,2 Gy/min et pour 200 kVp. Les doses utilisées pour obtenir les courbes de survie sont 1, 2, 3, 4, 5 et 6 Gy. De la même manière que Slonina *et al* en 2003, ils caractérisent leurs configurations d'irradiation en calculant la contribution de dépôt de dose des photons en fonction de leur énergie. Pour les irradiations à 25 kVp, ils mentionnent que la principale contribution de la dose absorbée (68%) provient des photons

d'une énergie comprise entre 10 et 20 keV. Pour les irradiations à 200 kVp, la principale contribution de la dose absorbée (83%) provient des photons d'une énergie comprise entre 40 et 150 keV, tandis qu'une petite proportion (seulement 2%) de la dose provient de photons ayant des énergies inférieures à 40 keV. Ils irradient des cellules primaires humaines de l'épiderme (HEKn) des fibroblastes humains (HFIB) et murins (NIH/3T3), non synchronisés au moment de l'irradiation. Ils réalisent des courbes de survie clonogénique en fonction du type cellulaire et du rayonnement X utilisé. En comparant leur rayonnement de référence de 200 kVp avec celui obtenu pour la tension de 25 kVp, ils obtiennent des valeurs d'EBR de 1,33, 1,25 et 1,10 pour les cellules HEKn, NIH/3T3 et V79 respectivement, calculées pour une fraction survivante de 10%, à partir des courbes ajustées.

Dans leur publication de 2006, Lehnert *et al.*, étudient également la survie clonogénique de leur lignée épithéliale mammaire immortalisée MCF-12A (Lehnert *et al.*, 2006). Pour rappel, ils utilisent dans ce travail les mêmes rayonnements X que Panteleeva *et al.*, à savoir 25 kVp et 200 kVp (rayonnement de référence), obtenus à partir des mêmes irradiateurs. La dosimétrie et la caractérisation de leurs configurations sont réalisées de manière strictement identique à celles utilisées pour l'étude des micronoyaux. Cependant pour les courbes de survie et uniquement pour la survie clonogénique, les irradiations à 25 kVp sont réalisées sans milieu, les doses utilisées sont de 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10 Gy. Enfin, pour la tension de 25 kVp, le débit de dose est de 1,9 Gy/min, alors que pour la tension de 200 kVp, le débit de dose est de 1,2 Gy/min. Ils réalisent des courbes de survie et déterminent la valeur d'EBR, calculée comme le ratio des doses du rayonnement de référence et du rayonnement testé pour une fraction survivante de 10 %. Ils obtiennent un EBR légèrement supérieur à 1 (1,13).

De la même manière qu'en 2006, Lehnert *et al.* couplent à leurs mesures de micronoyaux réalisées en 2008 à 10 kVp et 200 kVp, une évaluation comparative de la survie

clonogénique à ces 2 tensions (Lehnert et al., 2008). Les doses utilisées sont de 1, 2, 3, 4, 5 et 7 Gy et les débits de dose de 0,53 Gy/min pour la tension de 10 kVp et 1,2 Gy/min pour la tension de 200 kVp. A partir des courbes de survie obtenues, ils calculent une valeur d'EBR, calculée comme le ratio des doses du rayonnement de référence et du rayonnement testé pour une fraction survivante de 10 %. Ils obtiennent un EBR de 1,21, supérieur à celui obtenu pour 25 kVp.

### 7.2.3. Quantification des CDB

La dernière conséquence biologique étudiée pour comparer 2 types de rayonnements X est le taux de cassures double brin. Beyreuther et al., en 2009, étudient notamment le taux de cassures double brin après irradiation à différentes tensions de rayonnements X, 10 kVp, 25 kVp et 200 kVp (Beyreuther, Lessmann, Pawelke, & Pieck, 2009). Les irradiations sont réalisées à l'aide de 2 irradiateurs, à savoir le Forward Raytech pour les tensions de 10 kVp et 25 kVp et le Röntgen Seifert pour la tension de 200 kVp. La dosimétrie des irradiations est réalisée à l'aide de chambres d'ionisation. Les doses utilisées sont 0,25, 0,5, 1, 2, 4 et 6 Gy, à des débits de doses différents pour chacune des tensions, soit 0,65 Gy/min, 2 Gy/min et 1,34 Gy/min pour les tensions de 10 kVp, 25 kVp et 200 kVp, respectivement. Ils utilisent des lignées cellulaires épithéliales de glande mammaire humaine, des cellules adhérentes et immortalisées mais pas cancéreuses (184A1). Ils réalisent des courbes dose-réponse basées sur le dénombrement des foyers co-localisés  $\gamma$ H2A.X et 53BP1, 24 heures après l'exposition aux rayonnements X. Ils calculent alors des EBRs, sur la base des ratios du nombre de foyers co-localisés du rayonnement de référence et du nombre de foyers co-localisés des rayonnements testés (10 kVp et 25 kVp), ces valeurs étant estimées à partir des courbes dose-effet ajustées. Ils concluent, en fonction de la dose utilisée, à un EBR, pour les foyers persistants 24h après l'irradiation, entre 4 et 7 pour la comparaison entre 10 kVp et 200 kVp et un EBR entre 1 et 2 pour la comparaison entre 25 kVp et 200 kVp.

#### 7.2.4. Synthèse

Ainsi, depuis 1989, une dizaine d'études ont comparé les effets biologiques différentiels induits par de bas voltages, par rapport à une irradiation de référence. L'ensemble de ces travaux semblent démontrer une augmentation des aberrations chromosomiques, une diminution de la survie clonogénique et une augmentation du nombre de CDB plus l'énergie diminue. Cependant l'amplitude de ces augmentations/diminutions reste difficile à apprécier, et cela pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, toutes ces études caractérisent cette augmentation par rapport à un rayonnement de référence, notamment à travers le calcul d'un EBR (Tableau 2). En fonction des études, le voltage de référence n'est pas toujours le même, et peut correspondre à une tension de 120 kVp, 200 kVp, 220 kVp ou encore du  $^{60}\text{Co}$ . Ce constat rend particulièrement délicat l'estimation de l'amplitude des effets constatés. D'autant plus que les variations de protocoles expérimentaux d'irradiation varient d'une étude à l'autre.

Ainsi, les études radiobiologiques citées précédemment, relatent des débits de doses assez variables, de 0,25 Gy/min (Mestres et al., 2011; Verhaegen & Vral, 1994) à 2 Gy/min (Beyreuther, Dörr, et al., 2009). Ces variations de débits de dose peuvent influencer les taux de formation d'aberrations chromosomiques et les cinétiques de signalisation et de réparations des CDB et contribuent donc à la difficulté de comparer les études entre elles. De plus, certaines études utilisent des débits de doses différents en fonction de la tension utilisée (Beyreuther, Dörr, et al., 2009; Lehnert et al., 2008, 2006, Mestres et al., 2011, 2008; Slonina et al., 2003) et parfois même entre les doses d'une même courbe. A partir de ces irradiations et de ces débits doses variables, des coefficients de courbe dose-effet sont calculés dans le but de comparer les effets biologiques étudiés. Or, il peut être délicat de comparer 2 coefficients de courbe alors que les débits de doses ne sont pas les mêmes, notamment d'un point de vue purement mathématique. Cela ne remet pas fondamentalement en cause les résultats obtenus, en particulier pour les aberrations chromosomiques. En effet, c'est pour les tensions les plus

faibles que l'on constate généralement un changement de débit de dose vers des valeurs plus basses. Mais la diminution du débit de dose contribue généralement à une diminution du taux d'aberrations chromosomiques et toutes les études rapportent une augmentation de leur fréquence aux basses tensions même si le débit de dose utilisée peut s'avérer plus faible que pour le rayonnement de référence. Par contre, cela relativise la valeur absolue de ces augmentations. Ces variations de débits de dose peuvent s'avérer plus problématiques pour la comparaison du taux de CDB par l'intermédiaire de leur signalisation car les cinétiques associées peuvent être très impactées par le débit dose utilisé.

Une autre variation de protocole expérimental récurrente constatée entre l'irradiation de référence et la tension testée est l'exposition des cellules en absence de milieu de culture spécifiquement pour les très basses tensions (notamment 10 kVp) et ceci certainement en raison des phénomènes d'atténuation très forts à ces tensions. Cette différence entre condition de référence et condition testée pourraient potentiellement jouer un rôle dans le différentiel d'effet biologique mesuré.

Une autre source de variabilité entre les différentes études est le type cellulaire utilisé pour la comparaison de différentes tensions de rayonnements X. Ainsi, pour les études sur la survie clonogénique, des cellules cancéreuses asynchrones sont généralement utilisées tandis que pour les aberrations chromosomiques, les lymphocytes primaires quiescents du sang circulant sont généralement privilégiés. Ces différences d'état dans le cycle au moment de l'irradiation peuvent influencer fortement sur la radiosensibilité cellulaire. Ceci contribue encore à la difficulté à pouvoir combiner les résultats obtenus dans chacune de ces études pour estimer une amplitude absolue de l'augmentation des effets biologiques lorsque l'énergie du rayonnement X diminue. Cette estimation semble pourtant indispensable pour formuler l'hypothèse d'une augmentation éventuelle du risque.

| Références                       | Conséquences biologiques                         | Lignées cellulaires | Rayonnement de référence            | Rayonnements étudiés                           | Doses (Gy)  | Débits dose (Gy/min)  | Méthodologie analytique  |
|----------------------------------|--|---------------------|-------------------------------------|--|---|---|--|
| (Sasaki et al., 1989)            | Dicentriques                                     | Lympho              | Co <sup>60</sup>                    | 4.8, 6.9, 12.4, 13.8 et 14.6 keV (Synchrotron) | 0,4   | Information non fournie   | Ratio de coefficient $\alpha$ pour déterminer l'EBR                                      |
| (Verhaegen & Vral, 1994)         | Micronoyaux                                      | Lympho              | Co60 (Philips MG420)                | 14, 50, 350 kVp                                | 0,1<br>0,2<br>0,5<br>1,2<br>3<br>4<br>1                       | 0,25  | Ratio de pentes pour déterminer l'EBR  |
| (Slonina et al., 2003)           | Micronoyaux                                      | HEKn, HFIB, NIH/3T3 | 200 kVp (Forward Raytech)           | 25 kVp (Roentgen Seifert)                      | 2<br>3<br>4<br>5  | 1,2 pour 200 kVp et 1,3 pour 25 kVp                                   | Ratio de pentes pour déterminer l'EBR  |
| (Krumrey et al., 2004)           | Dicentriques                                     | Lympho              | Co <sup>60</sup>                    | 1.83, 3.1, 4.8, 6.9, 10 et 17,4 keV            | 0,25<br>0,5<br>0,75<br>1<br>2                                 | Le temps d'irradiation pour déposer 1Gy est compris entre 30s et 600s | Ratio de coefficient $\alpha$ pour déterminer l'EBR                                      |
| (Lehnert et al., 2006)           | Micronoyaux                                      | MCF-12A             | 200 kVp (Forward Raytech)           | 25 kVp (Roentgen Seifert)                      | 0,5<br>1<br>1,5<br>2<br>3<br>3,5                              | 0,3<br>1,2 pour 200 kVp et 1,5 pour 25 kVp                            | Ratio de coefficient $\alpha$ pour déterminer l'EBR                                      |
| (Mestres et al., 2008)           | Dicentriques, translocations                     | Lympho              | 120 kVp (Therapax SXT 150 (Pantak)) | 30 et 80 kVp (Therapax SXT 150 (Pantak))       | 0,05<br>0,1<br>0,2<br>0,4<br>0,6<br>0,7<br>0,8<br>1<br>2<br>3 | 0,25 pour 30 kV, 0,95 pour 80 kV et 1,15 pour 120 kV                  | Ratio de coefficient $\alpha$ pour déterminer l'EBR                                      |
| (Lehnert et al., 2008)           | Micronoyaux                                      | MCF-12A             | 200 kVp (Forward Raytech)           | 10 kVp (Roentgen Seifert)                      | 0,5<br>1<br>1,5<br>2<br>3<br>3,5                              | 0,53 pour 10 kV et 1,2 pour 200 kV                                    | Ratio de coefficient $\alpha$ pour déterminer l'EBR                                      |
| (Beyreuther, Dörr, et al., 2009) | Fragments, dicentriques, anneaux                 | 184A1 et MCF-12A    | 200 kVp (Forward Raytech)           | 10 et 25 kVp (Roentgen Seifert)                | 0,5<br>1<br>2<br>3<br>5                                       | 0,3<br>0,5 pour 10 kV, 2 pour 25 kV et 1,2 pour 200 kV                | Ratio de coefficients $\alpha$ et $\beta$ pour déterminer l'EBR                          |
| (Mestres et al., 2011)           | Dicentriques, anneaux centriques, translocations | Lympho              | 120 kVp (Therapax SXT 150 (Pantak)) | 30 et 80 kVp (Therapax SXT 150 (Pantak))       | 2<br>4<br>6   | 0,25 pour 30 kV, 0,95 pour 80 kV et 1,15 pour 120 kV                  | Dénombrement des aberrations complexes pour tous les voltages utilisés                   |
| (Panteleeva et al., 2003)        | Survie clonogénique                              | HEKn, HFIB, NIH/3T3 | 200 kVp (Forward Raytech)           | 25 kVp (Roentgen Seifert)                      | 1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6                                    | 1,67 pour 25 kV et 1,2 pour 200 kV                                    | Détermination de l'EBR à partir des courbes ajustées pour une fraction survivante de 10% |

|                                      |                     |                  |                           |                                 |                                  |   |   |
|--------------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|---|
| (Lehnert et al., 2006)               | Survie clonogénique | MCF-12A          | 200 kVp (Forward Raytech) | 25 kVp (Roentgen Seifert)       | 1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>7<br>10 | 1,9 pour 25 kV et 1,2 pour 200 kV                 | Détermination de l'EBR à partir des courbes ajustées pour une fraction survivante de 10%  |
| (Lehnert, & Do, 2008)                | Survie clonogénique | MCF-12A          | 200 kVp (Forward Raytech) | 10 kVp (Roentgen Seifert)       | 1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>7       | 0,53 pour 10 kV et 1,2 pour 200 kV                | Détermination de l'EBR à partir des courbes ajustées pour une fraction survivante de 10%  |
| (Beyreuther, Lessmann, et al., 2009) | Foyers              | 184A1 et MCF-12A | 200 kVp (Forward Raytech) | 10 et 25 kVp (Roentgen Seifert) | 0,25<br>0,5<br>1<br>2<br>4<br>6  | 0,65 pour 10 kV, 2 pour 25 kV et 1,34 pour 200 kV | Calcul d'un EBR en réalisant un ratio du nombre de foyers du rayonnement de référence sur nombre de foyer des rayonnements testés à partir d'une courbe ajustée, pour une dose donnée à 24 h post-irradiation |

*Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'état de l'art sur la comparaison de différentes énergies de rayonnements X*



---

## Partie 2 : Objectifs de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme IRSN en cours, qui s'intitule Radiobiologie des systèmes intégrés pour l'optimisation des traitements utilisant des rayonnements ionisants et évaluation du risque associé (ROSIRIS). L'un des axes de recherche de ce programme consiste à étudier, à l'échelle submicrométrique, des relations entre la topologie des dépôts d'énergie et celle des évènements biologiques initiaux associés aux dommages moléculaires engendrés. Mon travail de thèse se concentre sur la question particulière des rayonnements X et sur l'étude de la relation entre leurs énergies et leurs effets sur la matière biologique.

En effet, alors que la CIPR considère un facteur de pondération de 1, quelle que soit l'énergie des photons, certains travaux de recherche se sont intéressés à comparer différentes énergies de photons pour essayer d'évaluer les risques liés à de telles expositions. Ainsi, bien que ces études soient relativement peu nombreuses (une dizaine durant les 30 dernières années), elles mettent clairement en évidence une augmentation du taux d'aberrations chromosomiques lorsque l'énergie des rayons X diminue. Cependant, la littérature reste très limitée concernant la caractérisation des causes de cette augmentation, notamment en ce qui concerne les dommages de l'ADN potentiellement à l'origine de ces différences. D'ailleurs, aucune étude ne combine, dans les mêmes conditions expérimentales, la mesure comparative des dommages, de la division cellulaire et des aberrations chromosomiques.

L'objectif de ce travail de thèse a consisté à concevoir des conditions d'expositions robustes, permettant de comparer et d'analyser les effets biologiques, allant des dommages de l'ADN à la survie cellulaire, sur une large gamme de rayonnements X, des énergies utilisées en mammographie à celles utilisées en radiothérapie.

---

## Partie 3 : Matériels et Méthodes

## 1. Stratégie expérimentale

Pour répondre aux objectifs de ce travail, une stratégie expérimentale robuste en physique et en biologie a été nécessaire afin de pouvoir comparer différents types de rayonnement X.

Le premier point clef de ce travail comparatif a consisté à s'assurer que la dose absorbée par la cible biologique était la même pour l'ensemble des énergies étudiées. Pour cela, nous avons porté une attention particulière au support de culture cellulaire, à l'environnement des cellules en minimisant la couche de matériel entre la sortie du tube à rayons X et les cellules exposées, pour éviter les phénomènes d'atténuation dû au milieu de culture. De plus, la réalisation de la modélisation des irradiations par simulation numérique nous permettra d'obtenir pour chaque configuration de rayonnements X étudiée, le spectre des photons et des électrons secondaires.

L'autre point d'attention qui a guidé la mise au point de cette stratégie expérimentale est l'identification et la minimisation des biais expérimentaux associés aux effets biologiques étudiés (Figure 21). L'un des choix stratégiques a été de travailler sur des cellules primaires, synchronisées, et ceci pour 2 raisons : la première étant de s'assurer de l'homogénéité du contenu en ADN entre les cellules du tapis cellulaire, et de ce fait d'une similarité de la densité de la cible étudiée ; la deuxième étant de minimiser la variabilité de la prise en charge des dommages et du devenir cellulaire en fonction du cycle cellulaire. Ensuite, nous avons fait en sorte d'analyser les différents effets biologiques à partir d'une même irradiation initiale, c'est-à-dire provenant de la même culture cellulaire. Enfin, nous avons choisi des conséquences biologiques susceptibles d'avoir des liens de causalité les unes par rapport aux autres à travers la formation des CDB, la capacité des cellules à se diviser, à former des anomalies de ségrégation et à mourir post-irradiation. En ce qui concerne la formation des CDB, nous avons opté pour la microscopie à fluorescence dans le but d'avoir une sensibilité

importante dans leur détection à des doses raisonnables (<10 Gy). Cette technique nous permettra également d'obtenir des informations sur la localisation des dommages au sein d'un noyau et de déployer une méthodologie automatisée d'analyse, en augmentant le nombre d'évènements mesurés tout en diminuant les incertitudes liées à l'échantillonnage. Pour finir, l'approche par la microscopie à fluorescence permettra également de coupler l'analyse des CDB à celle des anomalies de ségrégation. En ce qui concerne la division cellulaire et l'analyse de la mortalité, la vidéomicroscopie rendra possible la mesure directe de ces évènements cellulaires, post-irradiation.

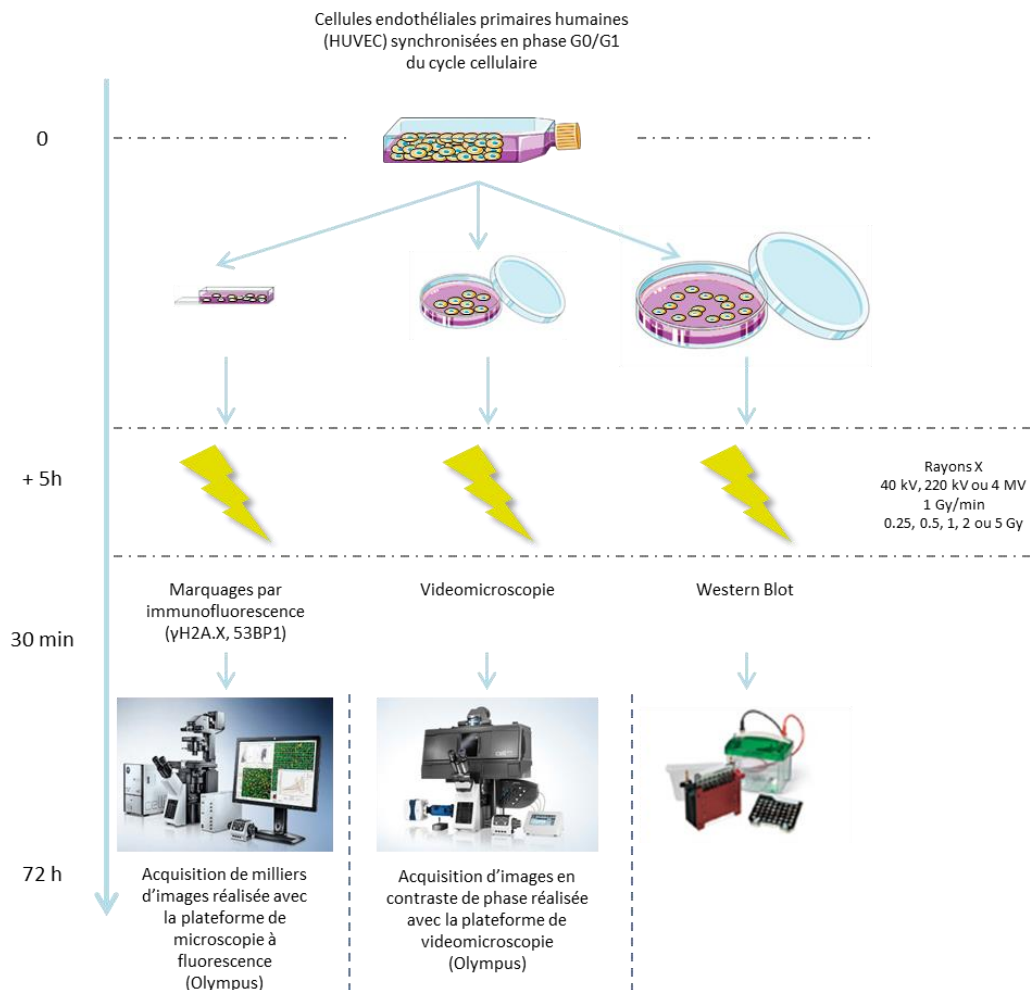


Figure 21: Schéma de la stratégie expérimentale déployée pour la partie biologique

## 2. Culture cellulaire

### 2.1. Amplification

Des cellules endothéliales primaires de la veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été achetées au passage P1 chez le groupe Lonza (ref. C2519A, lot 0000394986) et isolées par Lonza à partir d'un don de tissus humain après autorisation pour son utilisation dans des applications de recherche par consentement éclairé ou autorisation légale. Les cellules ont été testées et aucun mycoplasme, bactérie, levure et champignon n'a été détecté. Le lot de cellules et les donneurs ont été testés pour le HIV-1, l'hépatite B et C et les résultats ont été négatifs. Les HUVEC ont été cultivées à 37°C, avec 95% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu EGM-2 optimisé pour la prolifération des cellules endothéliales et 5% de sérum de veau fœtal, d'hydrocortisone, de hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, d'acide ascorbique, de hEGF, de gentamicine et d'amphotérine B ont été ajoutés (EGM-2MV BulletKit, CC-3202, Lonza). Pour les amplifier, les cellules ont été décongelées et une ampoule de 860 000 cellules a étéensemencée dans 3 boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> soit environ 3800 cellules/cm<sup>2</sup>. Après 4 jours de culture, les cellules ont été trypsinées et congelées dans du milieu après y avoir ajouté 10% de sérum de veau fœtal et 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO). La quantité de cellules par ampoule était de 600 000 (en passage P2). Elles ont ensuite été stockées dans un congélateur à -150 °C.

### 2.2. Ensemencement cellulaire

Pour obtenir des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, elles ont été synchronisées par inhibition de contact en les amenant à confluence. Pour cela, au moment de la remise en culture des cellules issues d'une ampoule de congélation, elles ont été comptées à l'aide du Cellometer K2 Fluorescent Viability Cell Counter afin de les ensemer à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Pour le maintien en culture, le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Un passage a été réalisé 3 jours plus tard, lorsque la culture était à 80-90% de

confluence. Les cellules ont étéensemencées à nouveau à 8000 cellules/cm<sup>2</sup> et jusqu'à atteindre la confluence pour le jour de l'irradiation, 4 jours plus tard. Ensuite, elles ont étéensemencées à 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans 3 supports différents, afin de réaliser 3 types d'analyses, comme suit :

- Sur des lames en plastique montées d'une chambre de culture Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™, Permanox® slides avec 1 ou 2 puits de culture (Thermo Fisher Scientific) pour la microscopie à fluorescence,
- Sur des boîtes de Pétri 35 x 10 mm EASY GRIP (BD Biosciences) pour la videomicroscopie,
- Sur des boîtes de Pétri 100 x 20 mm OPTILUX (BD Biosciences) pour les expériences de Western Blot.

Elles ont ensuite été remises dans l'incubateur à 37°C pour un temps d'adhésion de 5 heures avant l'irradiation. Nous nous sommes assurés que les cellules ne reprenaient pas le cycle cellulaire pendant ce temps d'adhésion, à l'aide du taux de cellules en phase G0/G1. Le pourcentage de G0/G1, 5h après la mise en culture est de  $78,9 \pm 9\%$ .

### 3. Configurations d'irradiation

Les irradiations ont été réalisées à l'aide de 2 plateformes d'irradiation : un accélérateur médical linéaire, Elekta Synergy® et une plateforme de recherche d'irradiation des petits animaux (Small Animal Radiation Research Platform), appelé SARRP.

L'accélérateur linéaire est un accélérateur de rayons X de type médical. Cette plateforme a été utilisée pour délivrer des rayonnements X d'une énergie maximale de 4 MeV (4 MVp) à un débit dose de 1 Gy/min. La mesure du débit dose a été faite à l'aide d'une chambre de ionisation, en kerma dans l'air, à environ 120 cm de la source avec un champ d'irradiation de 30 x 30 cm (Tableau 3). Pour les photons de haute énergie, et dans notre cas, la différence de dose a été considérée comme négligeable entre kerma dans l'air et dans l'eau.

Le SARRP (XSTRAHL, Ltd, UK), est un irradiateur, composé d'un tube à rayons X monté sur un portique, principalement dédié à l'irradiation des petits animaux (Wong et al., 2008). Cependant, en utilisant un collimateur adéquat, il est également possible d'effectuer des irradiations de cellules. Pour ce travail de thèse, 2 configurations, utilisant 2 tensions différentes, ont été utilisées sur cette plateforme. Dans les deux cas, une filtration intrinsèque, liée au SARRP, de 0.8 mm de béryllium et une filtration supplémentaire de 1 mm d'aluminium (pour nettoyer le spectre de photons à la sortie du tube à rayons X), une distance de 30.5 cm et un collimateur conduisant à un champ d'irradiation de 8 x 8 cm ont été utilisés (Tableau 3). Le SARRP a été utilisé pour délivrer des rayonnements X d'une énergie maximale de 40 keV (40 kVp) à un débit dose de 1 Gy/min et 220 keV (220 kVp) au même débit dose. Dos Santos *et al*, 2018 détaille le protocole de dosimétrie utilisé pour les irradiations sur le SARRP (Dos Santos et al., 2018). Brièvement, les mesures dosimétriques ont été réalisées dans le support de culture utilisé, avec une chambre de ionisation calibrée en kerma dans l'air et ensuite convertit en kerma dans l'eau. L'atténuation causée par le milieu de culture a été mesurée à l'aide de films dosimétriques EBT3.

Pour toutes les irradiations, les doses délivrées au niveau des cellules ont été de 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 Gy pour les temps d'analyse précoces (30 min et 5 h post-irradiation), et 5 Gy pour les temps d'analyse tardifs (de 24 h à 72 h post-irradiation). Le milieu de culture n'a pas été renouvelé après les irradiations.



| Tension                                   | 40 kVp   | 220 kVp  | 4 MVp  |
|---|--|--|--|
| Intensité                                 | 26 A   | 2.5 A  | -  |
| Filtrations                               | 0.8 mm Be + 1 mm Al  | 0.8 mm Be + 1 mm Al  | -  |
| Valeur HVL                                | 0.852 mm Aluminium   | 0.667 mm Cuivre  | -  |
| Champ d'irradiation                       | 8 x 8 cm <sup>2</sup>                                      | 8 x 8 cm <sup>2</sup>                                      | 30 x 30 cm <sup>2</sup>                          |
| Distance entre la source et l'échantillon | 30.5 cm  | 30.5 cm  | 120 cm   |
| Débit dose aux cellules                   | 0.905 Gy/min<br>Kerma dans l'air                           | 1.041 Gy/min<br>Kerma dans l'air                           | 1 Gy/min<br>Kerma dans l'air                     |
| Energie effective                         | 25.6 keV   | 70.2 keV   | -  |
| Détecteurs utilisés                       | Chambre d'ionisation<br>& films<br>radiochromiques<br>EBT3 | Chambre d'ionisation<br>& films<br>radiochromiques<br>EBT3 | Chambre d'ionisation<br>PTW 0.125cc <sup>3</sup> |

Tableau 3: Détails des différentes configurations utilisées

L'incertitude sur la mesure du débit dose est d'environ 5%, 3% et 7% pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp respectivement.

Les cellules ont été irradiées à température ambiante et remises dans l'incubateur à 37°C après l'irradiation. A partir de ce moment-là, les milieux de culture n'ont plus été changés.

## 4. Marquages par immunofluorescence

### 4.1. Protocole de marquage par immunofluorescence

Les cellules HUVEC ont été marquées par immunofluorescence après chaque

irradiation. Elles ont été lavées avec du PBS 1X (14190-094, Life Technologies), fixées avec une solution de formaline à 10% (HT5011, Sigma-Aldrich) et perméabilisées avec 0.5% de Triton 100 X (T8787, Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes, et ensuite lavées 3 fois avec du PBS.

Le Tableau 4 récapitule les anticorps utilisés pour ce protocole.

| Cible                           | Anticorps primaires                                |  |          |            | Anticorps secondaires                                 |                                    |                                 |          |            |
|---------------------------------|--|--|----------|------------|---|------------------------------------|---------------------------------|----------|------------|
|                                 | Hôte   | Référence                                | Dilution | Incubation | Hôte  | Fournisseur                        | Fluorochrome                    | Dilution | Incubation |
| <b><math>\gamma</math>H2A.X</b> | IgG1<br>monoclonal<br>produit<br>chez la<br>souris | 05 – 636<br>clone<br>JBW301<br>Millipore | 1/800    | 1 h        | Anti IgG<br>de souris<br>produit<br>chez la<br>chèvre | A21121<br>Life<br>Technologie<br>s | Alexa Fluor <sup>®</sup><br>488 | 1/1000   | 1 h        |
| <b>53BP1</b>                    | IgG<br>polyclonal<br>produit<br>chez le<br>lapin   | A300-272-<br>A<br>Bethyl                 | 1/1000   | 1 h        | Anti IgG<br>de lapin<br>produit<br>chez la<br>chèvre  | T 6391<br>Life<br>Technologie<br>s | Texas Red <sup>®</sup>          | 1/1000   | 1 h        |

*Tableau 4: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le protocole de marquage par immunofluorescence. Tous les anticorps ont été dilués dans du PBS 2% BSA*

Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS 1X, et l'ADN a été marqué avec du DAPI (4',6'-diaminodino-2-phénylindole ; 0,2  $\mu$ g/ml ; 1050A, Euromedex) et les lames ont ensuite été montées avec du Prolong<sup>®</sup> Antifade (P36390, Life Technologies). Vingt-quatre heures après séchage, les lames ont pu être acquises.

## 4.2. Acquisition par microscopie à fluorescence

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une plateforme de microscopie inversée à fluorescence IX81 d'Olympus et d'un objectif avec un grossissement de x100 (UPLSAPO, Olympus) à immersion dans l'huile avec une ouverture numérique de 1,4. Il est monté sur une tourelle, permettant un déplacement en profondeur de champs (Z) pour la mise au point et la prise d'image sur différents plans focaux (Z stack). Une lampe xenon/mercure a été utilisée avec trois couples de filtres de longueurs d'onde d'excitations et d'émissions de fluorescence suivantes : 402 nm  $\pm$  15 nm / 455 nm  $\pm$  50 nm (pour le DAPI) ; 490 nm  $\pm$  20 nm / 525 nm  $\pm$  36 nm (pour l'Alexa Fluor<sup>®</sup>488) et 555 nm  $\pm$  25 nm / 605 nm  $\pm$  52 nm (pour le Texas Red<sup>®</sup>). Pour chaque canal, les images ont été acquises en Z stack (3 images), espacées

d'un espace de  $0,5\mu\text{m}$  de part et d'autre du plan focal. Les images en 3D ont ensuite été projetées en 2D en utilisant une projection d'intensité maximale. Le microscope est couplé à une caméra Orca R<sup>2</sup> CCD (Hamamatsu) et une platine motorisée IM X2 (Märzhäuser), permettant un déplacement en X et Y. le logiciel Scan<sup>R</sup> Acquisition (Olympus) pilote l'ensemble du microscope.

### 4.3. Méthodologie analytique

#### 4.3.1. Analyses des images

L'analyse des images a été effectuée à l'aide du logiciel Scan<sup>R</sup> Analysis (Olympus). L'algorithme de segmentation des objets, Edge, a été utilisé pour détourer les noyaux dans le canal DAPI (objet principal), les foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  dans le canal Alexa Fluor 488 (sous-objet 1) et les foyers 53BP1 dans le canal Texas Red (sous-objet 2). Cet algorithme détecte les bords des objets au point de contraste entre la fluorescence de l'objet et celle du bruit de fond (Figure 22). Ensuite les bords sont fermés et la forme détournée constitue l'objet détecté.

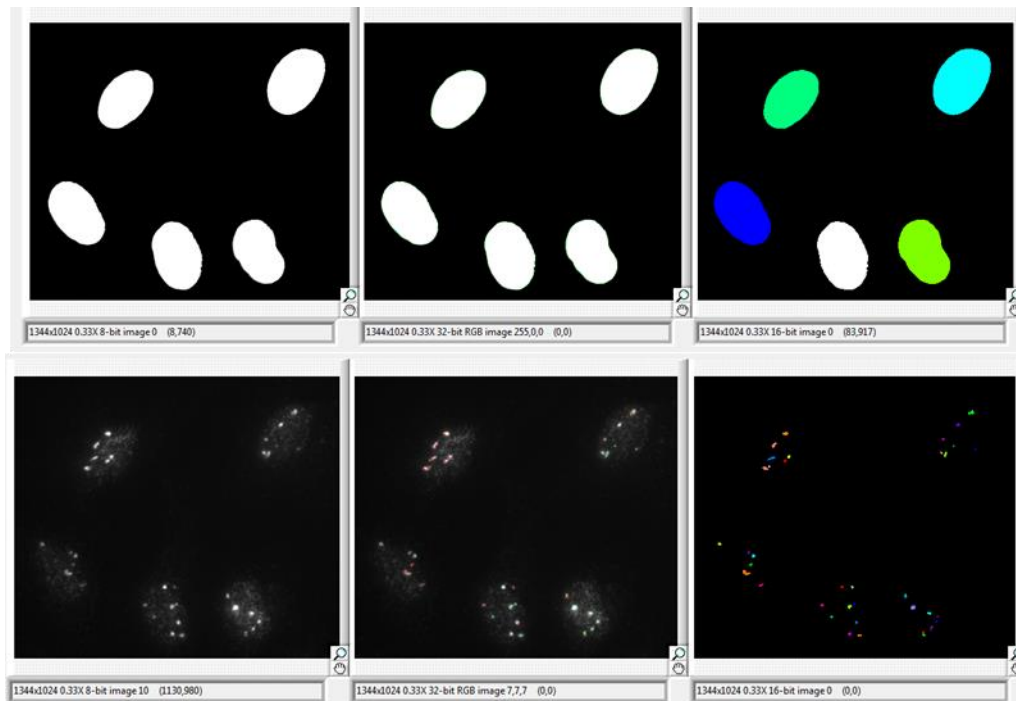


Figure 22: Analyse des images avec le logiciel Scan<sup>R</sup> Analysis (Olympus) et détourage des objets principaux et des sous-objets

Après avoir détourné les noyaux et les foyers, une première sélection est effectuée, basée sur la circularité et l'aire des noyaux d'HUVEC, à l'aide de la définition d'une région d'intérêt sur la représentation graphique en nuage de points de ces 2 paramètres (noyaux) (Figure 23, panel A). Cette région nouvellement définie, appelée « cellule », a permis de sélectionner uniquement les noyaux d'HUVEC isolés et de supprimer les débris de noyaux ou encore les groupes de noyaux. A partir des noyaux contenus dans cette région « cellule », une seconde région, appelée G0G1, basée sur les niveaux d'intensité totaux de DAPI (l'ADN) et d'Alexa Fluor 488 (signal  $\gamma$ H2A.X), mesurés pour chaque noyau, a été faite pour isoler les noyaux en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Seuls les foyers situés dans les objets (c'est-à-dire les noyaux) à l'intérieur de la région formée par l'intersection des deux régions ont ensuite été analysés (Figure 23, panel B).

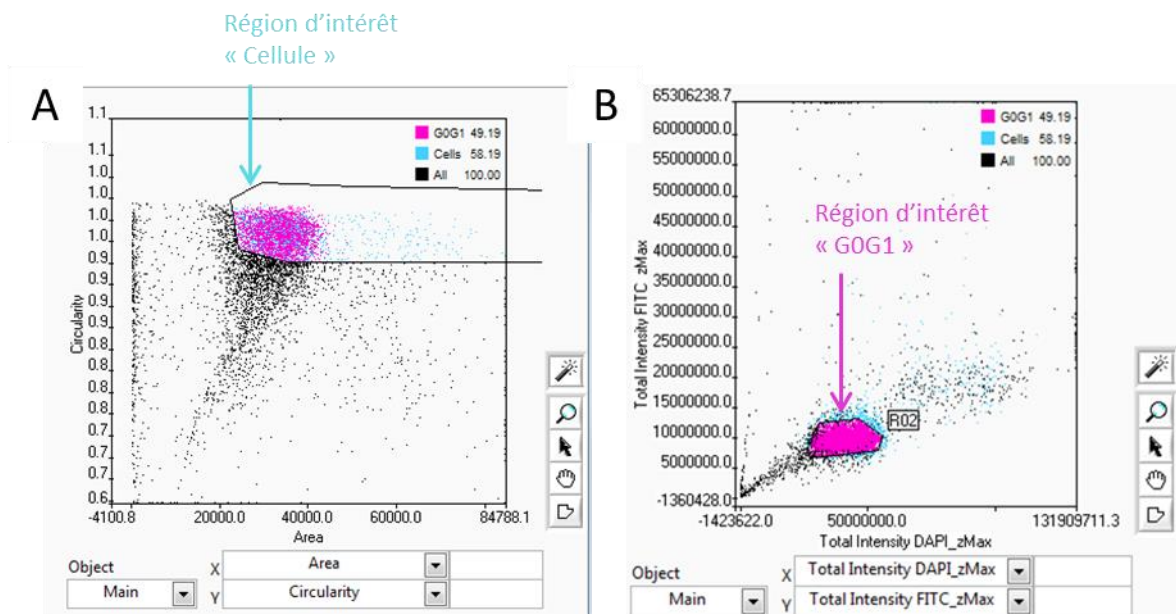


Figure 23 : Etape de sélection des noyaux en phase G0/G1 du cycle cellulaire

L'analyse d'images a permis l'obtention de matrices de mesure, pour les objets principaux (noyaux cellulaires) ainsi que les sous-objets (foyers  $\gamma$ H2A.X ou 53BP1). Il répertorie les mesures faites sur chaque objet et sous-objet, comme par exemple la circularité, l'aire, ou encore des caractéristiques de fluorescence, comme l'intensité de fluorescence totale,

moyenne, minimum et maximum de chaque objet ou sous-objet. Chaque détournage d'objet, noyau et foyer, a été utilisé comme un masque pour l'obtention de valeurs d'intensité de fluorescence dans chacun des canaux utilisés (DAPI, Alexa Fluor 488, Texas Red). Aussi pour les foyers  $\gamma$ H2A.X, par exemple, des valeurs d'intensité en Alexa Fluor 488 (fluorochrome utilisé pour le détecter) mais également en DAPI (pour la quantité d'ADN) et en Texas Red (pour la localisation de 53BP1) ont été obtenues.

#### **4.3.2. Analyses des données**

A partir des 3 fichiers exports obtenus par le logiciel d'analyse ScanR, contenant les mesures faites sur tous les noyaux et les foyers  $\gamma$ H2A.X et 53BP1, j'ai utilisé un logiciel de programmation, le logiciel libre R, spécialisé dans l'analyse statistique, afin d'analyser cette très grande quantité de données.

##### **4.3.2.1. Analyses des foyers $\gamma$ H2A.X**

Les foyers  $\gamma$ H2A.X et 53BP1 induits en phase G0/G1 du cycle cellulaire, de 30 min à 72 h après des irradiations à 40 kV, 220 kV et 4 MV, à 0.25, 0.5, 1 et 2 Gy ont été analysés. La quantité de ces foyers dans chaque noyau en phase G0/G1 a été étudiée en fonction de l'énergie utilisée et de la dose.

L'évolution de l'aire des foyers  $\gamma$ H2A.X au cours du temps, en fonction de l'énergie utilisée et de la dose a également été mesurée. Pour cela, à partir des fichiers obtenus avec le logiciel ScanR, l'aire de chaque foyer est donnée en pixel. Afin de le transformer en micromètre carré, la correspondance pixel- $\mu\text{m}^2$  a été mesurée en fonction de l'objectif du microscope utilisé et de la caméra et il a été défini que 1  $\mu\text{m}^2$  équivaut à une surface de 15,5 pixel pour un grossissement x100.

La distribution spatiale au sein du noyau a également été étudiée. Pour cela, les coordonnées en x,y de chaque foyer  $\gamma$ H2A.X dans l'image, paramètres mesurés par le logiciel d'analyse d'images, ont été utilisées. A partir de ces données, le théorème de Pythagore a été

appliqué, en suivant la formule suivante  $AB = \sqrt{(x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2}$  afin d'obtenir la distance en  $\mu\text{m}$  de chaque foyer entre eux au sein d'un noyau (Figure 24).

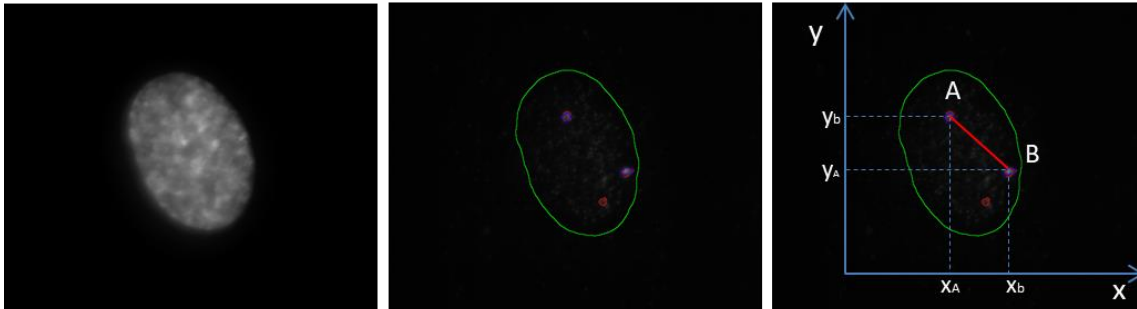


Figure 24: Calcul de la distance entre les foyers  $\gamma\text{H2AX}$  au sein des noyaux. Le même calcul a été réalisé pour les foyers 53BP1

Pour un foyer, différentes grandeurs ont été retenues :

- la distance de son plus proche voisin : minimum de toutes les distances ;
- la distance de son plus lointain voisin : maximum de toutes les distances ;
- la distance moyenne de ses voisins : moyenne de toutes les distances.

Puis, par noyau, il a été calculé :

- la distance des 2 foyers les plus proches ;
- la moyenne des distances des plus proches voisins de l'ensemble des foyers qu'il contient.

#### 4.3.2.2. Co-localisation des foyers $\gamma\text{H2A.X}$ et 53BP1

Les foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  et 53BP1 induits en phase G0/G1 du cycle cellulaire, de 30 min à 72 h après des irradiations à 40 kV, 220 kV et 4 MV, à 0.25, 0.5, 1 et 2 Gy ont été analysés. L'intensité correspondante à 53BP1 a été étudiée au niveau des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  détectés afin d'évaluer la co-localisation des 2 marqueurs. A l'aide de la programmation avec le logiciel R, l'analyse de la co-localisation de milliers de foyers a été automatisée, en deux étapes. Tout d'abord, il a fallu déterminer à partir de quel seuil d'intensité de fluorescence un foyer 53BP1

est détecté, au niveau d'un foyer  $\gamma$ H2A.X (appelé « foyer 53BP1 positif »). Pour cela, l'intensité moyenne du bruit de fond de 53BP1 de chaque noyau a été calculée. A partir de ces valeurs d'intensité de bruit de fond, la valeur seuil, au-dessus de laquelle l'intensité en 53BP1 est considérée comme signant la présence d'un foyer 53BP1 au niveau d'un foyer  $\gamma$ H2A.X, a été fixée arbitrairement à 1.2 fois la valeur de bruit de fond. Dans un second temps, ce ratio signal/bruit de fond a été calculé au niveau de tous les foyers  $\gamma$ H2A.X. Lorsque ce ratio est plus grand que le seuil de positivité du signal 53BP1 fixé plus haut, il y a co-localisation de 53BP1 au niveau du foyer  $\gamma$ H2A.X.

#### ***4.3.3. Analyses des cellules binucléées et des anomalies de ségrégation***

Les cellules binucléées et les anomalies de ségrégation, au sein des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, après irradiation à 40 kV et 4 MV, à une dose de 5 Gy (et les contrôles associés), 48 h post-irradiation ont été étudiées. A partir des lames utilisées pour quantifier les foyers de signalisation des dommages de l'ADN, nous avons compté manuellement le nombre de cellules mononucléées et binucléées avec ou sans micro-noyau et/ou pont cytosolique. Ensuite, nous avons calculé pour chaque cellule en phase G0/G1 du cycle cellulaire, la fréquence de cellules binucléées, la fréquence de foyers  $\gamma$ H2A.X et les anomalies de ségrégation, comme la présence de micronoyaux ou de ponts cytosoliques.

## **5. Videomicroscopie**

### **5.1. Acquisition par microscopie en contraste de phase**

Les HUVECs, mises en culture dans 2 Petri 35 x 10 mm EASY GRIP (BD Biosciences), une Petri pour la condition contrôle, l'autre Petri pour la condition irradiée, ont été placées dans un système d'incubation, permettant un contrôle des niveaux de CO<sub>2</sub> et d'humidité. Cette chambre d'incubation est montée sur un microscope inversé Olympus IX83, avec un objectif 10X (Olympus). Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du même logiciel ScanR décrit précédemment. Six champs ont été acquis par Petri, en contraste de phase, toutes

les 5 minutes, pendant 96 h.

## 5.2. Méthodologie analytique

Le logiciel, open source de traitement et d'analyse d'images, développé par les National Institutes of Health, ImageJ, a été utilisé. A partir des images acquises, et à l'aide du logiciel, et du Plug-In « MtrackJ », les évènements de division et de mortalité au cours du temps ont été quantifiés. Pour chaque évènement de division (Figure 25, panel A) et de mortalité (Figure 25, panel B) repéré, une mesure du temps de début (images de gauche) et de fin (image de droite) a été réalisée, et récupérée dans une table.

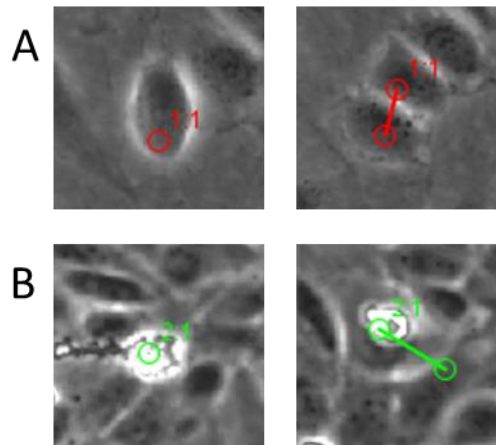


Figure 25: Analyse des films, obtenus par la vidéomicroscopie, en utilisant le logiciel ImageJ et le plug-in MTrackJ. Le panel A représente les évènements de division, et le panel B les évènements de mortalité.

## 6. Western Blot

### 6.1. Protocole de Western Blot

A chaque temps post-irradiation, les cellules ont été récupérées après ajout de la trypsine-EDTA (25300-054, Gibco), incubation pendant 5 min à 37°C et centrifugation pendant 5 min à 300g. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X (Tampon phosphate, 14190-094, Life Technologies) et centrifugées 2 fois à 300g pendant 5 min. Après avoir culotté les cellules, elles ont été lysées grâce à un tampon de lyse (Composition, Tableau 5).



| Produits           | Référence                   | Volume     |
|--------------------|-----------------------------|------------|
| NP 40              | I8896, Sigma                | 100µL      |
| HEPES 1M           | 59205C, Sigma               | 200µL      |
| KCl 0.075M         | 10575090, Life Technologies | 1.33mL     |
| EDTA 0.5M          | AM9260G, Life Technologies  | 20µL       |
| Glycerol 10%       | G2025, Sigma                | 1mL        |
| PhosphoSTOP        | Roche, 04906845001          | 1 pastille |
| Complete Mini EDTA | Roche, 05892970001          | 1 pastille |
| Eau stérile        |                             | QSP 10mL   |

*Tableau 5: Composition du tampon de lyse utilisé pour le Western Blot*

Le culot cellulaire ainsi que le tampon de lyse ont été incubés 20 min à 4°C et sous agitation. Puis, le mélange a été centrifugé 15 min à 13500 rpm. Après avoir récupéré le surnageant, les protéines ont été dosées. Pour ça, la technique de dosage de Bradford à l'aide du kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (5000201, BioRad) a été utilisée.

Une fois les protéines dosées, les échantillons ont été préparés, en ajoutant un agent réducteur (NuPAGE Reducing Agent, NP0004, Life Technologies), du Laemmli (Sample Buffer 4X Laemmli Sample Buffer, NP0007, Life Technologies) et de l'eau stérile. Pour l'étape de migration, des gels SDS-Page NuPAGE 3-8% Tris Acetate (EA03752BOX, Life Technologies) ou NuPAGE 10% Bis-Tris (NP0302BOX, Life Technologies) avec les tampons de migrations NuPAGE TA SDS Running Buffer (LA0041, Life Technologies) et NuPAGE MOPS Running Buffer (NP000102, Life Technologies) ont été utilisés, en fonction de la taille de la protéine détectée. La migration des protéines a été réalisée à 100V pendant 30 min, puis 150V pendant encore 30min.

Après la migration des protéines, le transfert en condition liquide a été réalisé, sur membranes de Nitrocellulose ou PVDF, en fonction de la protéine détectée. Pour cela, un tampon de transfert NuPAGE Transfert Buffer 20X (NP00061, Life Technologies) a été utilisé. Le montage en sandwich comme indiqué sur la Figure 26, a été réalisé.

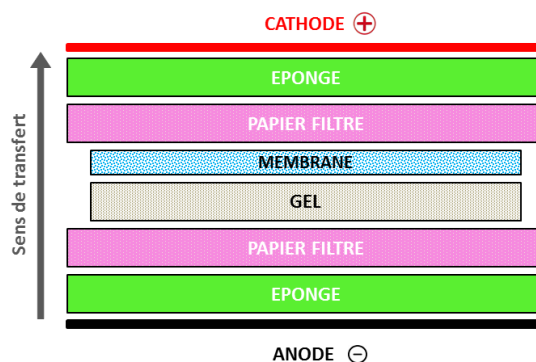


Figure 26: Montage en sandwich réalisé pour le transfert liquide

Le transfert des protéines s'est fait dans un bac à glace, et a duré 60 min à 100V.

## 6.2. Validation des anticorps utilisés

Après avoir effectué le transfert des protéines sur membranes de Nitrocellulose ou PVDF, les marquages anticorps ont été effectués. La validation des anticorps a été une étape primordiale. Elle a permis de définir les conditions optimales nécessaires à la quantification des protéines d'intérêt. Les anticorps des protéines d'intérêt ont été validés par comparaison entre les conditions non-irradiées et les conditions irradiées, ainsi que leur migration au niveau de leurs poids moléculaires correspondants. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de chargement. Les détails ainsi que les conditions d'incubation des membranes ont été répertoriés dans le Tableau 6.

| Anticorps primaires |                           |          |            |                  |        |                                   | Anticorps secondaires         |          |            |                   |
|---------------------|---------------------------|----------|------------|------------------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|----------|------------|-------------------|
| Nom                 | Fournisseur               | Dilution | Incubation | Agent bloquant   | PM kDa | Nom                               | Fournisseur                   | Dilution | Incubation | Agent bloquant    |
| <b>Phospho-ATM</b>  | Abcam<br>Ref ab81292      | 1/5000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%Lait | 350    | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%BSA  |
|                     | CST<br>Ref 2873           | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%BSA  | 350    | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%Lait |
| <b>Phospho-Chk2</b> | CST<br>Ref 2661           | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%Lait | 62     | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%Lait |
|                     | CST<br>Ref 2662           | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%BSA  | 62     | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%BSA  |
| <b>Phospho-P53</b>  | CST<br>Ref 9286           | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%Lait | 53     | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%Lait |
|                     | Santa Cruz<br>Ref sc-126X | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%BSA  | 53     | HRP goat anti Mouse IgG<br>(H+L)  | Life Technologie<br>(62-6520) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%BSA  |
| <b>GAPDH</b>        | Millipore<br>AB2302       | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+5%BSA  | 39     | HRP goat anti Mouse IgG<br>(H+L)  | Life Technologie<br>(62-6520) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%BSA  |
|                     | CST<br>Ref 2947           | 1/1000   | ON 4C      | TBS-T<br>+5%BSA  | 21     | HRP goat anti Rabbit IgG<br>(H+L) | Life Technologie<br>(65-6120) | 1/5000   | 1h RT      | TBS-T<br>+ 5%BSA  |

Tableau 6: Détails d'incubation des anticorps et des membranes utilisées

### **6.3. Acquisition des membranes par chimioluminescence**

Une fois que les membranes en nitrocellulose ou PVDF ont été incubées dans l'anticorps primaire et secondaire spécifique, les bandes protéiques ont été visualisées par chimioluminescence, à l'aide d'un substrat (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, 34096, ThermoScientific), qui est chimioluminescent en contact de la peroxydase de raifort (HRP, HorseRadish Peroxidase) présente sur l'anticorps secondaire. Une fois le réactif chimioluminescent déposé sur la membrane, la révélation de la membrane s'est faite 5 min après avoir laissé agir le réactif. L'analyseur d'images luminescentes LAS-3000 (FUJIFILM Life Science), doté d'une caméra CCD ayant une résolution de 6.3 Megapixels a été utilisé pour acquérir les membranes.

### **6.4. Méthodologie analytique**

Pour chaque temps post-irradiation, et leurs contrôles associés, les bandes protéiques ont été détournées manuellement, grâce au logiciel associé à la caméra Fujifilm Multi Gauge Analysis, à titre qualitatif. Les conditions contrôles correspondent aux boîtes de culture qui ont été manipulées de la même manière que les boîtes de culture irradiées, mais n'ont pas été exposées aux rayonnements X.

---

## Partie 4 : Résultats

# 1. Caractérisation des spectres énergétiques des photons et des électrons secondaires

Pour connaître exactement l'énergie des photons puis des électrons secondaires qui contribuent au dépôt de dose au niveau des cellules, la caractérisation des spectres énergétiques des photons, puis par la suite des électrons secondaires, a été primordiale. Les résultats présentés par la suite ont été générés par Morgane Dos Santos ainsi que Carmen Villagrasa, Nicolas Tang et Marta Bueno Vizcarra du Laboratoire de Dosimétrie des Irradiations de l'IRSN.

Tout d'abord il a fallu calculer les spectres des photons afin de connaître leur profil énergétique au niveau des cellules. Les spectres des photons pour les irradiations réalisées au SARRP à 40 kVp et 220 kVp ont été obtenus avec le logiciel Speckcalc (Poludniowski, Landry, DeBlois, Evans, & Verhaegen, 2009) (Figure 27). L'atténuation du milieu de culture cellulaire a également été prise en compte comme décrit dans Dos Santos *et al*, 2018 (Dos Santos et al., 2018). Brièvement, les mesures dosimétriques ont été réalisées en kerma dans l'air dans le support de culture utilisé et ensuite convertit en kerma dans l'eau. Ensuite, l'atténuation causée par le milieu de culture a été mesurée. Les proportions d'effets photoélectriques et Compton ont été évaluées à 68,9% et 31,1 % respectivement à 40 kVp et 19,6 % et 80,4 % respectivement à 220 kVp. En ce qui concerne le spectre énergétique des photons de 4 MVp, il se base sur la figure 10 de la publication de Sheikh-Bagheri, en 2002, et n'est pas représenté ici. Les énergies moyennes des spectres des photons sont respectivement de 25,6 keV, 70,2 keV et 1,3 MeV, pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp (Figure 28).

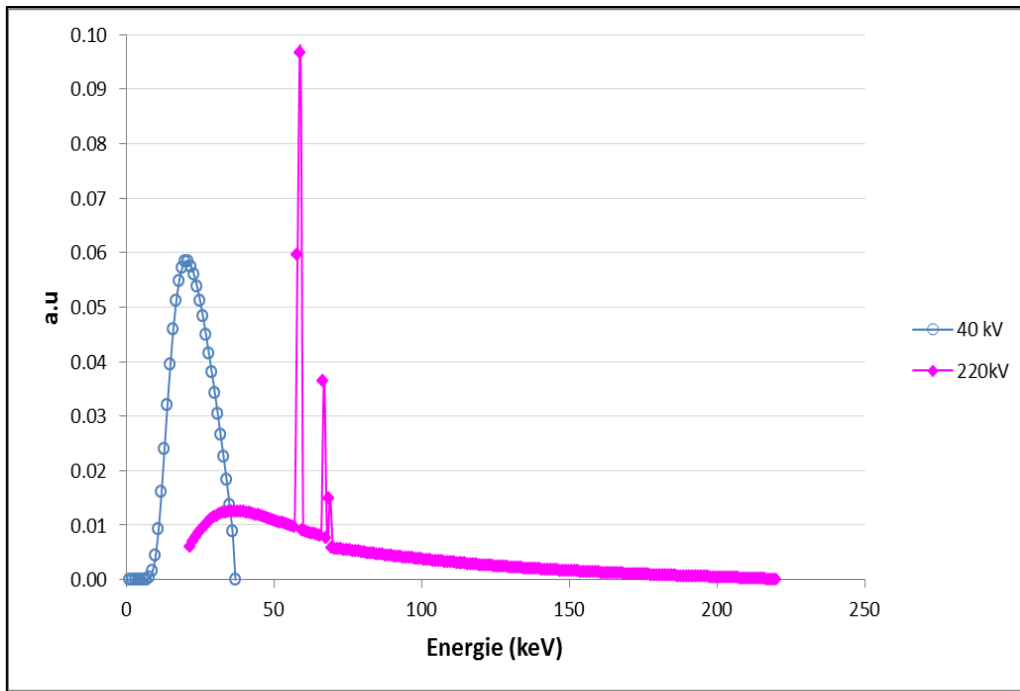


Figure 27: Spectres énergétiques des rayonnements X à 40 kV (courbe bleue) et 220 kVp (courbe rose) en utilisant le logiciel SpeckCalc. Leurs énergies moyennes sont 25,6 keV et 70,2 keV, respectivement.

Dans un second temps, les physiciens de l'IRSN ont déterminé le spectre des électrons secondaires générés au niveau de la couche cellulaire, à l'aide d'une simulation Monte Carlo, afin de connaître le profil énergétique des électrons secondaires qui contribuent au dépôt de dose dans les noyaux des cellules. La Figure 28 montre le spectre d'énergie des électrons secondaires obtenus pour les 3 configurations. L'énergie moyenne des électrons secondaires produits augmente avec les énergies, comme attendu, respectivement 14 keV, 20 keV et 859 keV pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp.

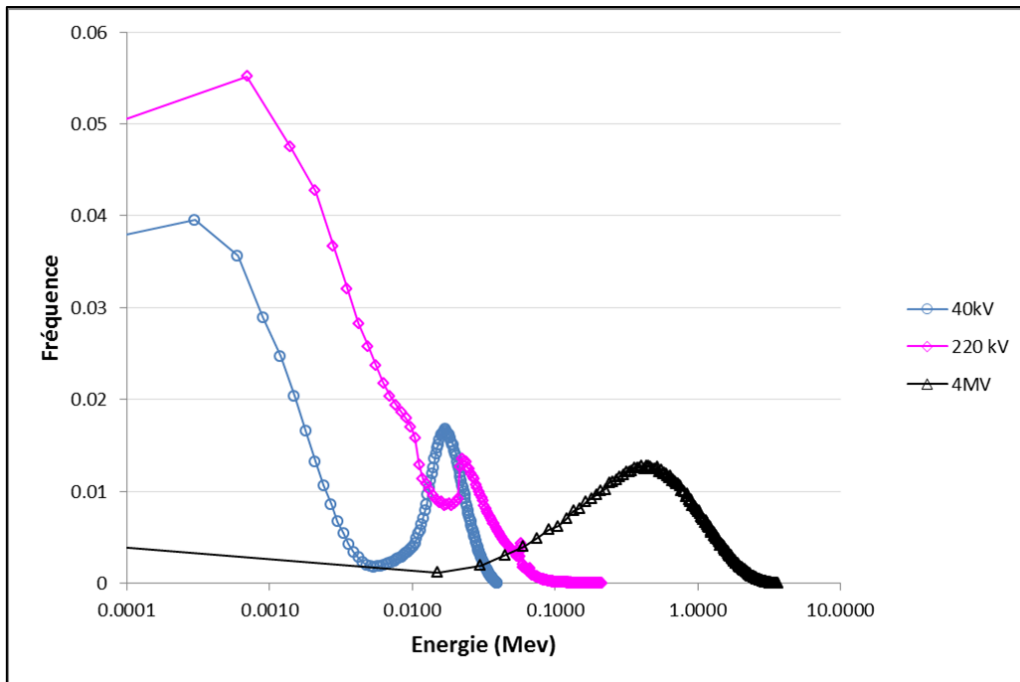


Figure 28: Spectres énergétiques des électrons secondaires au niveau du volume cellulaire, obtenus par simulations Monte Carlo, à l'aide de Geant4, sur le SARRP à 40 kVp (courbe bleue), et 220 kVp (courbe rose) et sur l'accélérateur médical à 4 MVp (courbe noire). Leurs énergies moyennes sont 14 keV, 20 keV et 859 keV, respectivement.

Entre 40 kVp et 220 kVp, il y a presque un facteur 3 dans l'énergie moyenne des photons, avec des valeurs de 25 keV contre 70 keV. Il y a également une différence importante dans les probabilités photoélectrique et Compton. Pourtant, cela ne suffit pas à créer une différence suffisamment importante entre les énergies moyennes des spectres énergétiques des électrons secondaires de 40 kVp et 220 kVp qui demeurent finalement relativement similaires (14 keV et 20 keV, respectivement), contrairement à celui de 4 MVp (énergie moyenne du spectre énergétique des électrons secondaires : 859 keV).



## 2. Quantification *in situ* des CDB

### 2.1. Foyers $\gamma$ H2A.X/53BP1

Pour quantifier *in situ* le nombre de CDB par noyau cellulaire, nous avons comparé l'immunodétection de 2 acteurs de la signalisation des CDB : 53BP1, qui est une protéine présente de manière ubiquitaire dans le noyau et qui se relocalise au niveau des dommages double brin de l'ADN pour ensuite activer la voie de réparation NHEJ ; et  $\gamma$ H2A.X, correspondant à la phosphorylation de l'histone H2A.X sur la Ser 139. Nous avons étudié la qualité, de par la netteté des marquages obtenus pour chacun de ces marqueurs de CDB. En effet, nous avons étudié leur co-localisation au cours du temps. La Figure 29, panel A, reporte le pourcentage moyen de co-localisation entre  $\gamma$ H2A.X et 53BP1 au cours du temps. Les valeurs moyennes  $\pm$  écart-type sont répertoriées dans la Figure 29, panel B.

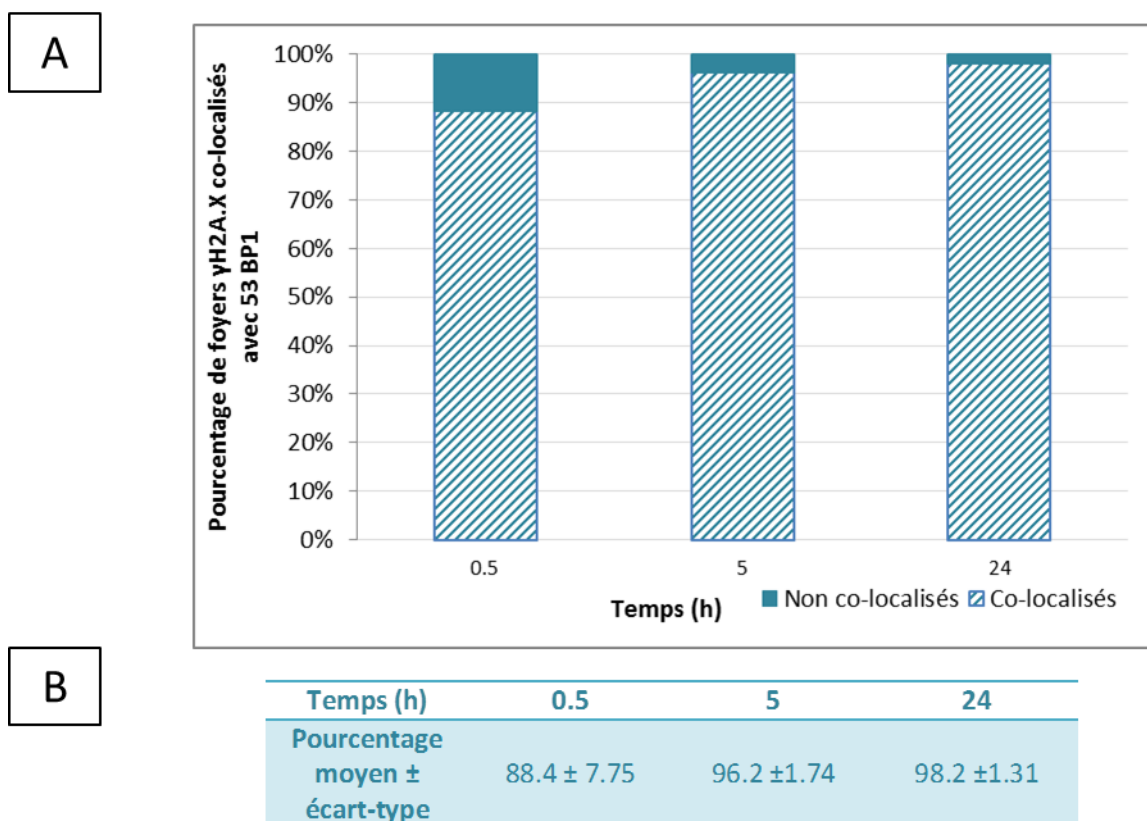


Figure 29: Pourcentage moyen de co-localisation  $\gamma$ H2A.X et 53BP1 au cours du temps, pour toutes les conditions irradiées. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type calculés à partir d'au moins 7 réplicats par tranche horaires (environ 3000 cellules par condition et 50 000 foyers  $\gamma$ H2A.X).

Le pourcentage moyen de relocalisation de 53BP1 avec la modification post-traductionnelle de l'histone H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) augmente avec le temps pour atteindre près de 98 % de co-localisation à 24h (Figure 29).

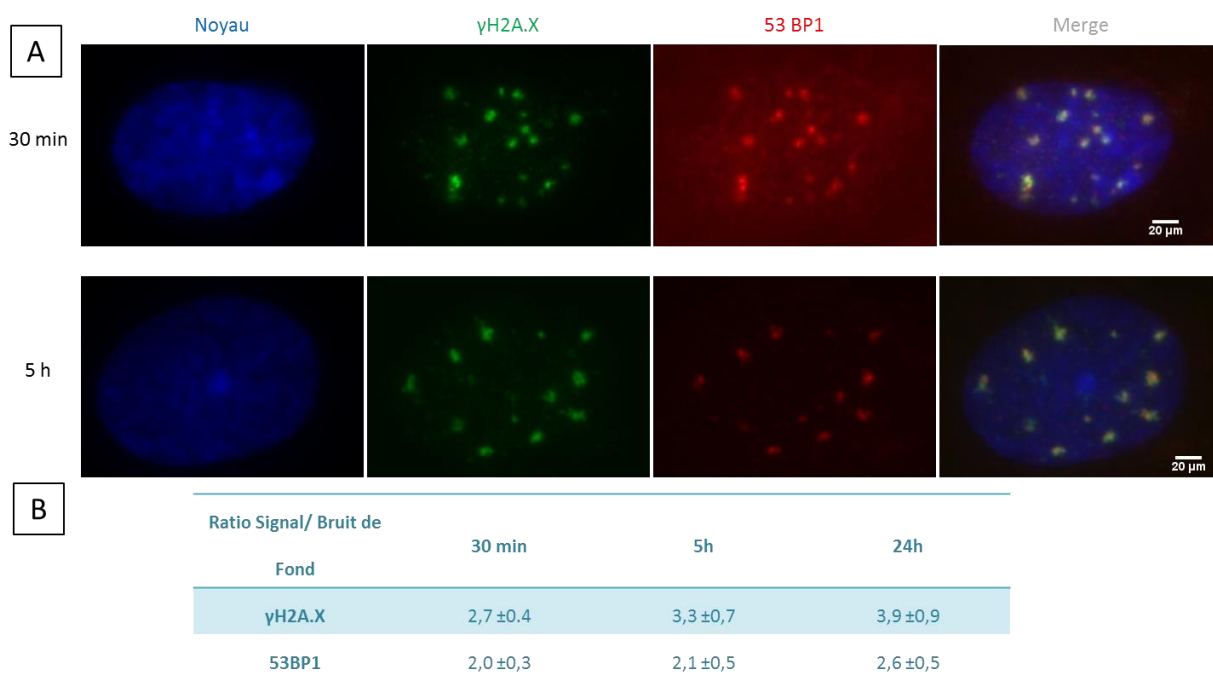


Figure 30: Illustration de la cinétique de relocalisation de la protéine 53BP1 dans le noyau. A) Images en microscopie à fluorescence de noyaux 30 min et 5 h après une exposition à 2 Gy et 5 Gy de rayonnement X. L'ADN est marqué en DAPI, et  $\gamma$ H2A.X et 53BP1 en Alexa Fluor 488 et 53BP1, respectivement. Trente minutes post-irradiation, la relocalisation n'est pas très nette, tandis que 5 h après irradiation, la relocalisation est quasiment complète. B) Moyenne du ratio de la signalisation des dommages sur le bruit de fond des noyaux en FITC et en Texas Red (moyenne  $\pm$  écart-type).

La qualité de la détection du dommage double brin de l'ADN par  $\gamma$ H2A.X a un meilleur rapport signal/bruit de fond immédiatement après l'exposition aux rayonnements ionisants puisque c'est une modification chimique qui a lieu sur l'histone H2A.X avec l'ajout d'un phosphate (Figure 30). La nature de ce marqueur de CDB ne consiste pas en une relocalisation d'une protéine diffuse dans le noyau, comme l'est 53BP1, ce qui est certainement à l'origine des différences observées.

$\gamma$ H2A.X nous permet d'observer de manière précise la signalisation des dommages double brin de l'ADN dès 30 min après l'irradiation. C'est sur cette base que nous avons opté

pour le marqueur  $\gamma$ H2A.X dans le reste de nos expérimentations.

## 2.2. Caractérisation des foyers $\gamma$ H2A.X

### 2.2.1. Quantification des foyers $\gamma$ H2A.X

Nous avons comparé la dynamique du nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X induits par des rayonnements X en fonction des spectres énergétiques. Comme expliqué précédemment, nous avons effectué les analyses sur des cellules dans le même état du cycle cellulaire. En effet, des cellules endothéliales humaines (HUVECs), synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, ont été exposées à 0,25, 0,5, 1, 2 et 5 Gy à des voltages de 40 kV, 220 kV et 4 MV de rayonnements X. Les foyers ont été étudiés 30 min, 5 h, 24 h, 48 h et 72 h après exposition. Le logiciel d'analyse d'images Scan<sup>^</sup>R associé à la plateforme de microscopie à fluorescence (Olympus) ont été utilisés pour effectuer la détection automatique des noyaux et des foyers (environ 4000 cellules par réplicats). L'analyse de milliers de noyaux a permis de pondérer leur représentativité au sein de la population totale des cellules exposées. Tous les résultats présentés ici concernent les cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

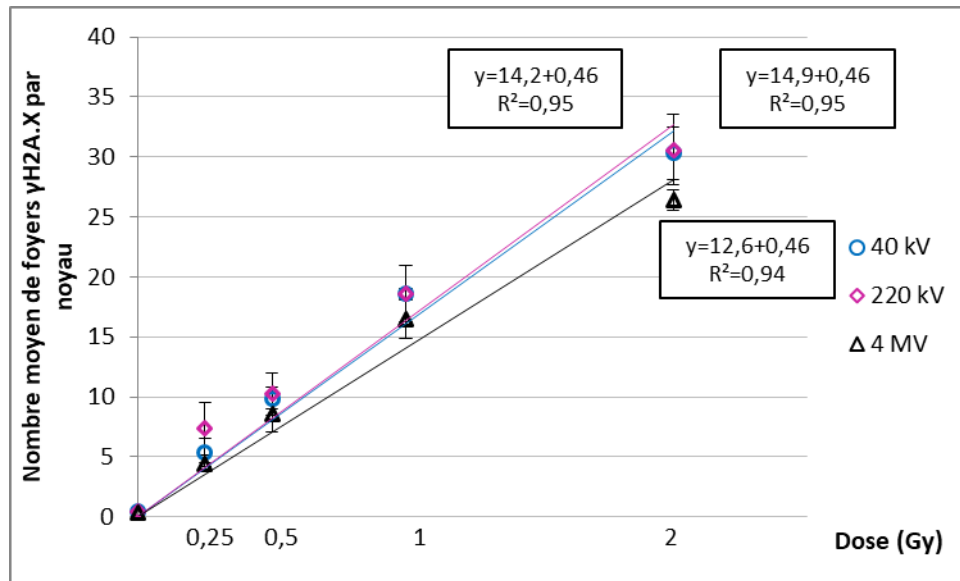


Figure 31: Courbe dose effet à 30 min post-irradiation du nombre moyen de foyers  $\gamma$ H2A.X mesurés dans les cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 en fonction de la tension des rayonnements ionisants. Les valeurs mesurées sont données pour 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges violets) et 4 MV (triangles noirs). Les nombres moyens de foyers co-localisés ont été évalués sur environ 4000 cellules pour chaque dose, et obtenus à partir d'au moins 3 expériences.

Pour les 3 voltages, 30 min après l'exposition, nous observons une relation linéaire du nombre de foyers avec la dose, ce qui est attendu pour les CDB (Rogakou et al., 1998). Sur la gamme de doses étudiées, les pentes sont significativement différentes entre 40 kV et 4 MV ( $p = 0,02$ ), avec un nombre de CDB par Gy de 14,2, 14,9 et 12,6, pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp (Figure 31). Après une analyse dose par dose, nous n'observons pas de différence statistiquement significative entre les différentes énergies de rayonnement X pour la gamme de doses entre 0,25 et 1 Gy en ce qui concerne le nombre moyen de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau 30 min après irradiation (T-test,  $p > 0,05$ ) (valeurs données dans le tableau de la Figure 31, moyenne  $\pm$  écart-type). Cependant, on constate un écart systématique entre 40 kV/220 kV et 4 MV. En effet, le taux de foyers  $\gamma$ H2A.X est plus faible à doses égales pour 4 MV.

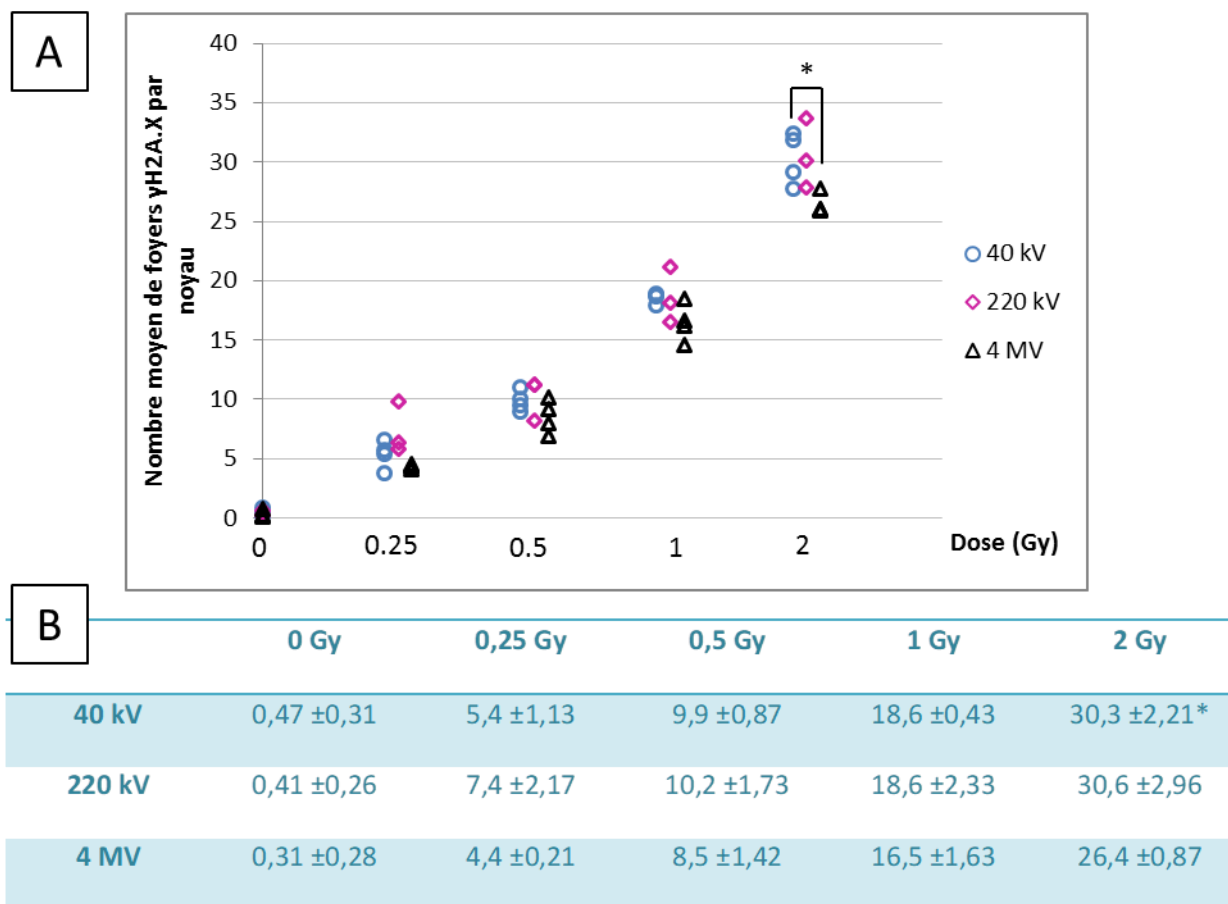


Figure 32: Nombre moyen de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, 30 min après une irradiation à 0,25, 0,5, 1 et 2 Gy. A) Les valeurs mesurées sont données pour des tensions de 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges roses) et 4 MV (triangles noirs). Les nombres moyens de foyers ont été obtenus après l'analyse d'images d'environ 4000 cellules pour chaque tension et au moins 3 expériences. B) Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type calculés à partir d'au moins 3 réplicats (environ 4000 cellules analysées par condition). Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules irradiées à 4 MVp sont indiquées comme suit : \*  $\alpha < 0,05$ , \*\*.

Cependant, à 2 Gy, la tendance devient significative entre 40 kV et 4 MV avec en moyenne,  $30,3 \pm 2,21$  et  $26,42 \pm 0,87$  foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau pour les tensions de 40 kV et 4 MV, respectivement (T-test,  $p = 0,03$ ) (Figure 32).

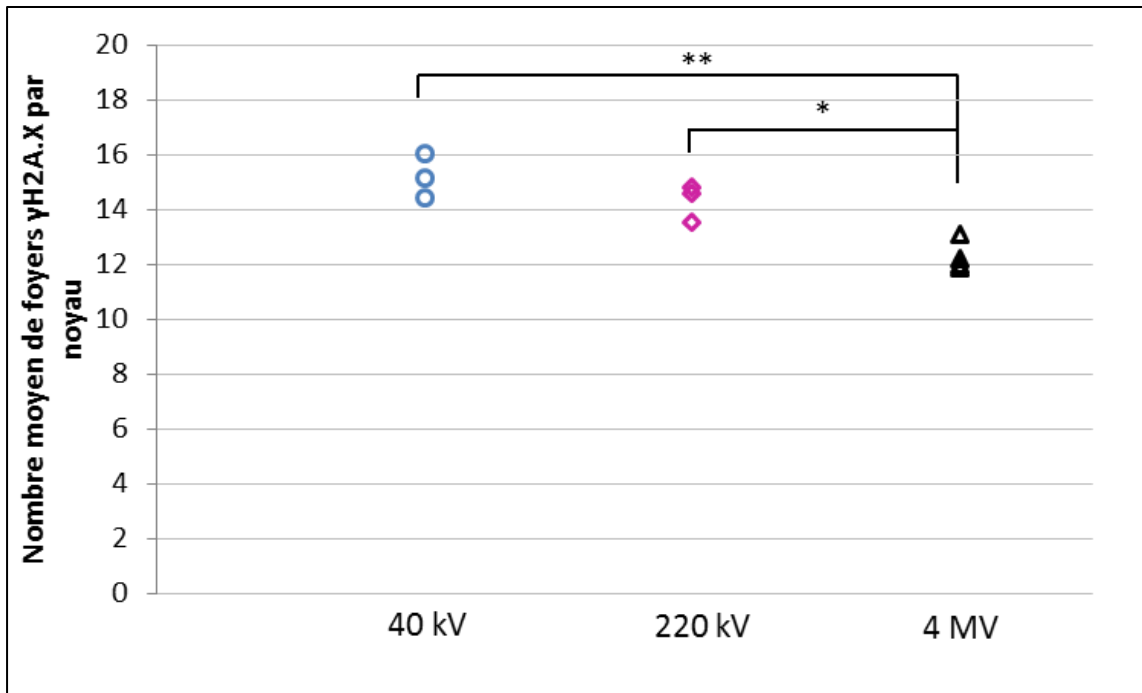


Figure 33: Nombre moyen de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, 5 h après une irradiation à 5 Gy. Les valeurs mesurées sont données pour des tensions de 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges roses) et 4 MV (triangles noirs). Les nombres moyens de foyers ont été obtenus après l'analyse d'images d'environ 4600 cellules pour chaque tension et au moins 3 expériences. Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules irradiées à 4 MVp sont indiquées comme suit : \*  $\alpha < 0,05$  et \*\*  $\alpha < 0,01$ .

Lorsque nous étudions le temps 5h, à une dose de 5 Gy, la différence se confirme et devient significative également entre 220 kV et 4 MV. Ainsi, 5 h post-irradiation, nous avons observé, en moyenne,  $15.2 \pm 0.80$ ,  $14.3 \pm 0.67$  et  $12.2 \pm 0.54$  foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  par noyau respectivement (moyenne  $\pm$ SE, avec au moins 3 réplicats par condition) (Figure 33).

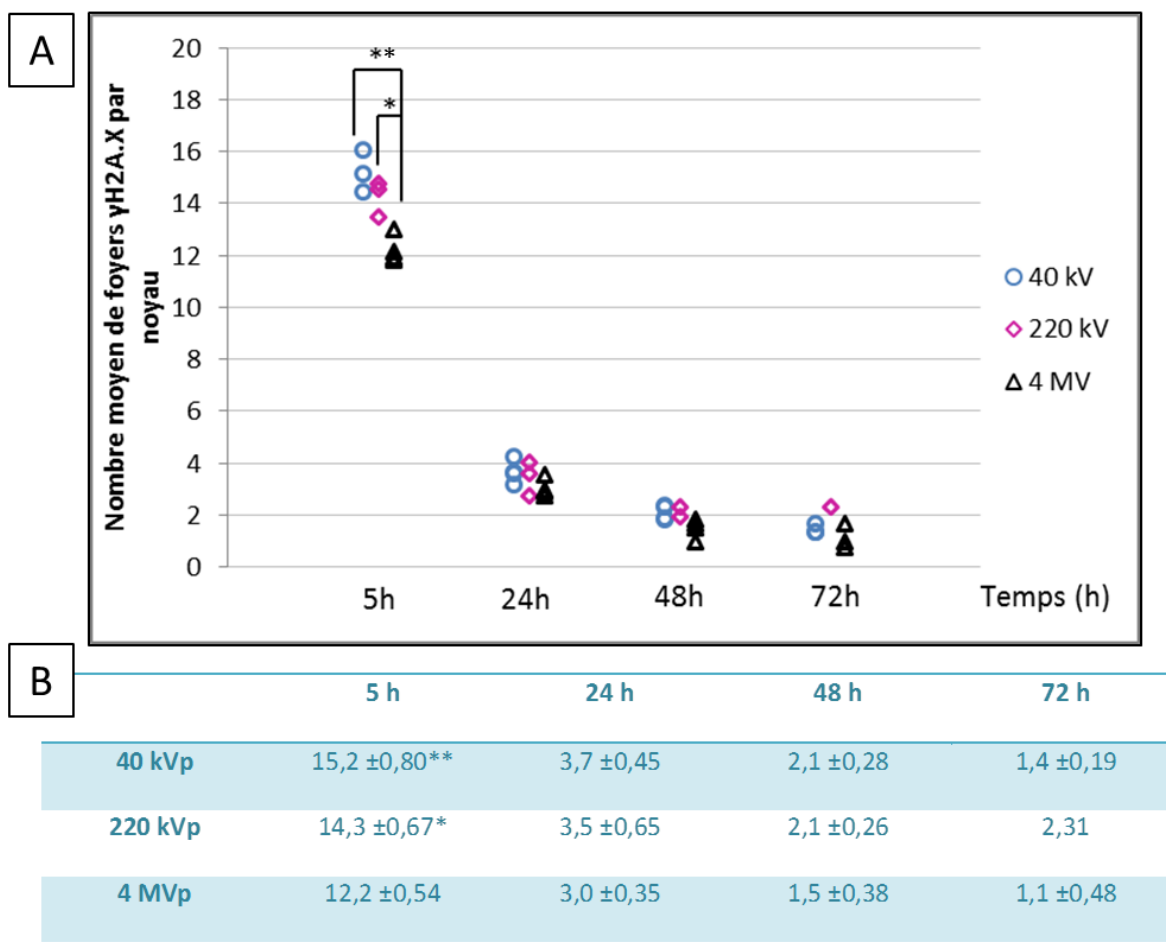


Figure 34: A) Nombre moyen de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau, mesuré dans des cellules primaires humaines synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, en fonction de la qualité du rayonnement X, de 5 h à 72 h après une irradiation à 5 Gy. Les valeurs mesurées sont données pour des tensions de 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges roses) et 4 MV (triangles noirs). Les nombres moyens de foyers ont été obtenus après l'analyse d'images d'environ 3500 cellules pour chaque tension et au moins 3 expériences. Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules irradiées à 4 MVp sont indiquées comme suit : \*  $\alpha < 0,05$ , \*\*  $\alpha < 0,01$  et \*\*\*  $\alpha < 0,001$ . B) Nombre moyen de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau en fonction du temps, de 5h à 72h post-irradiation, et de la tension utilisée, 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type calculés. Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules irradiées à 4 MVp sont indiquées comme suit : \*  $\alpha < 0,05$ , \*\*  $\alpha < 0,01$  et \*\*\*  $\alpha < 0,001$ .

A partir de 24 h, il n'y a plus de différence significative bien que les valeurs moyennes de 4 MVp restent toujours plus basses que celles mesurées pour 40 kV et 220 kV (Figure 34).

Afin d'étudier la cinétique de résorption des foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau entre les différentes voltages, nous avons étudié, entre 5 h et 24 h post-irradiation, le pourcentage de

décroissance du nombre moyen de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  par noyau en fonction du voltage de rayonnements X. Pour des tensions de 40 kV, 220 kV et 4 MV, le pourcentage de décroissance est de  $74,6 \pm 2.72$ ,  $80,1 \pm 4.14$  et  $76,8 \pm 2.17$  respectivement (Figure 34). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les 3 qualités de rayonnements X de 24 h à 72 h post-irradiation (T-test,  $p > 0.05$ ) pour ce paramètre.

### 2.2.2. Mesure de l'aire des foyers $\gamma\text{H2A.X}$

L'absence de différence dans le taux de décroissance des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  peut être interprété comme une relative similarité entre les rayonnements X étudiés, en ce qui concerne la qualité des dommages. Pour approfondir ce point, après avoir obtenu des différences dans le nombre moyen de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  à 30 min et 5h, nous avons étudié l'aire des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  après irradiation. Ce paramètre pourrait être un indicateur de la qualité du dommage. Après exposition à 40 kV, 220 kV et 4 MV, l'aire moyenne des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  était comprise entre  $0.3 \mu\text{m}^2$  et  $0.4 \mu\text{m}^2$  (Tableau 7).

|              | 40 kV          | 220 kV         | 4 MV           |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 2 Gy, 30 min | $0.4 \pm 0.11$ | $0.3 \pm 0.01$ | $0.4 \pm 0.04$ |
| 5 Gy, 5 h    | $0.4 \pm 0.03$ | $0.4 \pm 0.02$ | $0.4 \pm 0.03$ |

Tableau 7: Aire moyenne des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$ , en  $\mu\text{m}^2 \pm$  écart-type, mesurée dans des cellules HUVEC en phase G0/G1 du cycle cellulaire en fonction de la dose (2 Gy et 5 Gy) et de la tension utilisée (40 kV, 220 kV et 4 MV), 30 min et 5 h après irradiation. Les aires moyennes des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  ont été évaluées à l'aide d'un logiciel d'analyses d'images sur environ 4000 cellules pour chaque dose et chaque énergie de rayonnements X correspondant à au moins 3 réplicats. La significativité des valeurs a été testée en utilisant le test de Student.

De manière cohérente avec les taux de décroissance, nous n'avons pas observé de différence significative entre les 3 tensions de rayonnements X en ce qui concerne l'aire moyenne des foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  après exposition ( $p > 0,05$ ).

### 2.2.3. Distribution spatiale des CDB au sein d'un noyau

Pour continuer dans la caractérisation de potentielles relations entre le dépôt d'énergie



et la distribution des dommages cellulaires initiaux induits au sein d'un noyau, la distribution spatiale des foyers  $\gamma$ H2A.X a été abordée à travers l'analyse des distances entre les foyers  $\gamma$ H2A.X d'un noyau. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la distance du plus proche voisin de chacun des foyers d'un noyau. Dans un premier temps, nous avons étudié ce paramètre à l'échelle de la population cellulaire, en la segmentant en fonction du nombre de foyers détectés par noyau. Pour chacune des sous populations de noyaux présentant le même nombre de foyers, nous avons considéré pour chacun des foyers d'un noyau, la distance de son plus proche voisin. Puis, pour chaque noyau, nous avons :

- Soit calculé la moyenne de ces distances.
- Soit retenu la distance la plus faible.

Pour chacune de ces 2 valeurs, nous avons enfin calculé une moyenne sur l'ensemble des noyaux appartenant à la même sous population.

#### 2.2.3.1. Distance moyenne du plus proche voisin

Plus la moyenne des distances du plus proche voisin des foyers d'un noyau est importante, plus les foyers de ce noyau seront loins, les uns des autres (panel A, Figure 35). A l'inverse, si la valeur des moyennes des distances est petite, les foyers seront regroupés dans le noyau, a minima 2 par 2 (panel B, Figure 35).

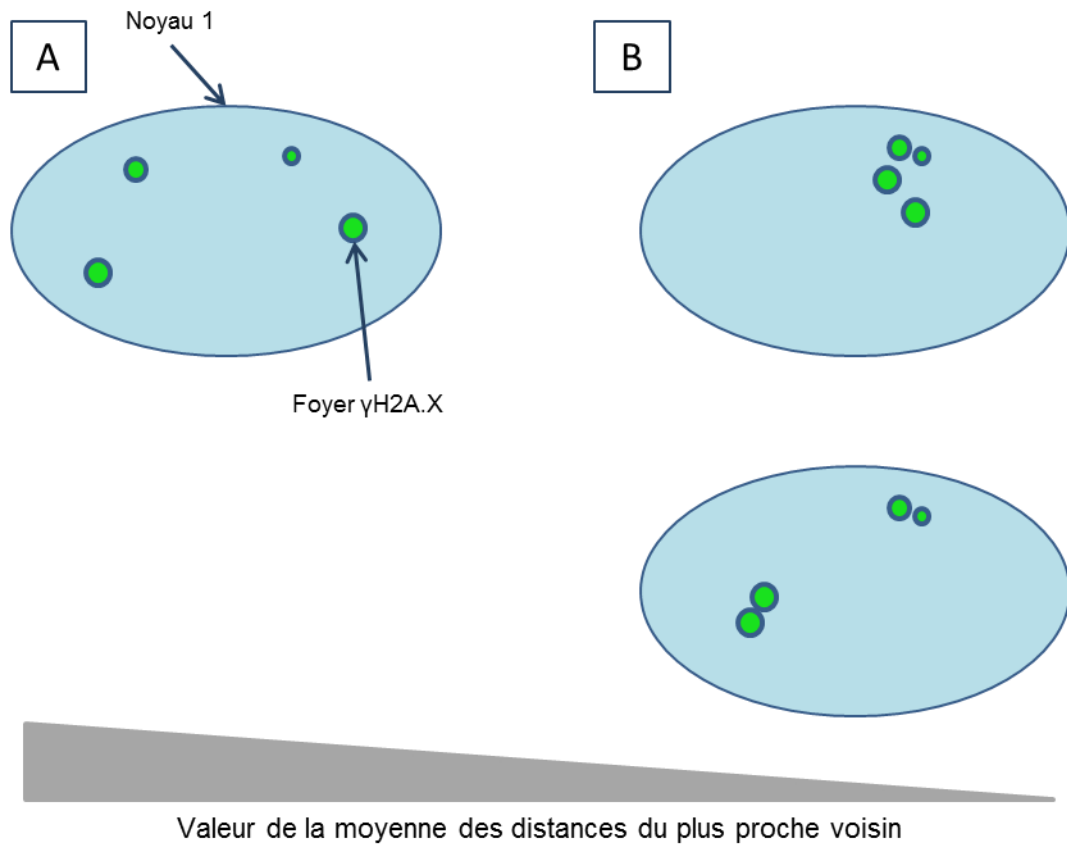


Figure 35: Schémas illustrant les valeurs obtenues de la moyenne des distances du plus proche voisin pour un noyau donné. A) illustre le fait que la valeur de la moyenne du plus proche voisin par noyau est grande. B) illustre le fait que la valeur de la moyenne du plus proche voisin par noyau est petite.

Cette analyse a été réalisée pour l'ensemble des conditions étudiées dans ce travail de thèse (0.25, 0.5, 1 et 2 Gy, à 30 min, et 5 Gy à 5h, 24h, 48h et 72h). Seules les conditions 2 Gy, 30 min et 5 Gy, 5 h sont représentées (Figure 36), les autres étant consultables en annexes de cette thèse (annexe 2). Pour la condition 2 Gy, 30 min (Figure 36, panel A), la distance moyenne pour la catégorie de noyaux ayant 13 foyers est  $1,8 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ,  $2,0 \pm 0,08 \mu\text{m}$  et  $1,6 \pm 0,17 \mu\text{m}$ . Pour la catégorie de noyaux ayant 45 foyers est  $1,1 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ,  $1,1 \pm 0,05 \mu\text{m}$  et  $1,1 \pm 0,02 \mu\text{m}$  pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp, respectivement. Pour la condition 5 Gy, 5 h (Figure 36, panel B), la distance moyenne pour la catégorie de noyaux ayant 6 foyers est de  $2,9 \pm 0,39 \mu\text{m}$ ,  $2,8 \pm 0,15 \mu\text{m}$  et  $2,9 \pm 0,12 \mu\text{m}$  et pour la catégorie de noyaux ayant 27 foyers est de  $1,45 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ,  $1,41 \pm 0,06 \mu\text{m}$  et  $1,53 \pm 0,05 \mu\text{m}$ , pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp,

respectivement.

Aucune différence significative n'a pu être observée concernant l'analyse de la distribution spatiale des foyers en utilisant le calcul de la moyenne par noyau de la distance du plus proche voisin. Ce qui laisse supposer qu'aucune des énergies étudiées ne conduit à un regroupement d'une majorité de foyers générés dans le noyau (moyenne  $\pm$ écart-type, à partir d'au moins 3 expériences par condition, T-test,  $p > 0.05$ ).

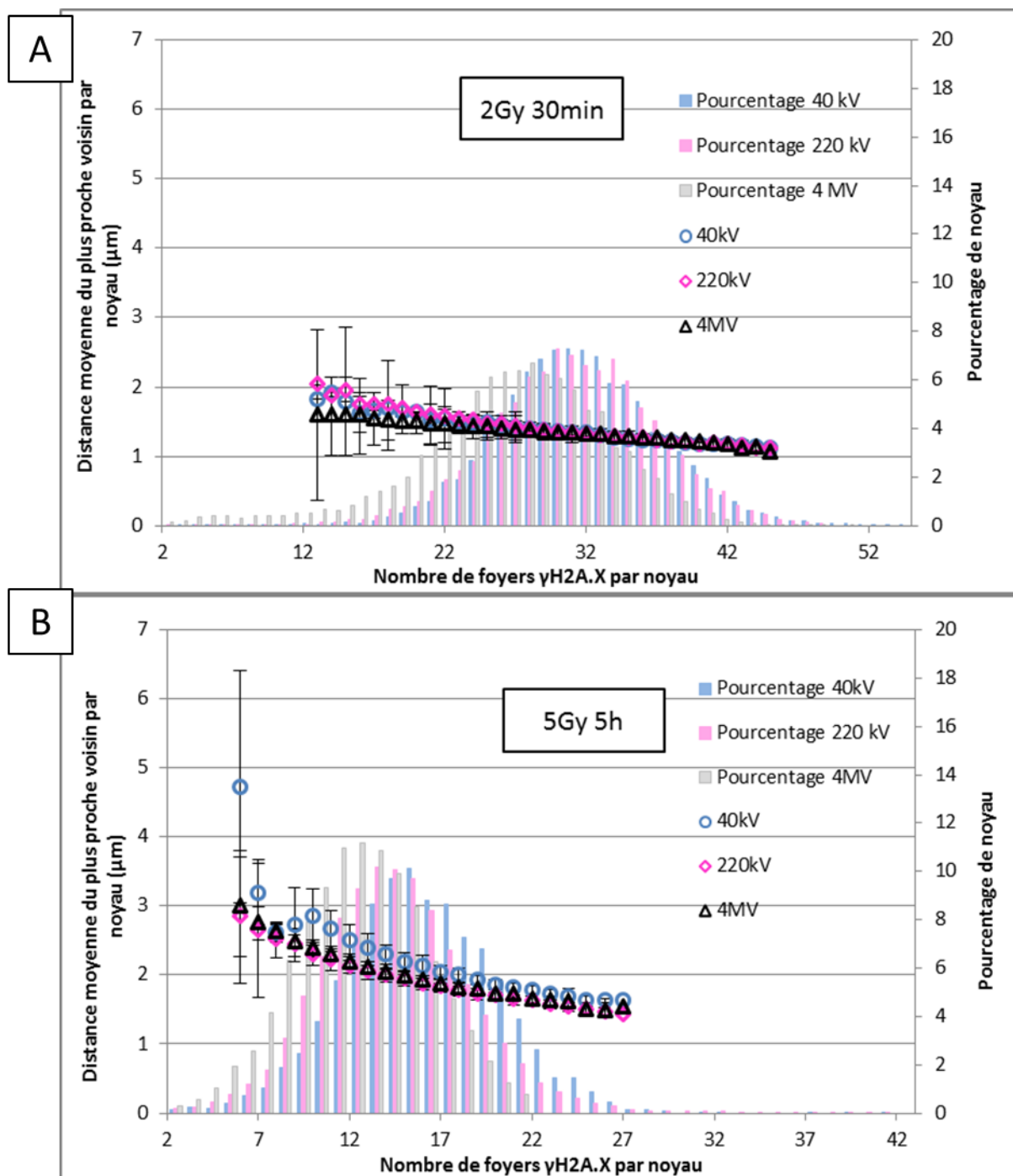


Figure 36: Distance du plus proche voisin en fonction du nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau, du pourcentage de noyau et des énergies des rayonnements X à des doses 2 Gy, 30 min post-irradiation (panel A) et 5 Gy, 5 h post-irradiation (panel B). Les valeurs mesurées ( $\pm$  écart-type) sont données pour 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges roses) et 4 MV (triangles noirs). Les pourcentages de noyau sont calculés sur environ 4400 cellules en G0/G1 exposées à 40 kV (histogrammes bleus), 220 kV (histogrammes roses) et 4 MV (histogrammes gris). Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 3 réplicats. Le T-test a été utilisé pour tester la significativité.

### 2.2.3.2. Distance minimum du plus proche voisin

Cette valeur reflète la proximité maximale qui peut exister parmi les foyers d'un noyau. En d'autres termes, lorsque cette valeur est faible, cela indique la présence au sein d'un noyau d'au moins 2 foyers regroupés (panel B, Figure 37).

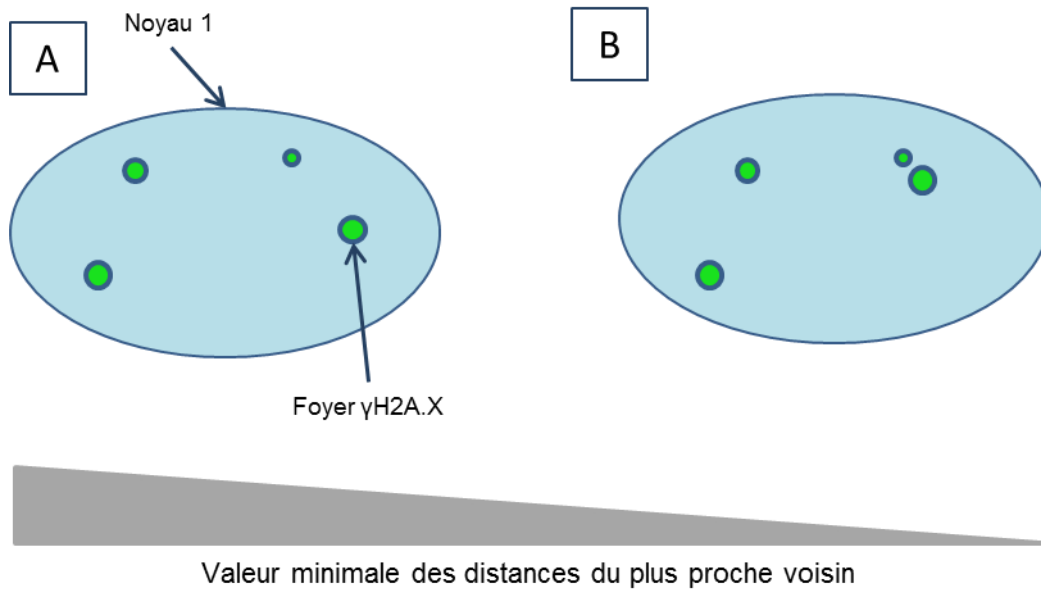


Figure 37: Schémas illustrant les valeurs obtenues de la distance minimum par noyau du plus proche voisin. A) illustre le fait que la valeur de la distance minimum par noyau est grande. B) illustre le fait que la valeur de la distance minimum par noyau est petite.

De la même manière que pour la distance moyenne des plus proches voisins, seuls les graphiques correspondants à la dose de 2 Gy 30 min post-irradiation (Figure 38, panel A) et 5 Gy 5 h post-irradiation (Figure 38, panel B) sont présentés, les autres conditions se trouvent en annexe de cette thèse (Annexe 2). Pour la condition 2 Gy, 30 min, la distance minimum du plus proche voisin pour la catégorie de noyaux ayant 13 foyers (la plus petite catégorie commune aux 3 conditions d'irradiation) est  $0,9 \pm 0,21 \mu\text{m}$ ,  $1,0 \pm 0,07 \mu\text{m}$  et  $0,9 \pm 0,07 \mu\text{m}$  et pour la catégorie de noyaux ayant 45 foyers (la plus grande catégorie) est  $0,5 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ,  $0,5 \pm 0,01 \mu\text{m}$  et  $0,5 \pm 0,06 \mu\text{m}$  pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp, respectivement. Pour la condition 5 Gy, 5 h, la distance minimum du plus proche voisin pour la catégorie de noyaux ayant 6 foyers est de  $1,6 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ,  $1,8 \pm 0,08 \mu\text{m}$  et  $2,0 \pm 0,10 \mu\text{m}$  et pour la catégorie de

noyaux ayant 27 foyers est de  $0,7 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ,  $0,6 \pm 0,01 \mu\text{m}$  et  $0,7 \pm 0,06 \mu\text{m}$ , pour 40 kVp, 220 kVp et 4 MVp, respectivement.

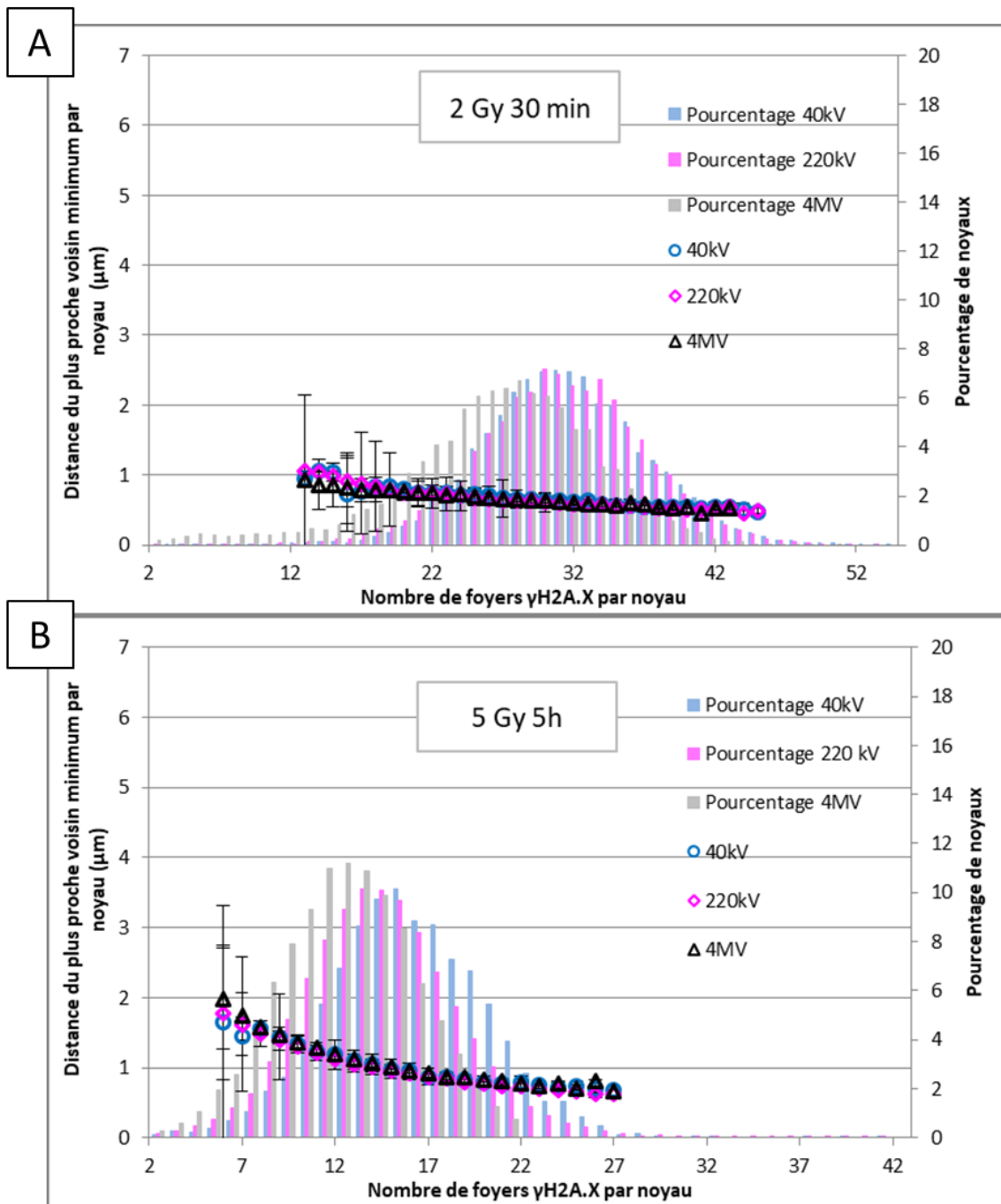


Figure 38: Minimum des distances du plus proche voisin en fonction du nombre de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  par noyau, et suivant l'énergie des rayonnements X utilisée à des doses 2 Gy, 30 min post-irradiation et 5 Gy, 5 h post-irradiation. Les valeurs mesurées ( $\pm$  écart-type) sont données pour 40 kV (ronds bleus), 220 kV (losanges roses) et 4 MV (triangles noirs). Les pourcentages de noyaux sont calculés sur environ 4400 cellules en G0/G1 exposées à 40 kV (histogrammes bleus), 220 kV (histogrammes roses) et 4 MV (histogrammes gris). Les valeurs ont été obtenues à partir d'au moins 3 réplicats. Le T-test a été utilisé pour tester la significativité.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans ce cas également. Ceci sous-entend que l'énergie des rayonnements X étudiée ne semble pas susceptible de faire varier la probabilité d'observer au moins un regroupement de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$ .

#### 2.2.3.3. Distribution de la distance moyenne et minimale des foyers pour une catégorie de noyaux donnée

L'étude réalisée sur l'ensemble de la sous population de noyaux, basée sur une moyenne de ces valeurs, ne permet peut être pas de mettre en évidence des différences de distribution spatiale des dommages signalisés par  $\gamma\text{H2A.X}$  à l'échelle du noyau. De ce fait, nous nous sommes ensuite intéressés directement à la distribution des distances du plus proche voisin à l'échelle de chaque foyer, en nous focalisant sur la population de noyaux présentant le taux de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  le plus représentatif d'une dose donnée. Pour la dose de 2 Gy (Figure 39, panel A) et de 5 Gy (Figure 39, panel B), les catégories de noyaux ayant 29 foyers et 14 foyers sont les plus représentatives de ces 2 doses, respectivement.

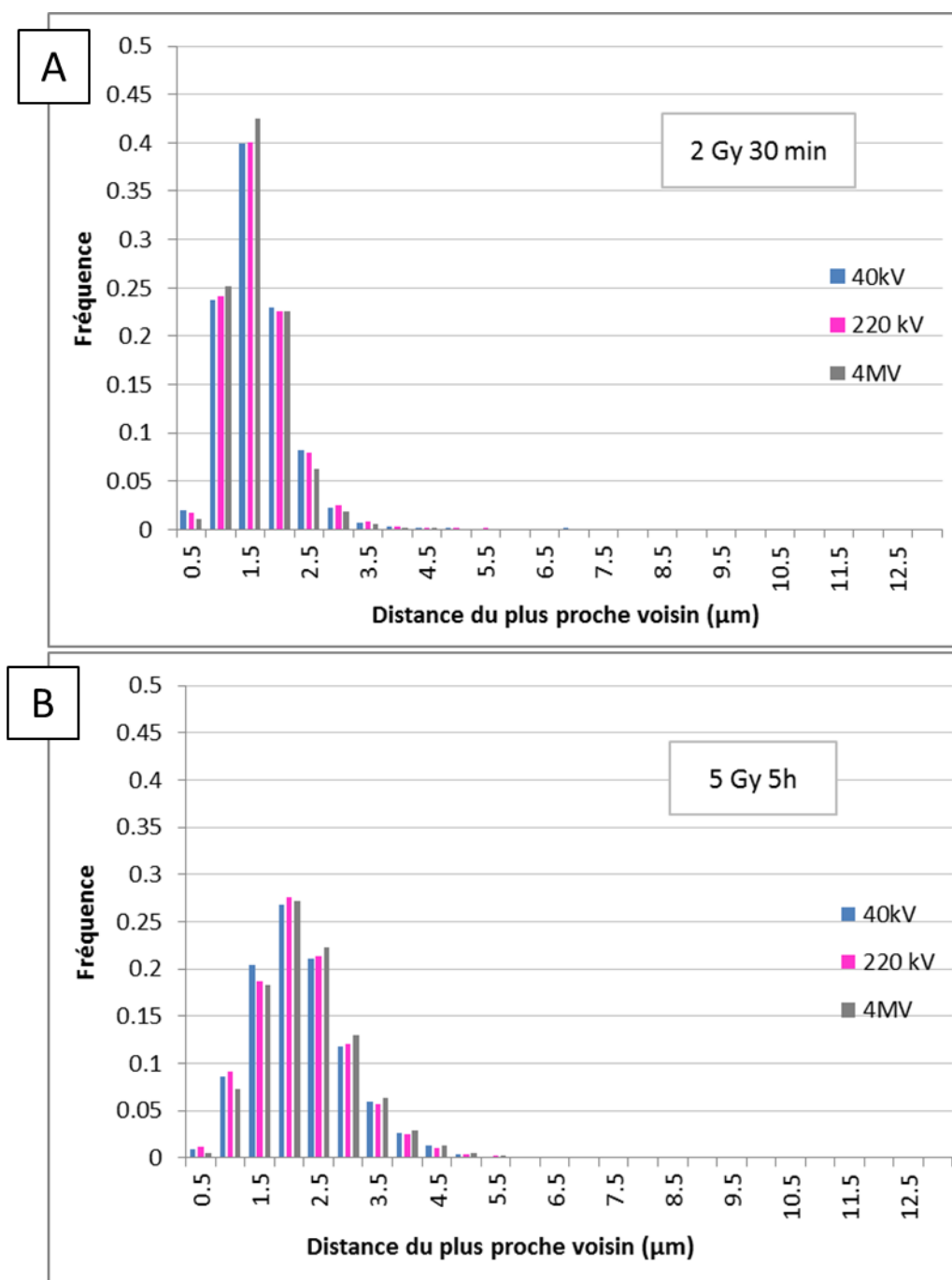


Figure 39: Distribution des distances du plus proche voisin ( $\mu\text{m}$ ) sur la population de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  appartenant aux noyaux comportant 29 foyers (panel A) pour les conditions 2 Gy 30 min post-irradiation et 14 foyers (panel B) pour les conditions 5 Gy 5 h post-irradiation à 40 kV (histogrammes bleus), 220 kV (histogrammes roses) et 4 MV (histogrammes noirs). Les fréquences sont calculées sur environ 20 000 foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  contenus dans des cellules en G0/G1.

Pour la condition 2 Gy, 30 min, la distance minimum du plus proche voisin pour la catégorie de noyaux ayant 29 foyers (la plus petite catégorie) est comprise entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 5,5



$\mu\text{m}$  pour tous les voltages. Pour la condition 5 Gy, 5h, la distance minimum du plus proche voisin pour la catégorie de noyaux ayant 14 foyers est comprise entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 8,5  $\mu\text{m}$  pour tous les voltages utilisés. Aucune différence n'a pu être mise en évidence pour l'ensemble de ces distributions. Aucune sous population de foyers ne présentant un profil spécifique en terme de distance de son plus proche voisin en fonction de la qualité du rayonnement X utilisé n'a pu être observée.

### 3. Devenir cellulaire

Après avoir mis en évidence une différence du nombre de CDB quantifiable, nous nous sommes intéressés à savoir si cette différence pouvait avoir un impact sur la survie cellulaire et notamment la capacité à se diviser. Pour étudier les potentiels effets différentiels des spectres des rayonnements sur la division cellulaires, nous nous sommes concentrés sur les 2 spectres énergétiques les plus différents, à savoir 40 kV et 4 MV. Pour identifier les cellules qui sont capables de faire un cycle cellulaire complet après irradiation, de l'imagerie *in vivo* en contraste de phase a été utilisée. Un évènement de division s'observe lorsqu'une cellule adhérente se décolle légèrement pour former 2 cellules filles, qui ré-adhèrent par la suite (Figure 40, panel A). Un évènement de « mort cellulaire » s'observe par la perte définitive d'adhérence d'une cellule (Figure 40, panel B). La fréquence de division est le nombre d'évènements de « division cellulaire » observé pour une unité de temps donnée, divisé par le nombre de cellules initiales du tapis cellulaire observé (la même analyse a été réalisée pour les évènements de « mort cellulaire »).

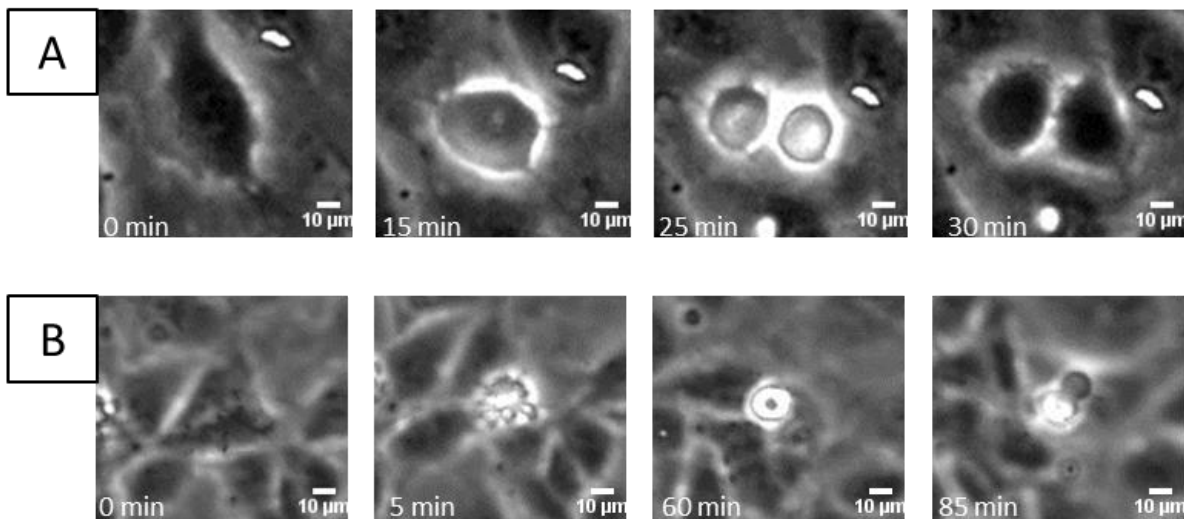


Figure 40: Images représentatives d'un évènement de « division cellulaire » (panel A) et de « mort cellulaire » (panel B) chez les cellules primaires HUVEC, à des temps allant de 0 à 30 min pour la division et de 0 à 85 min pour la mortalité.

La Figure 41 montre les fréquences de division des cellules non-irradiées et irradiées à

5 Gy, cumulées par intervalle de 6 heures et pendant les 96 heures qui suivent l'exposition. Pour la condition contrôle, les premiers événements de division cellulaire sont observés à partir de 18 h post-irradiation, et semble être retardés de 6 h pour les cellules irradiées, quelle que soit l'énergie des rayonnements X. Pour les cellules irradiées à 5 Gy, plus de la moitié des cellules initiales réalisent une division cellulaire dans les 42 h suivant l'exposition. Aucune différence significative n'a été observée entre 40 kV et 4 MV, 42 h post-irradiation ( $34.2 \pm 24.2\%$  et  $40.9 \pm 7.7\%$ , respectivement, T-test,  $p > 0.05$ ). Les résultats sont issus de 4 réplicats par condition.

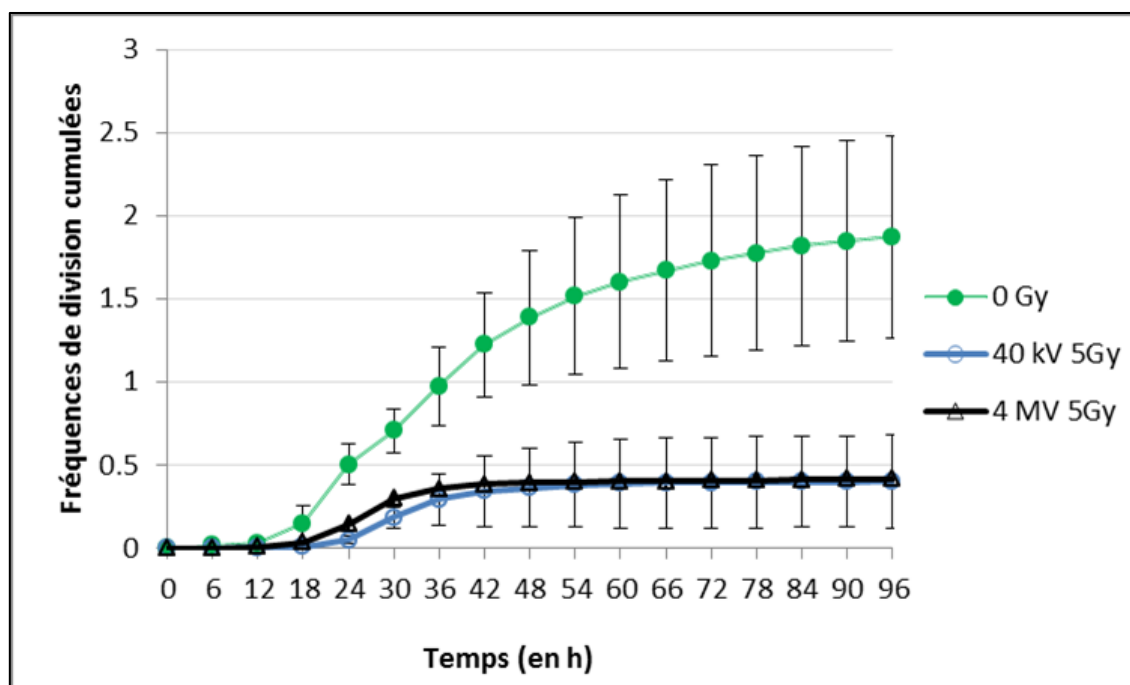


Figure 41: Fréquences de division cumulées ( $\pm$ écart-type) pour la condition contrôle et pour les conditions irradiées à 5 Gy à 40 kV et 4 MV. Les résultats ont été obtenus en moyennant les données de 8 expériences pour les conditions contrôles (courbe verte) et 4 expériences pour les conditions irradiées (courbe bleue pour 40 kV et courbe noire pour 4 MV), et correspondent à l'analyse des événements de division cumulés à chaque 6 heures, pendant 96h après l'ensemencement.

Parallèlement à la vidéomicroscopie, des Western Blot ont été réalisés afin de suivre au cours du temps, et après irradiation, l'expression ou l'activation de certaines protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, suite à un stress génotoxique (Figure 42,

panel B). Les protéines étudiées sont ATM phosphorylée sur la Ser 1981, Chk2 phosphorylée sur la Thr 68 et P21. ATM est en amont de la voie de signalisation des dommages de l'ADN, et phosphoryle Chk2. L'expression de P21 est induite indirectement par ATM, et participe au blocage du cycle cellulaire.

La phosphorylation de la Ser 1981 d'ATM est observée à 5 h puis décroît régulièrement jusqu'à retourner au niveau presque basal, 48 h post exposition, et ceci, indépendamment de l'énergie de rayonnements X étudiée. On peut remarquer que cette phosphorylation d'ATM reste élevée entre 18 et 24 h, malgré la reprise de cycle constatée au sein des populations cellulaires irradiées. Ceci pourrait être le reflet d'une reprise de cycle ne concernant, à un instant donné, qu'une faible proportion de cellules au sein de la population (< 15% de divisions observées sur des périodes de 6h). La phosphorylation de la Thr 68 de Chk2 ne s'observe qu'à partir de 18h et s'amplifie légèrement à 24h. Elle semble être le reflet de l'activation du point de contrôle G1/S, dans les cellules présentant encore une activation d'ATM au moment où elles seraient susceptibles d'être en phase S, après leurs sorties de quiescence. D'ailleurs, la sortie de quiescence s'observe clairement à travers l'expression de CDKN1A/P21 dans les cellules non irradiées. Ainsi, on mesure une forte diminution de l'expression de CDKN1A dans cette condition entre 5 h et 24 h. L'expression augmente à 48h, temps auquel on observe clairement une diminution de l'activité de division. En revanche, dans les 2 conditions irradiées, on observe un niveau d'expression élevé de CDKN1A/P21 sur l'ensemble des temps étudiés. De la même manière que pour la phosphorylation d'ATM, la proportion de cellules capables de se diviser à un instant T reste minoritaire à l'échelle de la population, même si, à terme, près de 40 % de cette population réalisera une division.

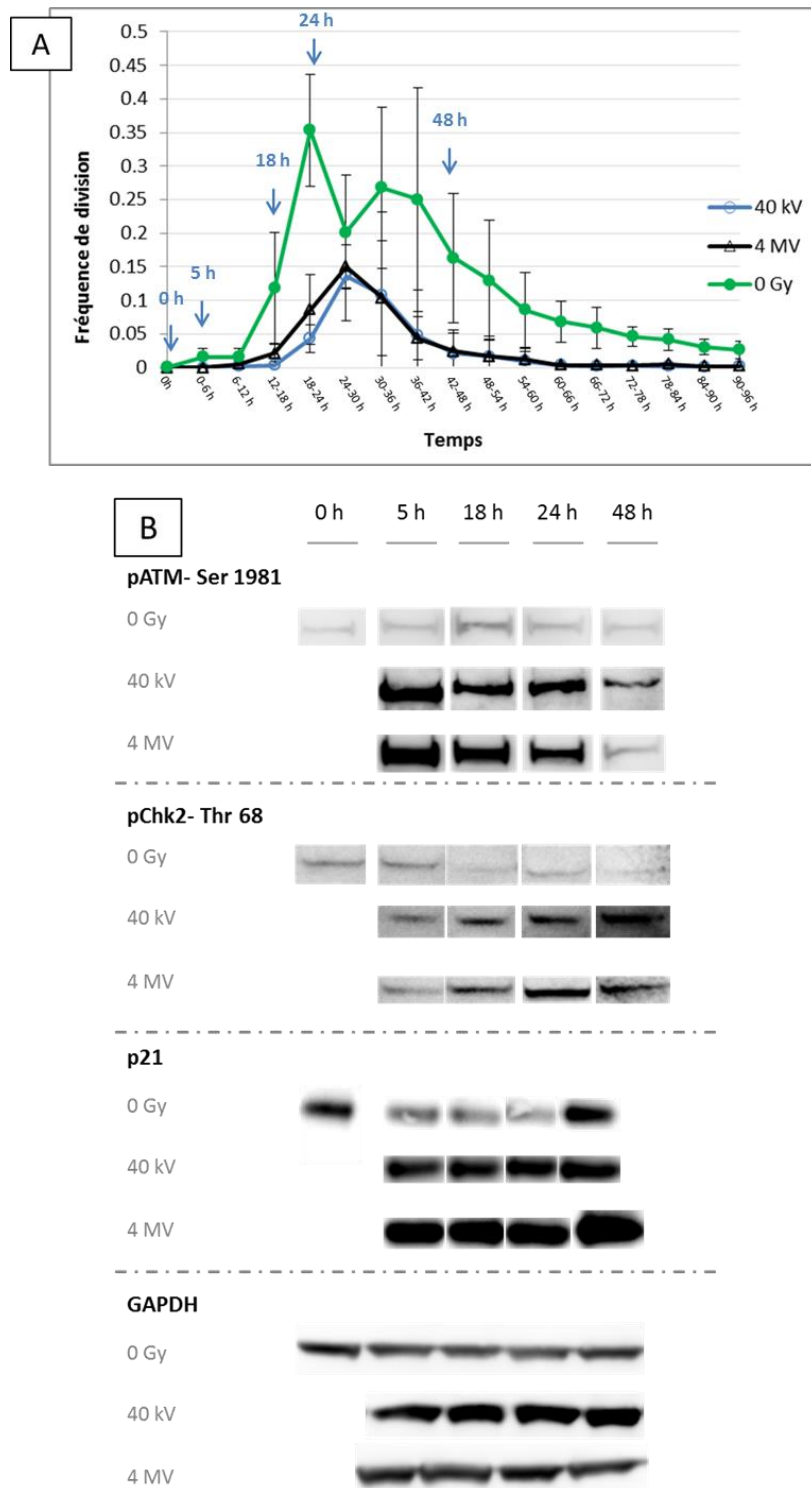


Figure 42: Fréquences de division, par pas de temps de 6 h, jusqu'à 96 h post-ensemencement. A) Les résultats ont été obtenus en moyennant les données de 8 expériences ( $\pm$ écart-type) pour les conditions contrôles (courbe verte) et 4 expériences pour les conditions irradiées (courbe bleue pour 40 kV et courbe noire pour 4 MV) après 5 Gy d'irradiation et correspondent à l'analyse des événements de division. B) Western Blot représentatifs d'une sélection de protéines de régulation du cycle cellulaire, à savoir ATM phosphorylé, Chk2 phosphorylé et P21, pour les conditions contrôles et pour les conditions irradiées à 5 Gy, et à des tensions de 40 kVp et 4 MVp après 5 Gy d'irradiation. La GAPDH a été utilisée comme protéine de contrôle de charge. Les expérimentations ont été réalisées 4 fois par condition.

La Figure 43 reporte la fréquence de mortalité pour la condition non-irradiée (panel A) ainsi que pour les conditions irradiées à 5 Gy (panel B). Nous constatons, dans nos conditions expérimentales, dès 36h, une augmentation significative de la mortalité même dans la condition non irradiée. Cette mortalité est certainement due à l'absence de renouvellement du milieu de culture pendant la durée de l'expérience. L'irradiation induit tout de même une augmentation de la mortalité même si elle reste non significative.

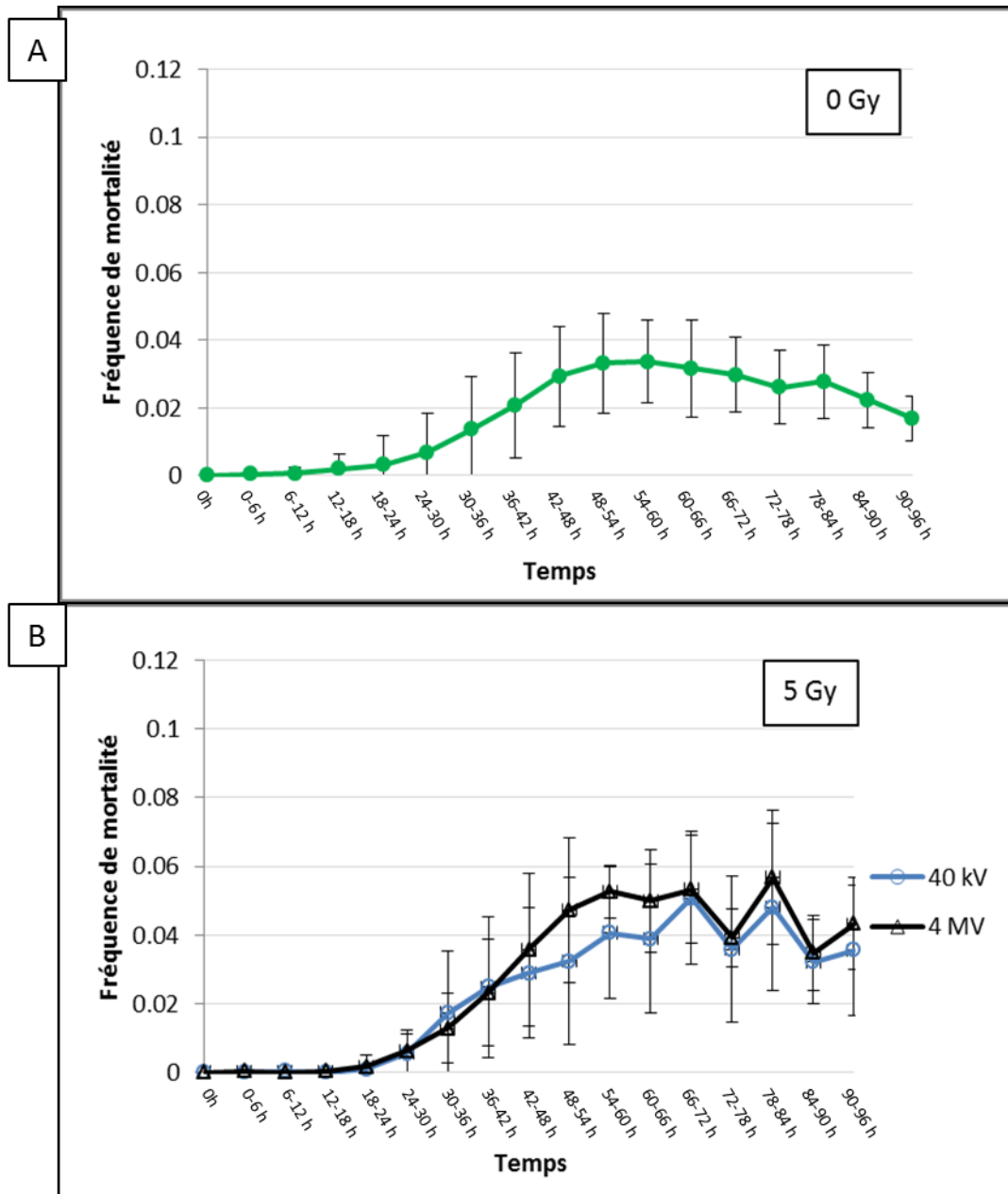


Figure 43: Fréquence mortalité, par pas de temps de 6 h, jusqu'à 96 h post-ensemencement, mesurée sur des cellules HUVEC. A) Les résultats ont été obtenus en moyennant les données de 8 expériences ( $\pm$ écart-type) pour les conditions contrôles et B) 4 expériences pour les conditions irradiées (courbe bleue pour 40 kV et courbe noire pour 4 MV) après une dose de 5 Gy d'irradiation.

## 4. Anomalies de ségrégation mitotique

Précédemment, nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X à 5h à 40 kVp et 220 kVp comparé à 4 MVp, ce qui suggère qu'il y aurait plus de CDB induits à 40 kVp et 220 kVp qu'à 4 MVp. S'il y a plus de CDB à 40 kVp et 220 kVp, il

y a donc une augmentation de la probabilité de former des aberrations chromosomiques à ces tensions comparé à 4 MVp. La façon indirecte que nous avons utilisée afin d'observer des aberrations chromosomiques a été de quantifier le nombre d'anomalies de ségrégation mitotique, comme les cellules binucléées, les micronoyaux ou encore les ponts cytosoliques qui sont des conséquences de la présence d'aberrations chromosomiques, de types dicentriques, anneaux centrique. La synchronisation des cellules au moment de l'exposition et leur capacité à se diviser, dans les mêmes proportions pour les deux qualités de rayonnement, ont permis la mesure comparative des événements d'anomalies de ségrégation, observables 48 h après irradiation. Cette analyse a été réalisée sur les mêmes lames que celles utilisées pour le dénombrement des foyers  $\gamma$ H2A.X et a permis de maintenir une continuité entre toutes les mesures biologiques. Parmi la population totale de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, 48h après l'exposition à 5Gy, la fréquence des micronoyaux et/ ou de ponts cytosoliques dans les cellules mono- et binucléées est de  $1.69 \pm 1.03\%$  pour la condition contrôle et de  $8.68 \pm 3.82\%$  et de  $11.78 \pm 4.40\%$  pour 40 kV et 4 MV respectivement (moyenne  $\pm$ écart-type). Les taux d'anomalie de ségrégation n'ont pas mis en évidence de différence significative entre 40 kV et 4 MV dans nos conditions expérimentales (Tableau 8).

| Qualité de rayonnement | Toutes les cellules |
|------------------------|---------------------|
| Contrôle               | 1.7 $\pm$ 1.03 %    |
| 40 kV                  | 8.7 $\pm$ 3.82%     |
| 4 MV                   | 11.8 $\pm$ 4.40%    |

*Tableau 8: Pourcentage du taux d'anomalies de ségrégation (présence de micro-noyaux et/ou ponts cytosoliques dans des cellules mono- et bi-nucléées) pour la condition contrôle, et les conditions irradiées à 5 Gy à 40 kV ou 4 MV, 48 h post-exposition. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type calculés à partir d'au moins 4 réplicats (environ 4100 cellules analysées par condition). La significativité a été testée à l'aide du test de Student.*

Lors du dénombrement des anomalies de ségrégation, nous avons observé la présence de foyers  $\gamma$ H2A.X au niveau des micronoyaux mais également des ponts cytosoliques, ce qui



confirme la complexité d'interpréter les analyses de foyers  $\gamma$ H2A.X après la reprise du cycle cellulaire.

---

## Partie 5 : Discussion et Perspectives

L'imagerie médicale et les traitements utilisant les rayonnements ionisants sont les principales sources d'exposition non naturelles des populations. Quel que soit le type d'examen, la dose délivrée aux organes du patient varie de quelques dixièmes de mGy à quelques dizaines de mGy, voire plus pour certaines pratiques d'imagerie, notamment en radiologie interventionnelle. Ces faibles doses vont s'accumuler tout au long de la vie d'un individu, certains patients pouvant être soumis à plusieurs dizaines d'examens au cours d'une même année. De manière générale, le vieillissement de la population et le développement de nouveaux protocoles conduisent à une augmentation de la dose moyenne/an/individu. Dans ce contexte, les risques liés à de telles expositions restent à identifier, à comprendre et à évaluer en prenant en compte l'importante diversité de natures et de modalités de ces expositions.

Parmi l'ensemble de ces pratiques d'imagerie médicale, certaines se distinguent par la nature des rayonnements ionisants utilisés. En effet, dans le cadre de la radiologie interventionnelle ou d'examens de type mammographie entre autres, un rayonnement X de faible énergie (<60 keV) est employé. En termes de radioprotection, il est actuellement assigné aux photons, quelle que soit leur énergie, le même facteur de pondération des rayonnements ( $w_R=1$ ) (ICRP, 1991). Cependant plusieurs études mettent en évidence une augmentation de l'efficacité biologique relative des photons lorsque leur énergie diminue (Brenner & Amols, 1989; Albrecht M Kellerer, 2002). Ces observations concernent principalement une augmentation de la fréquence d'aberration chromosomique (Beyreuther, Dörr, et al., 2009; Lehnert et al., 2008, 2006, Mestres et al., 2011, 2008; Sasaki et al., 1989; Slonina et al., 2003; Verhaegen & Vral, 1994) et une diminution de la survie clonogénique (Lehnert et al., 2008, 2006; Panteleeva et al., 2003). En théorie, ces différences d'efficacités biologiques pourraient avoir leur origine dans les différences topologiques, à l'échelle nanométrique, des dépôts d'énergie des rayons X en fonction de leur spectre énergétique. En effet, à mesure que l'énergie des photons décroît, la nature de leurs interactions avec la

matière vivante se modifie. En dessous d'une énergie de 50 keV, on observe une diminution de la probabilité d'interaction par effet Compton et une augmentation des interactions de type photoélectrique. Ce changement entraîne une modification du spectre énergétique des électrons secondaires, et donc potentiellement une modification de la qualité des dommages radio-induits résultants.

Cette question de l'effet biologique des rayonnements X sur l'ADN en fonction de leurs spectres énergétiques a été évoquée, il y a plusieurs décennies (Brenner & Amols, 1989; Albrecht M Kellerer, 2002; Lehnert et al., 2008, 2006), mais malgré les observations biologiques mentionnées ci-dessus (augmentation du taux d'aberrations chromosomiques, diminution de la survie clonogénique), le lien de causalité peine à être totalement démontré. L'une des raisons est la difficulté de développer à cette échelle des configurations d'irradiation adaptées à une comparaison biologique, du fait de la combinaison de fortes contraintes dosimétriques liées aux rayonnements X de faible énergie et de la nécessité de mener des expériences biologiques dans des conditions pertinentes et robustes. L'objectif de ce travail a été d'évaluer une différence possible d'effets sur une cible biologique, l'ADN, en s'assurant que la dose absorbée au niveau de cette cible était la même. En d'autres termes, il s'agissait de vérifier si les différences micro- et nanodosimétriques entre les rayonnements X de basse et de haute énergie suffisaient, à elles seules, à entraîner des dommages différents.

Les études comparatives existantes ont basé la quantification du différentiel sur un calcul d'Effet Biologique Relatif (EBR). Bien que cette notion repose sur une définition formelle, un ratio de dose nécessaire pour aboutir au même effet biologique pour 2 qualités de rayonnements ionisants distincts (cf partie 1, paragraphe 7.1 : Etudes épidémiologiques et radiobiologiques : bases de la radioprotection), un certain nombre de libertés est pris quant à son calcul dans les publications. La grande majorité d'entre elles s'appuie en effet, sur le calcul d'un ratio d'effets (et non de doses), notamment de paramètres de courbes dose-effet

obtenues pour chacune des qualités de rayonnements étudiées. Par ailleurs, la valeur de ce ratio dépend non seulement du rayonnement que l'on souhaite tester, mais également du rayonnement que l'on définit comme « de référence ». On peut ainsi constater que, dans la littérature, ce rayonnement de référence peut être très variable d'une étude à l'autre : d'un rayonnement X de 120 kVp, en passant par du 200 kVp et jusqu'au  $^{60}\text{Co}$  (cf partie 1, paragraphe 7.2 : Etudes radiobiologiques comparatives des rayonnements X). Le présent travail démontre toute la relativité de l'analyse et l'interprétation d'un effet différentiel uniquement sous l'angle de ce calcul d'EBR. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, le calcul d'EBR pour 40 kV basé sur la comparaison des pentes d'effet-dose en termes de nombre de foyers  $\gamma\text{H2A.X}$  observés à 30 minutes, aurait conduit à une valeur de 0,95 avec comme rayonnement de référence de 220 kVp et de 1,10 avec le rayonnement de 4 MVp. C'est pour ces raisons que nous n'avons pas souhaité interpréter nos résultats sur la base de ces calculs d'EBR, mais plutôt axer notre réflexion sur les caractéristiques micro, et nano-dosimétrique des irradiations étudiées, notamment à travers la détermination du spectre énergétique des électrons secondaires de chacune de nos conditions expérimentales.

D'ailleurs, dans cette comparaison complexe, le rôle de la nano- et micro-organisation de la cible biologique d'intérêt, comme les variations locales ou temporelles de la densité de l'ADN (organisation de la chromatine et cycle cellulaire, respectivement), ne doit pas être oublié. Nous avons ainsi cherché à prendre en compte ces considérations dans le développement expérimental de l'irradiation et l'interprétation de nos résultats. Nous avons également maximisé la robustesse de nos quantifications biologiques en analysant plusieurs milliers de cellules pour chaque condition expérimentale et en maintenant la reproductibilité de nos mesures.

Pour interpréter les mesures biologiques réalisées dans ce travail, nous avons fait appel

à la modélisation numérique des irradiations afin de déterminer, au sein des cellules irradiées, les spectres énergétiques des photons, mais surtout des électrons secondaires responsables des dépôts d'énergie au niveau des cibles cellulaires étudiées. Ce travail semble confirmer le lien entre ces grandeurs physiques et la probabilité de dommages sur la molécule d'ADN. Ainsi, alors que le spectre énergétique des électrons secondaires est différent entre 40 kVp et MVp, nous observons une différence de 12,81 % du nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau en moyenne entre ces 2 spectres. A l'inverse, les spectres énergétiques des électrons secondaires à 40 kVp et 220 kVp sont très similaires. On retrouve cette similarité dans le nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X par noyau, avec seulement 0,98 % de différence, entre 40 kVp et 220 kVp.

Comment peut-on expliquer une éventuelle relation entre l'énergie des électrons secondaires et l'augmentation ou la diminution de la probabilité de CDB, si l'on admet que les foyers  $\gamma$ H2A.X correspondent à des CDB exclusivement ? Une CDB peut être définie comme l'association de 2 CSB sur 2 brins différents de la molécule d'ADN et situées à moins de 10 paires de bases l'une de l'autre. Par ailleurs, lorsque l'énergie d'une particule ionisante (comme un électron secondaire) diminue, la distance entre les interactions ponctuelles (ionisations/excitations) sur sa trajectoire diminue également. Ce phénomène pourrait contribuer à une augmentation de la probabilité de 2 interactions successives sur la même trajectoire conduisant à la création de 2 CSB, suffisamment proches pour former une CDB. Cette hypothèse semble cohérente avec nos observations. En effet, si l'on admet qu'un foyer  $\gamma$ H2A.X correspond à une CDB, on observe bien une augmentation du nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X lorsque l'énergie des électrons secondaires est basse. Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec ceux de Beyreuther *et al.* en 2009 (Beyreuther, Lessmann, et al., 2009). Ils ont réalisé des courbes dose-réponse basées sur le dénombrement des foyers co-localisés  $\gamma$ H2A.X et 53BP1, 24 h après l'exposition aux rayonnements X (10 kVp, 25 kVp et 200 kVp). Ils ont

obtenu un nombre plus important de foyers co-localisés  $\gamma$ H2A.X et 53BP1 à 10 kVp et 25 kVp comparé à leur rayonnement de référence de 200 kVp, avec des énergies moyennes des électrons secondaires de 3,7 keV, 7 keV et 21,4 keV, respectivement.

Mais nos observations vont plus loin. En effet, l'un des résultats particulièrement intéressants de notre travail est que pour des configurations au-delà de 220 kVp, on observe encore une diminution du nombre de CDB, via les foyers  $\gamma$ H2A.X, associée à une énergie des électrons secondaires plus élevée. Si l'on continue le raisonnement ci-dessus, cette diminution du nombre de CDB avec l'augmentation de l'énergie des électrons secondaires pourrait s'accompagner de l'augmentation des dommages ponctuels tels que des dommages de bases ou des CSB, les CSB n'entraînant à priori pas la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2A.X ( $\gamma$ H2A.X). Sur la base de ces résultats, le laboratoire a engagé des expérimentations dans le but de vérifier cette hypothèse.

Cette dépendance du nombre de CDB avec l'énergie des électrons secondaires est d'ailleurs cohérente avec les résultats concernant les aberrations chromosomiques et la survie cellulaire. Si la probabilité de CDB augmente, on peut s'attendre à une augmentation du taux d'aberrations chromosomiques et une diminution de la survie cellulaire. C'est d'ailleurs ce qu'ont pu mettre en évidence Krumrey et *al.*, Lehnert et *al.*, Sasaki et *al.*, et Verhaegen et *al.*, en étudiant des configurations aux voltages inférieurs à 30 kVp (Krumrey et *al.*, 2004; Lehnert et *al.*, 2008; Sasaki et *al.*, 1989; Verhaegen & Vral, 1994). En revanche, dans notre modèle cellulaire, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans la mortalité, la capacité proliférative de 1<sup>ère</sup> génération, et le taux d'anomalies de ségrégation entre les 3 énergies de rayonnements X étudiées. Malgré les 10 % de foyers  $\gamma$ H2A.X en plus, il est probable que la configuration 40 kVp ne soit pas suffisamment basse pour que l'on puisse mettre en évidence une différence significative, dans la limite de sensibilité des approches utilisées. En effet, la plupart des études sur l'un ou l'autre de ces paramètres biologiques a

étudié des voltages inférieurs à 30 kVp. D'ailleurs, l'étude des protéines de régulation du cycle cellulaire, réalisée en parallèle de l'étude de la division des cellules, via la réalisation de Western Blot, n'a également pas permis de mettre en évidence de différence, ce qui conforte nos résultats de devenir cellulaire. Elle a cependant contribué à une meilleure caractérisation de notre méthodologie expérimentale notamment en terme d'efficacité de synchronisation et de reprise de cycle avec ou sans irradiation.

Cependant, un autre point de discussion pour ce type d'étude comparative est l'état des cellules au moment de l'exposition, qui est susceptible d'avoir un impact sur les évaluations quantitatives des dommages et de leurs conséquences. Ce point apparaît comme particulièrement critique pour des études comparatives entre énergies des rayonnements X étudiées. Il pourrait en partie expliquer une certaine dispersion dans l'amplitude des différences rapportées dans la littérature. Parmi les paramètres cellulaires susceptibles d'influer sur le résultat, le cycle cellulaire entraîne une variation momentanée de la quantité et de l'organisation de la molécule d'ADN, donc indépendamment des processus de réparation qui pourraient être associés à certaines phases du cycle cellulaire. On peut ainsi s'attendre à ce que la proportion et la nature des dommages soient différentes dans des cellules en phase G1, S, G2 ou M. Egalement, la taille et la forme des noyaux cellulaires diffèrent en fonction du type cellulaire irradié. Par exemple, les lymphocytes ont un volume 2 fois plus petit que les cellules HUVEC. Ainsi, les paramètres de formes et de tailles du modèle cellulaire irradié peuvent potentiellement influencer sur la quantité et la qualité des dommages générés et leurs conséquences. L'organisation de la chromatine est également un facteur susceptible de jouer un rôle dans les variations entre les différentes études. En effet, l'état de compaction de la chromatine entraîne des variations locales de densité d'ADN. Cet état de compaction évolue selon les différents paramètres cellulaires, dont le niveau de différenciation (Cammass et al., 2002). Ainsi, en fonction du type cellulaire étudié, les proportions en eu- et hétérochromatine



peuvent varier significativement et impacter les distributions spatiales des dommages. Aussi, bien que les mesures comparatives, basées sur les aberrations chromosomiques, aient été pour la plupart réalisées sur un modèle de cellules quiescentes (Krumrey et al., 2004; Mestres et al., 2011, 2008; Sasaki et al., 1989; Verhaegen & Vral, 1994), les volumes nucléaires d'un lymphocyte et d'une cellule endothéliale sont très différents et pourraient être à l'origine des différences biologiques observées par d'autres équipes de recherche. En effet, comme mentionné précédemment, des mesures réalisées au laboratoire ont conduit à l'estimation d'un facteur 2 entre les volumes nucléaires d'un lymphocyte et d'une cellule HUVEC ( $150\mu\text{m}^3$  contre  $300\mu\text{m}^3$ , respectivement). On peut raisonnablement penser que la variation d'un facteur 2 de la densité moyenne d'ADN puisse modifier la distribution spatiale des dommages et ainsi influencer son devenir cellulaire, à travers la survie clonogénique et les aberrations chromosomiques et ainsi être à l'origine des différences de résultats entre la littérature et nos résultats sur les HUVECs synchronisées.

En conclusion, nos résultats confortent l'hypothèse d'un lien étroit entre énergie des électrons secondaires produits lors d'une irradiation X et la probabilité et la nature des dommages de la molécule d'ADN. Ainsi, la probabilité de former une CDB semble avoir un lien avec l'énergie de ces électrons secondaires. Il semble ainsi particulièrement intéressant de poursuivre l'exploration visant à identifier des grandeurs de type nanométriques (comme la distribution du nombre d'ionisations dans un nanovolume donné) pertinentes pour la prédiction des effets biologiques. Elles pourraient ainsi s'avérer complémentaires à la dose absorbée. En effet, même si cette dernière est bien corrélable avec les effets biologiques puisqu'il existe des relations mathématiques entre la dose absorbée et certains effets biologiques (relation linéaire avec les dommages de l'ADN -électrophorèse/ $\gamma$ H2A.X- et relation quadratique pour les aberrations chromosomiques ou la survie clonogénique), les

paramètres de ces relations mathématiques sont fortement dépendants de la qualité du rayonnement. Des grandeurs nanométriques auraient l'avantage de combiner la distribution spatiale des interactions dans l'espace (corrélé à l'énergie des particules ionisantes) et leur densité (corrélée à la dose). Ce travail de recherche se poursuit au sein du laboratoire, dans le cadre notamment du projet ROSIRIS dans lequel ma thèse s'inscrit, et pourrait à terme améliorer la capacité de prédiction des effets d'une irradiation.

---

**Bibliographie**

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell*, *Garland Science*
- Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell*. (Garland Science, Ed.) (5th ed.).
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *51*(1938), 786–794.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Ayscough, K., Hayles, J., MacNeill, S. A., & Nurse, P. (1992). Cold-sensitive mutants of p34cdc2 that suppress a mitotic catastrophe phenotype in fission yeast. *Molecular & General Genetics : MGG*, *232*(3), 344–350. <https://doi.org/10.1007/BF00266236>
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, *421*(6922), 499–506.  
<https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters*, *490*(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02114-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02114-7)
- Bensasson, R, Land, E.J, Truscott, T. G. (1993). Light and ionizing radiation: generation of excited states and radicals. *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, *Oxford University Press*, 249–289.
- Bernhardt, P., Friedland, W., Jacob, P., & Paretzke, H. . (2003). Modeling of ultrasoft X-ray induced DNA damage using structured higher order DNA targets. *International Journal of Mass Spectrometry*, *223–224*, 579–597. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00879-5](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00879-5)

- Beyreuther, E., Dörr, W., Lehnert, A., Lessmann, E., & Pawelke, J. (2009). Relative biological effectiveness of 25 and 10 kV X-rays for the induction of chromosomal aberrations in two human mammary epithelial cell lines. *Radiation and Environmental Biophysics*, *48*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s00411-009-0221-4>
- Beyreuther, E., Lessmann, E., Pawelke, J., & Pieck, S. (2009). DNA double-strand break signalling: X-ray energy dependence of residual co-localised foci of gamma-H2AX and 53BP1. *International Journal of Radiation Biology*, *85*(11), 1042–1050. <https://doi.org/10.3109/09553000903232884>
- Bhaumik, S. R., Smith, E., & Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(11), 1008–1016. <https://doi.org/10.1038/nsmb1337>
- Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Reviews. Cancer*, *7*(7), 495–507. <https://doi.org/10.1038/nrc2169>
- Brenner, D. J., & Amols, H. I. (1989). Enhanced risk from low-energy screen--film mammography X rays. *The British Journal of Radiology*, *62*(742), 910–914. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-62-742-910>
- Bruyère, C., & Meijer, L. (2013). Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(6), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.08.004>
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology*,

- Biochemistry and Pharmacology*, 131, 1–87. [https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5_5)
- Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a012559–a012559. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559>
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.-L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., & Losson, R. (2002). Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 17), 3439–3448. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036713129&partnerID=40&md5=e6626bfd5f65ff1e10a20e9fd6cf2fdc>
- Campisi, J., & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J., Pope, B. D., Ryba, T., Newman, S., ... Narita, M. (2012). Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Molecular Cell*, 47(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chowdhury, D., Choi, Y. E., & Brault, M. E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(3), 181–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3523>
- Conradt, B. (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annual Review of Genetics*, 43, 493–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533>

- Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29568–29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>
- Cordoliani, Yves-Sébastien, Foehrenbach, H. (2014). *Radioprotection en milieu médical*. (E. Masson, Ed.) (Third).
- Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H., & Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation Research*, 704(1–3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.006>
- Cristofalo, V. J. (1988). Cellular biomarkers of aging. *Experimental Gerontology*, 23(4–5), 297–307. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90032-0)
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 827–848. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.010>
- Daley, J. M., & Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 34(8), 1380–1388. <https://doi.org/10.1128/MCB.01639-13>
- Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair*, 11(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.024>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895–9901. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3036875>
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 761–770.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9)
- De, D. D. E. L. a R. (2010). Doses Délivrées Aux Patients En Scanographie. *Health (San Francisco)*.
- Di Micco, R., Sulli, G., Dobрева, M., Liontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., ... d'Adda di Fagagna, F. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*, 13(3), 292–302.  
<https://doi.org/10.1038/ncb2170>
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., & Kaina, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, 73(3), 269–278.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525255>
- Dodson, H., Wheatley, S. P., & Morrison, C. G. (2007). Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(3), 364–370. <https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3834>
- Dos Santos, M., Paget, V., Ben Kacem, M., Trompier, F., Benadjaoud, M. A., François, A., ... Milliat, F. (2018). Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response. *International Journal of Radiation Biology*, 94(6), 597–606. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466205>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567(1), 1–61.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), 842–847. <https://doi.org/10.1038/35071124>

- Favaudon, V. (2000). [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiotherapie : Journal de La Societe Francaise de Radiotherapie Oncologique*, 4(5), 355–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098223>
- Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, kern und zelltheilung. *F.C.W. Vogel, Leipzig*, 419.  
Retrieved from  
<http://books.google.com/books?id=ndYcngEACAAJ&pgis=1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zellsubstanz,+kern+und+zelltheilung#0>
- Galle, P, Paulin, R. (2000). *Biophysique, Radiobiologie, Radiopathologie*. (E. Masson, Ed.).
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell*, 159(6), 1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.006>
- Gambini, Denis-Jean, Granier, R. (2007). *Manuel pratique de radioprotection*. (Lavoisier, Ed.) (Third).
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 13(9), 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Goodhead, D. T. (1988). Spatial and temporal distribution of energy. *Health Physics*, 55(2), 231–240. <https://doi.org/10.1097/00004032-198808000-00015>
- Goodhead, D. T., & Nikjoo, H. (1990). Current Status of Ultrasoft X Rays and Track Structure Analysis as Tools for Testing and Developing Biophysical Models of Radiation Action. *Radiation Protection Dosimetry*, 31(1–4), 343–350.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a080694>
- Gorjiara, T., Hill, R., Kuncic, Z., Adamovics, J., Bosi, S., Kim, J.-H., & Baldock, C. (2011). Investigation of radiological properties and water equivalency of PRESAGE<sup>®</sup>



- dosimeters. *Medical Physics*, 38(4), 2265–2274. <https://doi.org/10.1118/1.3561509>
- Gräff, J., & Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research*, 192(1), 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.021>
- Grallert, B., & Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(15), 2315–2320. <https://doi.org/10.4161/cc.6389>
- Gruel, G., Villagrasa, C., Voisin, P., Clairand, I., Benderitter, M., Bottollier-Depois, J.-F., & Barquinero, J. F. (2016). Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition. *PloS One*, 11(1), e0145786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145786>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-Q)
- Hait, W. N., Jin, S., & Yang, J.-M. (2006). A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(7 Pt 1), 1961–1965. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0011>
- Hall, Eric J, Giaccia, A. J. (2011). *Radiobiology for the Radiologist* (Seventh). Lippincott Williams & Wilkins.
- Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P., & Fukasawa, K. (2008). Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene*, 27(40), 5288–5302. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.161>
- Happel, N., & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)

- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J., & Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 135(7), 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.044>
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hone, P. A., Edwards, A. A., Lloyd, D. C., & Moquet, J. E. (2005). The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *International Journal of Radiation Biology*, 81(7), 523–529. <https://doi.org/10.1080/09553000500303591>
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–1583. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>
- Hsiao, K.-Y., & Mizzen, C. a. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(3), 157–165. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs066>
- Ianzini, F., Bertoldo, A., Kosmacek, E. A., Phillips, S. L., & Mackey, M. A. (2006). Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. *Cancer Cell International*, 6(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-6-11>
- ICRP. (1991). ICRP Publication 60: Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP*, 243575.
- ICRP. (2007). *ICRP publication 103: Recommandations 2007 de la Commission*

- internationale de protection radiologique. Annals of the ICRP* (Vol. 37).  
<https://doi.org/10.1016/j.icrp.2007.10.004>
- INRS. (2011). *Radioprotection: Secteur Médical, Scanographie*.
- IRSN. (n.d.). La radiothérapie. Retrieved from  
<https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/applications-medicales/radiotherapie/Pages/La-radiotherapie.aspx>
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., ... Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38(2), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., & Lahav, G. (2012). Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell*, 47(2), 320–329.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>
- Kegel, P., Riballo, E., Kühne, M., Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2007). X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair*, 6(11), 1692–1697.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.05.013>
- Kellerer, A. M. (2002). Electron spectra and the RBE of X rays. *Radiation Research*, 158(1), 13–22. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0013:ESATRO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0013:ESATRO]2.0.CO;2)
- Kellerer, A. M., & Rossi, H. H. (1971). RBE and the primary mechanism of radiation action. *Radiation Research*, 47(1), 15–34. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5559377>

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>
- Kliauga, P., & Dvorak, R. (1978). Microdosimetric measurements of ionization by monoenergetic photons. *Radiation Research*, 73(1), 1–20. <https://doi.org/10.2307/3574570>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., & Lavin, M. F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO Journal*, 25(15), 3504–3514. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601231>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiology Review*, 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... Nomenclature Committee on Cell Death 2009. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Krumrey, M., Ulm, G., & Schmid, E. (2004). Dicentric chromosomes in monolayers of human lymphocytes produced by monochromatized synchrotron radiation with photon energies from 1.83 keV to 17.4 keV. *Radiation and Environmental Biophysics*, 43(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00411-004-0232-0>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.

- J., ... Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, *133*(6), 1019–1031.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *113* ( Pt 2(20)), 3613–3622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877>
- Labattu, M., Guersen, J., Chassin, V., Cassagnes, L., Magnier, F., Donnarieix, D., ... Chabrot, P. (2013). Évaluation de la dose à la peau en radiologie interventionnelle par l'utilisation de films radiochromiques. *Radioprotection*, *48*(1), 115–126.  
<https://doi.org/10.1051/radiopro/2012038>
- Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation. *Water*, *3*(4), 235–253. <https://doi.org/10.3390/w3010235>
- Lee, J.-H., Goodarzi, A. A., Jeggo, P. A., & Paull, T. T. (2010). 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *The EMBO Journal*, *29*(3), 574–585. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.372>
- Lehnert, A., Dörr, W., Lessmann, E., & Pawelke, J. (2008). RBE of 10 kV X rays determined for the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiation Research*, *169*(3), 330–336. <https://doi.org/10.1667/RR0874.1>
- Lehnert, A., Lessmann, E., Pawelke, J., & Dörr, W. (2006). RBE of 25 kV X-rays for the survival and induction of micronuclei in the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiation and Environmental Biophysics*, *45*(4), 253–260.  
<https://doi.org/10.1007/s00411-006-0062-3>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>

- Lisby, M., & Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair*, 8(9), 1068–1076.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.007>
- Loucas, B. D., Eberle, R., Bailey, S. M., & Cornforth, M. N. (2004). Influence of Dose Rate on the Induction of Simple and Complex Chromosome Exchanges by Gamma Rays. *Radiation Research*, 162(4), 339–349. <https://doi.org/10.1667/RR3245>
- Lusser, A., & Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(12), 1192–1200. <https://doi.org/10.1002/bies.10359>
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., ... Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular Cell*, 16(5), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). 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), 781–794.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2)
- Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., & Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 87–93. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.131>
- Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *Journal of Molecular Biology*, 428(9 Pt A), 1659–1680.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.027>
- Mcf-a, C. L., Lehnert, A., & Do, W. (2008). RBE of 10 kV X Rays Determined for the Human Mammary Epithelial of 10 kV X Rays Determined for the Human Mammary Ep-, 336(3), 330–336.

- McIlwraith, M. J., McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., & West, S. C. (2005). Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular Cell*, *20*(5), 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001>
- Mestres, M., Benkhald, L., Caballín, M. R., Barrios, L., Ribas, M., & Barquinero, J.-F. (2011). Induction of incomplete and complex chromosome aberrations by 30 kVp X rays. *Radiation Research*, *175*(2), 201–207. <https://doi.org/10.1667/RR2183.1>
- Mestres, M., Caballín, M. R., Barrios, L., Ribas, M., & Barquinero, J.-F. (2008). RBE of X rays of different energies: a cytogenetic evaluation by FISH. *Radiation Research*, *170*(1), 93–100. <https://doi.org/10.1667/RR1280.1>
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.004>
- Molz, L., Booher, R., Young, P., & Beach, D. (1989). cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes. *Genetics*, *122*(4), 773–782. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90167-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90167-4)
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., ... Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, *113*(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T., & Terrissol, M. (1997). Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International Journal of Radiation Biology*, *71*(5), 467–483. <https://doi.org/10.1080/095530097143798>
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C., & Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in Cell Biology*, *10*(7), 296–303. <https://doi.org/10.1016/S0962->

8924(00)01773-6

- Olins, A. L., & Olins, D. E. (1974). Spheroid Chromatin Units (npr Bodies). *Science*, *183*(4122), 330–332. <https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330>
- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(10), 809–814. <https://doi.org/10.1038/nrm1225>
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., & Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, *4*(4), 281–300. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90149-X)
- Panganiban, R. A. M., & Day, R. M. (2013). Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PloS One*, *8*(10), e78589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078589>
- Panier, S., & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Panteleeva, A., Słonina, D., Brankovic, K., Spekl, K., Pawelke, J., Hoinkis, C., & Dörr, W. (2003). Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*, *42*(2), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00411-003-0199-2>
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology : CB*, *10*(15), 886–895. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2)
- Paulsen, R. D., & Cimprich, K. A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair*, *6*(7), 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.015>
- Poludniowski, G., Landry, G., DeBlois, F., Evans, P. M., & Verhaegen, F. (2009). SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes. *Physics in*



- Medicine and Biology*, 54(19), N433-8. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/19/N01>
- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Zhang, Y.-W., Ji, J. J., Bonner, W. M., Kinders, R. J., ... Pommier, Y. (2010). Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(18), 4532–4542. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0523>
- Rhind, N., & Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 2(Pt 22)), 3889–3896. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058076>
- Rodríguez-Vargas, J. M., Ruiz-Magaña, M. J., Ruiz-Ruiz, C., Majuelos-Melguizo, J., Peralta-Leal, A., Rodríguez, M. I., ... Oliver, F. J. (2012). ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Research*, 22(7), 1181–1198. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.70>
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, a. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Röntgen, W. C. (1896). On a new kind of rays. *Science (New York, N.Y.)*, 3(59), 227–231. <https://doi.org/10.1126/science.3.59.227>
- Rothkamm, K., & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5057–5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>
- Sansare, K., Khanna, V., & Karjodkar, F. (2011). Early victims of X-rays: a tribute and current perception. *Dento Maxillo Facial Radiology*, 40(2), 123–125.

<https://doi.org/10.1259/dmfr/73488299>

Sasaki, M. S., Kobayashi, K., Hieda, K., Yamada, T., Ejima, Y., Maezawa, H., ... Okada, S.

(1989). Induction of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes by Monochromatic X-rays of Quantum Energy between 4.8 and 14.6 keV. *International Journal of Radiation Biology*, 56(6), 975–988.

<https://doi.org/10.1080/09553008914552431>

Schmid, E., Regulla, D., Kramer, H.-M., & Harder, D. (2002). The effect of 29 kV X rays on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Research*, 158(6), 771–777. [https://doi.org/10.1667/0033-](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0771:teokxr]2.0.co;2)

[7587\(2002\)158\[0771:teokxr\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0771:teokxr]2.0.co;2)

Science & Santé. (2011). Radioactivité: Le double visage de l'atome.

Sheikh-Bagheri, D., & Rogers, D. W. O. (2002). Monte Carlo calculation of nine megavoltage photon beam spectra using the BEAM code. *Medical Physics*, 29(3), 391–402.

<https://doi.org/10.1118/1.1445413>

Singh, S. K., Szulik, M. W., Ganguly, M., Khutsishvili, I., Stone, M. P., Marky, L. A., &

Gold, B. (2011). Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6789–6801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr275>

Slonina, D., Spekl, K., Panteleeva, A., Brankovic, K., Hoinkis, C., & Dorr, W. (2003).

Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays.

*Radiation and Environmental Biophysics*, 42(1), 55–61. [https://doi.org/10.1007/s00411-](https://doi.org/10.1007/s00411-003-0177-8)  
003-0177-8

Smith, G. C., & Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes &*

*Development*, 13(8), 916–934. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.916>

Stenerlöv, B., Karlsson, K. H., Cooper, B., & Rydberg, B. (2003). Measurement of prompt

DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites:

- results for cells deficient in nonhomologous end joining. *Radiation Research*, 159(4), 502–510. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0502:MOPDDS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0502:MOPDDS]2.0.CO;2)
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>
- Talbert, P. B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P. L., ... Henikoff, S. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics & Chromatin*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-7>
- Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., ... Kroemer, G. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology*, 10(6), 676–687. <https://doi.org/10.1038/ncb1730>
- Thiriet, C., & Hayes, J. J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Molecular Cell*, 18(6), 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.008>
- Tissandier, G. (1894). *La Nature*.
- Tubiana, M. (2008). *Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection: Bases fondamentales*. (Hermann, Ed.).
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, 22(20), 5612–5621. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg541>
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 757–765.

- <https://doi.org/10.1038/nrm1737>
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology*, *19*(5), 207–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.001>
- Vaurijoux, A., Voisin, P., Freneau, A., Barquinerio, J. F., & Gruel, G. (2017). Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells. *Mutation Research*, *797–799*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.03.003>
- Verhaegen, F., & Vral, A. (1994). Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low-LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET. *Radiation Research*, *139*(2), 208–213. <https://doi.org/10.2307/3578666>
- Vessoni, A. T., Filippi-Chiela, E. C., Menck, C. F. M., & Lenz, G. (2013). Autophagy and genomic integrity. *Cell Death and Differentiation*, *20*(11), 1444–1454.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2013.103>
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(6), 385–392. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *35*(C), 95–125. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60611-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X)
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, *171*(4356), 737–738.  
<https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Williams, G. J., Hammel, M., Radhakrishnan, S. K., Ramsden, D., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2014). Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA*

*Repair*, 17, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.009>

Willis, N., & Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Division*, 4, 13. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-13>

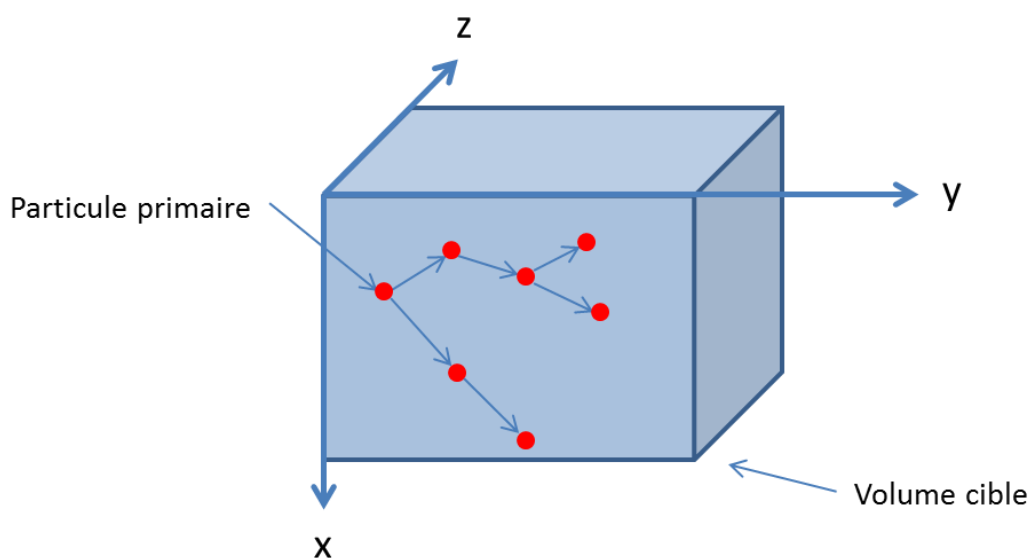
Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., & Dickerson, R. E. (1980). Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, 287(5784), 755–758.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7432492>

Wong, J., Armour, E., Kazanzides, P., Iordachita, I., Tryggestad, E., Deng, H., ... DeWeese, T. L. (2008). High-Resolution, Small Animal Radiation Research Platform With X-Ray Tomographic Guidance Capabilities. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 71(5), 1591–1599. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.04.025>

## ANNEXE 1

### Simulations Monte Carlo

Une particule primaire, au cours de son parcours, va subir de nombreuses interactions et par conséquent va perdre de l'énergie. Cette énergie sera déposée à l'endroit de l'interaction et dans certains cas, des particules secondaires seront créées. Les particules secondaires vont être stockées afin d'être traitées quand le transport de la particule primaire sera terminé. Chaque ensemble particule primaire + particules secondaires forme une histoire stochastique. L'histoire d'une particule peut donc se résumer en une succession de tirages aléatoires liés à la détermination de l'énergie, la trajectoire, le parcours ou le mode d'interaction avec le milieu traversé. Mathématiquement les interactions rayonnement / matière sont définies sous la forme de fonctions de probabilité de variables aléatoires (Figure 44).



Probabilité aléatoire que la particule aille dans une direction  $x$ ,  $y$  ou  $z$  au moment de son interaction avec la matière et/ou de la création de particules secondaires.

Figure 44: Evénements et points de transferts dans un volume cible.

A la fin, la modélisation des configurations d'irradiation a été réalisée en tenant compte des spectres de photons initiaux et des différentes couches de matériau entre la source

et les cellules. En particulier, pour les configurations réalisées sur le SARRP, les spectres des photons initiaux ont été calculés en utilisant le logiciel Speckcalc (Poludniowski et al., 2009) tandis que pour les irradiations 4 MVp réalisés sur l'accélérateur linéaire médical, le spectre des photons initiaux est dérivé de la figure 10 de l'article de Sheikh-Bagheri *et al.*, 2002 (Sheikh-Bagheri & Rogers, 2002). Dans les deux cas, le volume contenant les cellules irradiées ont été modélisées sous la forme d'un mono-volume de matériau d'eau liquide de 5  $\mu\text{m}$  de hauteur et de 125 x 85 mm dans le plan x-y afin de garantir l'équilibre électronique. Différentes couches de matériau de part et d'autres des cellules, ont été prises en compte, comme le montre la Figure 45, panels A et B.

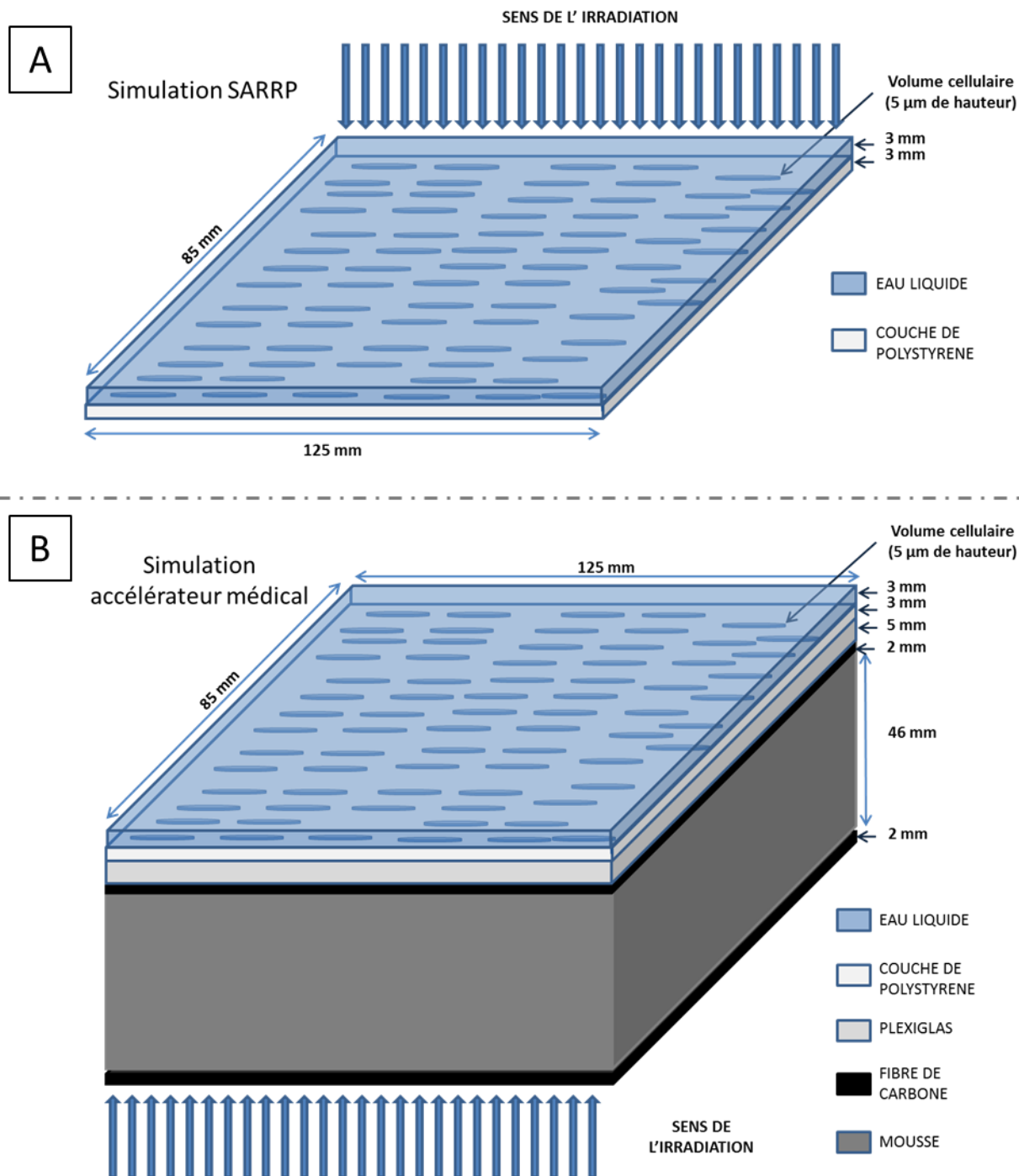


Figure 45: Schéma illustrant la modélisation des configurations d'irradiation effectuées sur le SARRP (panel A) et l'accélérateur médical (panel B).

Pour les configurations SARRP, la source de photons traverse le milieu de culture représenté ici par de l'eau liquide de 3 mm de hauteur, ensuite le volume contenant les cellules est positionné et une couche de polystyrène de 3 mm est modélisée derrière



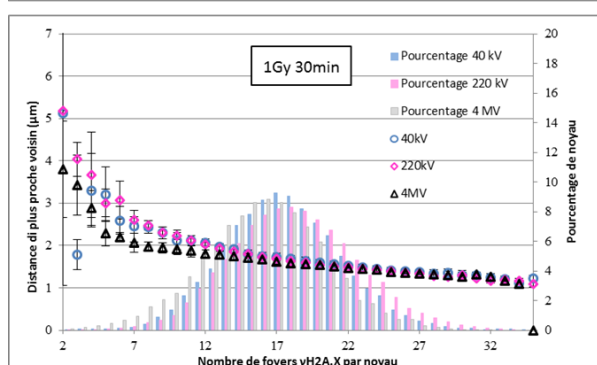
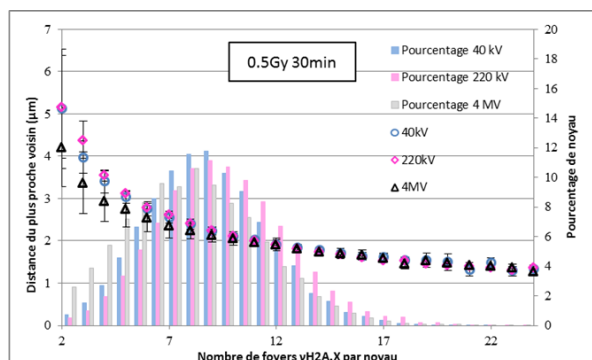
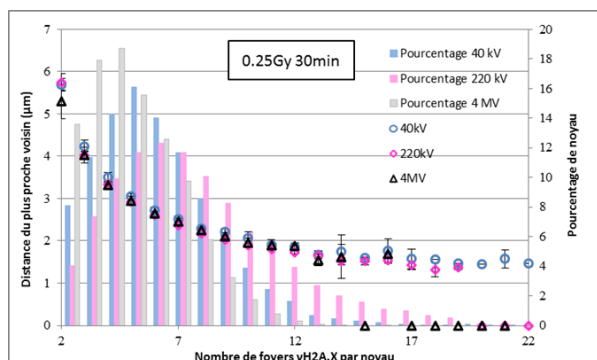
représentant le support de culture cellulaire.

Pour la simulation de l'accélérateur médical, une table de carbone est située entre le faisceau et la boîte contenant les cellules. Ainsi, dans la simulation, la première couche traversée par la source de photons est une table de 50 mm de hauteur (2 mm de fibre de carbone + 46 mm de mousse + 2 mm de fibre de carbone), suivie de 5 mm de plexiglas, puis 3 mm de polystyrène puis le volume cellulaire de 5  $\mu\text{m}$  de hauteur. Derrière le volume de la cellule, un volume d'eau liquide de 3 mm représentant le milieu cellulaire est également pris en compte.

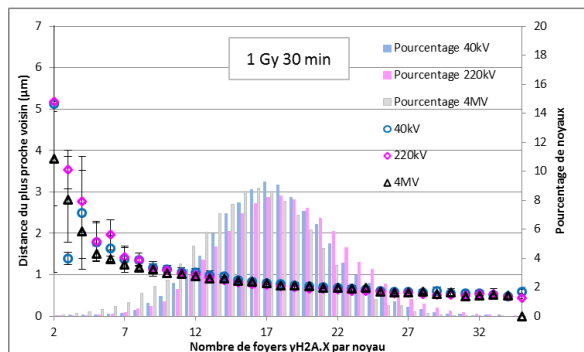
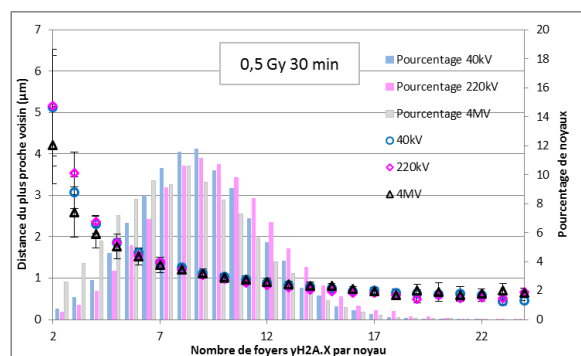
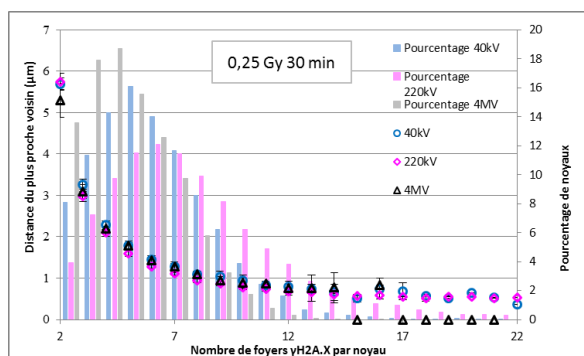
Les spectres d'électrons secondaires au niveau des cellules nécessaires dans ce travail ont été calculés. Afin d'obtenir l'espace de phase des électrons secondaires, le transport de photons dans les différentes couches de matière a été réalisé en utilisant la liste de physique de Livermore (LowEnergy, option 4) dans Geant4 qui permet de simuler des interactions photons à une énergie minimale de 250 eV. Les électrons secondaires produits par les photons ont également été transférés dans la géométrie simulée en utilisant les modèles physiques disponibles dans cette liste de physique. Lorsqu'un électron est entré dans le volume contenant les cellules, son énergie cinétique, sa position (x, y, z) et son impulsion (px, py, pz) ont été enregistrées et les électrons ont été supprimés, afin d'économiser du temps de calcul, ce que l'on appelle un espace des phases. Dans de rares cas, les électrons étaient directement produits par une réaction photonique dans le volume cellulaire. Dans ce cas, la même information a été enregistrée dans l'espace des phases.

## ANNEXE 2

## Moyenne de la distance du plus proche voisin



## Minimum des distances du proche voisin



Article reprenant une partie des résultats et des conclusions de ce travail de thèse et qui a été accepté pour publication dans le journal « International Journal of Radiation Biology » le 22 août 2018.

**Relation between DNA double-strand breaks and energy spectra of secondary electrons produced by different X-ray energies**

Amelie Freneau<sup>a</sup>, Morgane Dos Santos<sup>a</sup>, Pascale Voisin<sup>a</sup>, Nicolas Tang<sup>c</sup>, Marta Bueno Vizcarra<sup>c</sup>, Carmen Villagrasa<sup>c</sup>, Laurence Roy<sup>b</sup>, Aurelie Vaurijoux<sup>a</sup> and Gaetan Gruel<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup>Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Research in Radiobiology and Regenerative Medicine, Laboratory of Radiobiology of Accidental Exposition; <sup>b</sup>Institute of Radioprotection of Nuclear Safety (IRSN), Department of Research on the Biological and Health Effects of Ionizing Radiation, <sup>c</sup>Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, Department of Dosimetry, Laboratory of Ionizing Radiation Dosimetry; BP 17, 92262 Fontenay aux Roses cedex, France.*

\*corresponding author: [gaetan.gruel@irsn.fr](mailto:gaetan.gruel@irsn.fr)

---

## Relation between DNA double-strand breaks and energy spectra of secondary electrons produced by different X-ray energies

### Abstract

**Purpose:** In a radiological examination, low-energy X-radiation is used (< 100 keV). For other radiological procedures, the energy used is several MeV. ICRP in publication 103 has currently considered that photons irrespective of their energy have the same radiation weighting factor. Nevertheless, there are topological differences at the nanoscale of X-ray energy deposition as a function of its energy spectrum, meaning that the different interactions with living matter could vary in biological efficacy.

**Materials and Methods:** To study these differences, we characterized our irradiation conditions in terms of initial photon energies, but especially in terms of energy spectra of secondary electrons at the cell nucleus level, using Monte Carlo simulations. We evaluated signaling of DNA damage by monitoring a large number of  $\gamma$ H2A.X foci after exposure of G0/G1-phase synchronized human primary endothelial cells at a dose from 0.25 to 5 Gy at 40 kV, 220 kV and 4 MV X-rays. Number and spatial distribution of  $\gamma$ H2A.X foci were explored. In parallel, we investigated cell behavior through cell death and ability of a mother cell to produce two daughter cells. We also studied the missegregation rate after cell division.

**Results:** We report a higher number of DNA double-strand breaks signaled by  $\gamma$ H2A.X for 40 kVp and/or 220 kVp compared to 4 MVp for the highest tested doses of 2 and 5 Gy. We observed no difference between the biological endpoint studies with 40 kVp and 220 kVp X-ray spectra. This lack of difference could be explained by the relative similarity of the calculated energy spectra of secondary electrons at the cell monolayer. .

**Conclusion:** The energy spectrum of secondary electrons seems to be more closely related to the level of DNA damage measured by  $\gamma$ H2A.X than the initial spectrum of photon energy or voltage settings. Our results indicate that as the energy spectrum of secondary electrons increases, the DNA damage signaled by  $\gamma$ H2A.X decreases and this effect is observable beyond 220 kVp.

Keywords (3 – 6): energy X-rays, secondary electrons, DNA damage,  $\gamma$ H2A.X foci, cell behavior, missegregation

## Introduction

X-rays with an energy below 50 keV are frequently applied in diagnostic radiology, particularly mammography. ICRP publication 103 assigned a radiation weighting factor of 1 to this radiation quality (ICRP, 2007). This has since been a topic of continuous discussion. One reason for this is a potential risk of radiation-induced cancer by mammography. An increasing amount of *in vitro* data obtained in the low-energy region indicates a complex dependence of biological effectiveness on photon energy (Lehnert et al., 2008). Indeed, Brenner *et al.*, Goodhead & Nikjoo *et al.* and Kellerer *et al.* have reported an increase in relative biological effectiveness of photons when their energy decreases (Brenner & Amols, 1989; Goodhead & Nikjoo, 1990; Albrecht M Kellerer, 2002).

In theory, this difference in biological efficacy could have its origin in the spatial distribution differences at the nanoscale of X-ray energy deposition as a function of their energy spectrum (Goodhead, 1988). Indeed, as the photon energy decreases, the nature of its interaction with matter changes. In water, below an energy of 50 keV, there is a decrease in the probability of Compton interactions and an increase in photoelectric interactions. This change leads to a modification of the energy spectrum of the secondary electrons created, and thus potentially a change in the quality of the resulting radiation-induced damage, as DNA damage, mis-repair of DNA double-strand breaks and, finally, cell behavior.

Most of the observations reported in the literature concern mis-repair of DNA double-strand breaks, including those of Mestres *et al.* who showed an increase in chromosome aberrations in lymphocytes irradiated with 30 kV, 80 kV and 120 kV X-rays. Slonina *et al.* showed induction of micronuclei with human fibroblasts and keratinocytes irradiated with 25 kV and Lehnert *et al.* with human mammary epithelial cells irradiated with 25 kV and 10 kV X-rays (Lehnert et al., 2008, 2006; Mestres et al., 2008; Slonina et al., 2003). In addition, some studies have focused on clonogenic survival, including a study by Panteleeva

*et al.*, who showed a decrease in clonogenic survival with primary human epidermal keratinocytes and fibroblasts irradiated with 25 kV compared to 200 kV (Panteleeva et al., 2003). These differences in mis-repair or clonogenic survival rates are likely to originate in the generation of DNA damage.

DNA can be damaged by ionizing radiation in various ways, amongst others by forming double-strand breaks (DSBs). DNA DSBs are probably the most deleterious of the many different types of DNA damage that occur within the eukaryotic cell (Burma, Chen, Murphy, Kurimasa, & Chen, 2001). An early response to DSBs is the phosphorylation of a variant form of the histone H2A designated H2A.X, located in the area of the break, at serine 139. Phosphorylated H2A.X (called  $\gamma$ H2A.X) can be visualized as foci at break sites by immunofluorescence using phospho-specific antibodies (Paull et al., 2000); these are also known as ionizing radiation-induced foci (IRIF).  $\gamma$ H2A.X initiates the formation of a platform to attract and retain proteins, such as Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1), mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), breast cancer susceptibility 1 (BRCA1), and p53-binding protein 1 (53BP1), and in turn these lead to the recruitment of DNA damage repair proteins (Kinner et al., 2008; Lisby & Rothstein, 2009; Paull et al., 2000; van Attikum & Gasser, 2009). The study of DNA damage formation seems to be a good way to evaluate possible quantitative and qualitative differences in the damage induced by low- and high-energy radiation.

Few studies have focused on characterizing the qualitative differences of DNA damage. Beyreuther *et al.* (Beyreuther, Lessmann, et al., 2009) investigated the number of induced as well as persistent DNA damage foci to investigate late effects after exposure of medical applications such as mammography screening. They studied IRIF formation after exposure to different energy X-rays, 10 kV, 25 kV and 200 kV. They showed energy dependence with increasing DNA damage number at decreasing photon energy. Despite

highlighting this difference, we currently lack a qualitative analysis of the damage and its effects on cell behavior. Moreover, these comparative studies do not usually explore the biological effects of higher energy X-rays usually used in radiotherapy. This is all the more interesting as it can be assumed that the energy spectrum of the secondary electrons of these latter radiations would be significantly different from the reference X-ray used today in most radiobiology studies (*ie.* 200-220 kV).

In the present work, we deployed a multiparametric experimental strategy allowing us to study different biological endpoints in parallel, from the same pool of cells, *ie.* cells from one experiment yielding simultaneously foci data, cell division measurements and quantification of chromosome missegregation events. In addition, we characterized our irradiation conditions in terms of initial photon energies, but especially in terms of energy spectra of secondary electrons at the cell nucleus level, using Monte Carlo simulations which took into account their environment at the time of irradiations. Special attention was paid to dosimetry in these experiments to ensure comparable macroscopic absorbed doses among the studied energy spectra, including the exclusive use of plastic dishes for the irradiations (Kegel, Riballo, Kühne, Jeggo, & Löbrich, 2007). Photon spectra from X-ray generators of 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp were used to determine the respective biological effects on human primary cells. We studied the quality of DNA damage through the amount and the spatial distribution in the nucleus of  $\gamma$ H2A.X foci in primary endothelial cells with respect to post-irradiation time and X-ray energy. We explored cell behavior to compare the consequences of radiation-induced DNA damage. To explore the regulation of the cell cycle depending on the X-ray energy, the frequencies of cell division and death, and missegregation rate, such as micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in mono- and binucleated G1 cells, were analyzed.

## **Materials and Methods**

### ***Cell Culture***



Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were from the Lonza Group (ref. C2519A, lot0000394986) and isolated by Lonza from human tissue (from 2 females and 2 males) donated after permission was obtained for its use in research applications by informed consent or legal authorization. All cells tested negative for mycoplasma, bacteria, yeast and fungi. Cell lots and donors were tested and negative for HIV-1, hepatitis B and hepatitis C. HUVECs were cultured at 37°C, with 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> in EGM-2 media optimized for the proliferation of endothelial cells and supplemented with 5% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, gentamicin and amphotericin-B (EGM-2MV BulletKit, CC-3202, Lonza). After thawing, HUVECs were counted using the Cellometer® K2 - Nexcelom, and seeded at 8000 cells/cm<sup>2</sup>. Seventy-two hours later, when they are 80% confluent, the HUVECs were trypsinized and seeded at 8000 cells/cm<sup>2</sup>. Ninety-six hours later, on the day of irradiation, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-phase synchronized HUVECs were obtained by contact inhibition induced in confluent culture. Synchronized cells were seeded 5 h prior to irradiation at a density of 30 000 cells/cm<sup>2</sup> on plastic dishes (1-well Permax® in Nunc® Lab-Tek® chamber slide systems; Thermo Fisher Scientific and Petri; BD Biosciences) and incubated at 37°C.

### ***Irradiation platform and conditions***

Cell irradiations were performed using two irradiation facilities with different energy ranges: a medical linear accelerator (Elekta Synergy®) and a Small Animal Radiation Research Platform (SARRP).

Elekta Synergy® is a medical linear accelerator and was used to deliver X-rays with a maximal energy of 4 MeV (4 MVp). The dose rate measured with an ionization chamber calibrated in air kerma free was about 1Gy.min<sup>-1</sup> at a distance of 120 cm from the source and with a 30 x 30 cm irradiation field (Table 1).

The SARRP (XSTRAHL, Ltd., UK) is an image-guided micro irradiator, composed of

a Varian X-ray tube mounted on a gantry, mainly dedicated to small animal irradiation (Wong et al., 2008). However, thanks to an adequate dosimetry protocol and irradiation configuration set-up (Dos Santos et al., 2018), it is also possible to perform cell irradiation. In this work, two configurations, using two different high voltages, were used with this platform. In both cases, inherent and additional filtrations of 0.8 and 1 mm of beryllium and aluminum, respectively, a source sample distance of 30.5 cm and a collimator leading to an 8 x 8 cm irradiation field were used (Table 1). The SARRP was used to deliver X-rays with a maximal energy of 40 keV (40 kVp) and 220 keV (220 kVp) at a dose rate of about 1 Gy.min<sup>-1</sup> in air kerma, in both cases. The details of the dosimetry protocol used for cell irradiation on the SARRP facility are given in Dos Santos *et al*, 2018, (Dos Santos et al., 2018). Briefly, absolute dosimetry measurements were performed inside a cell container with an ionization chamber calibrated in air kerma free-in-air and then converted into water kerma free-in-air. Then, attenuation due to the cell culture medium was evaluated using measurements with EBT3 films.

For all irradiations configurations, the doses delivered to the cell monolayer were 0.25, 0.5, 1 and 2 Gy for the earlier time (30 min post-irradiation), and 5 Gy for the later time (5 h post-irradiation). Culture media were not renewed after irradiation.

The uncertainty in the dose rate measurement was about 5%, 3% and 7% for 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp respectively at k=2.

### ***Immunostaining***

HUVECs were immunostained after exposure to X-rays. Briefly, cells were washed with 1 X PBS (14190-094, Life Technologies), fixed with formalin solution 10% neutral buffered (HT5011, Sigma-Aldrich) and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich) for 3 min, and then washed 1 more time with PBS. The following primary antibodies were used in this study: mouse IgG1 monoclonal anti-phospho-histone H2AX (Ser139) antibody

(1:1000; 05-636, clone JBW301, Millipore). Antibodies were diluted in 1X PBS with 2% (w/v) BSA (bovine serum albumin; A9418, Sigma-Aldrich) and incubated with cells for 1 h at room temperature (RT). Cells were then washed 3 more times and incubated for 1 h with a secondary antibody, goat anti-mouse IgG1 ( $\gamma$ 1) coupled to Alexa Fluor®488 ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 1:1000; A21121, Life Technologies). They were diluted in PBS with 2% BSA and incubated with cells for 1 h at RT. Cells were washed as described above. DNA was stained with DAPI ( $0.2 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ ; 1050A, Euromedex) and mounted with ProLong® Antifade Reagents (P36930, Life Technologies).

### ***Fluorescence image acquisition and analysis***

Image acquisition and analysis were performed with the Scan<sup>R</sup> platform (Olympus), as described previously (Gruel et al., 2016; Vaurijoux, Voisin, Freneau, Barquinero, & Gruel, 2017). Briefly, images were acquired on an inverted Olympus IX81 fluorescence microscope with a UPLSAPO 100XO oil immersion objective (Olympus) and an NA of 1.4; the microscope was coupled with an Orca R<sup>2</sup> CCD camera (Hamamatsu) and a motorized SCAN IM IX2 stage (Märzhäuser). Image analysis was performed with Scan<sup>R</sup> analysis software (Olympus). For each channel, images were acquired as 3 z-stack images around and including the focus plane with step size of  $0.5 \text{ }\mu\text{m}$  between planes. The images of the 3D stack were projected to 2D xy images using maximum intensity projection. An edge segmentation algorithm was used to detect nuclei in the DAPI channel (main object) and  $\gamma$ H2AX foci in the Alexa Fluor ® 488 channel (sub-object 1). Cells in G0/G1 phase were selected with a “flow cytometry-like” analysis (Gruel et al., 2016). A first selection based on the area and circularity of the nuclei was based on the definition of an adequate region on the corresponding scatter plot. This step allowed us to consider a region with only isolated nuclei, by removing from the analysis objects corresponding to nucleus clusters. A second region, based on the integrated intensity levels of DAPI fluorescence associated with the nuclei and Alexa Fluor ® 488

fluorescence associated with  $\gamma$ H2A.X foci, was measured for each nucleus and was then used to isolate nuclei in G0/G1 phase. IRIF were analyzed only in nuclei within the gate formed by the intersection of these two regions (Vaurijoux et al., 2017).

### ***Analysis of missegregation events***

Forty-eight hours after irradiation, cells were fixed with formalin solution 10% neutral buffered (HT5011, Sigma-Aldrich), stained with DAPI. (0.2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>; 1050A, Euromedex) and mounted with ProLong® Antifade Reagents (P36930, Life Technologies). Micronuclei and/or nucleoplasmic bridges were scored in mono- and binucleated G1 cells.

### ***Videomicroscopy***

Following irradiation, HUVECs, seeded in Corning™ Falcon™ Easy-Grip Tissue Culture Dishes, were placed in the incubation system, allowing control of temperature, humidity and CO<sub>2</sub> levels, which is mounted on an inverted Olympus IX83 phase microscope with a UPLFLN 10XPH objective (Olympus). The acquisition was performed with Scan^R software (Olympus). Six different fields were acquired per dish, every 5 minutes, for 96 hours. Image analysis was performed with Image J, using MTrackJ and Grid Overlay plug ins, allowing us to count the cells able to form 2 daughter cells and the dying cells. When an adherent cell produced two daughter cells, we counted this as one a “cell division” event, and when we observed the disruption of an adherent cell, it was counted as a cell death event. The frequency of division was the number of “cell division” events observed for a given time step, divided by the initial number of cells in the live-cell imaging field (the same analysis methodology was used for “cell death” event).

### ***Monte Carlo simulations***

Monte Carlo simulations of the secondary electron spectra were performed using the Geant4 Monte Carlo toolkit version 10.3. To this end, the modeling of the irradiation configurations was performed taking into account the initial photon spectra and the different layers of

material between the source and the cells.

In particular, for the SARRP configurations, the initial photon spectra were calculated using Speckcalc software (Poludniowski et al., 2009), whereas for the 4 MV irradiation performed with the medical linear accelerator, the initial photon spectra were derived from figure 10 in Sheikh-Bagheri *et al.*, 2002 (Sheikh-Bagheri & Rogers, 2002). In both cases, the irradiated cells were modeled as a mono-volume of liquid water 5  $\mu\text{m}$  in height and 125x85 mm in the x-y plane in order to ensure electronic equilibrium. Between the photon source and the cell volume (or behind the cell volume), different material layers were taken into account as shown in figure 1.

For the SAARP configurations, the photon source traverses the cell medium, approximated here by a liquid water layer 3 mm in height, then the cell volume is positioned and a polystyrene layer of 3 mm is modeled behind to represent the dish material where cells are grown.

In the medical accelerator simulation, a carbon table is located between the beam and the dish containing the cells. Therefore, in the simulation, the first layer traversed by the photon source is a 50 mm height table (2 mm of carbon fiber + 46 mm of foam + 2 mm of carbon fiber), followed by 5 mm of Plexiglas, then 3 mm of polystyrene and then the cell volume 5  $\mu\text{m}$  in height. Behind the cell volume, a 3 mm liquid water volume representing the cell medium is also taken into account.

The secondary electron spectra at cell level were calculated from the phase space of the electrons entering (or produced) in the modeled cell volume. In order to obtain the phase space of the secondary electrons, photon transport in the different layers of matter was performed using the Livermore physics list (LowEnergy, option 4) in Geant4, which simulates photon interactions to a minimal energy of 250 eV. Secondary electrons produced by photons were also transported in the simulated geometry using the physical models

available in this physics list. When an electron entered in the cell volume, its kinetic energy, position ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) and momentum ( $p_x$ ,  $p_y$ ,  $p_z$ ) were recorded and the electrons were killed, in order to save calculation time. In rare cases, electrons were produced directly by a photon reaction in the cell volume. In this case, the same information was registered in the phase space. This information allowed us to calculate the energy spectra presented in this work and to perform a more detailed simulation of the energy deposition in the cell volume using the information described above as the irradiation source (simulations in progress).

### ***Statistics***

Student's t test was performed to evaluate the statistical significance of any differences among measurements.

### **Results**

#### ***Photon and electron energy spectrum***

Figure 2 reports the photon energy spectrum for irradiations performed on the SARRP Platform at 40 and 220 kVp obtained with the Speckcalc software (Poludniowski et al., 2009). As mentioned before, an additional filtration of 1 mm of aluminum was used for irradiation. It allows lower energy X-rays compared to the reference filtration of 0.15 mm of copper normally used for irradiation with the SARRP. The 40 kVp voltage was chosen because it is the lower voltage that can be achieved on the SARRP irradiator and is close to the photon energy spectrum used for mammography examinations. This configuration allows a large proportion of very low-energy X-rays leading to photoelectric interactions. The 220 kVp voltage was chosen because it is often considered as a reference voltage for the SARRP and also in the literature. For the 4 MVp irradiation performed with the medical linear accelerator, the initial photon spectra were derived from figure 10 in Sheikh-Bagheri et al., 2002 (Sheikh-Bagheri & Rogers 2002).

To overcome problems due to the modification of the energy spectrum of the emitted

photons, all irradiations were performed without a lid. The mean photon energies were 25.6 keV, 70.2 keV and around 1.3 MeV, respectively, for 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp.

Figure 3 reports the secondary electron energy spectrum obtained for the three configurations. The mean energy of the produced secondary electrons increased with X-ray energy, as expected, respectively 14 keV, 20 keV and 859 keV for 40 kVp, and 220 kVp and 4 MVp.

### ***Quantification of $\gamma$ H2A.X foci per nucleus***

We investigated the number of  $\gamma$ H2A.X foci induced by X-rays of different energy spectra. To harmonize the DNA content of the cells at the time of irradiation, we performed our analysis on cells in the same cell cycle state. Thus, we exposed HUVECs synchronized in the G0/G1 phase of the cell cycle to 0.25, 0.5, 1 or 2 Gy of 40 kVp, 220 kVp or 4 MVp X-rays and studied  $\gamma$ H2A.X foci formation 30 min after exposure. All irradiations were performed exclusively on adherent cells in plastic dishes. Using automated detection of nuclei and foci, we analyzed a mean of 4200 cells for each replicate experiment so that we could screen subpopulations of cells or foci by different characteristics, such as shape, foci spatial distribution in the nuclei, and weight their representativeness within the entire population of exposed cells. All results presented here concern only cells in the G0/G1 phase of the cell cycle.

Thirty minutes post-irradiation, when analyzing dose-by-dose after exposure, we observed no significant difference from 0.25 to 1 Gy in the mean number of  $\gamma$ H2A.X foci per nucleus among the 3 tested X-ray energies (table 2) (t-test,  $p > 0.05$ ). However, at 2 Gy, a significant difference between 40 kVp and 4 MVp was measured with, on average,  $30.3 \pm 2.21$ ,  $30.6 \pm 2.96$  and  $26.4 \pm 0.87$   $\gamma$ H2A.X foci per nucleus, at 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp, respectively (figure 4) (mean  $\pm$  SE, from at least 3 replicate experiments, t-test,  $p = 0.03$ ).

In order to study the differences of resolution rate, we studied the IRIF number 5 h

after exposure to 5 Gy, using the same three different qualities of radiation (figure 5). We analyzed a mean of 4500 cells for each condition and performed at least 3 replicate experiments. All results here relate only to cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. We observed, on average,  $15.2 \pm 0.80$ ,  $14.3 \pm 0.67$  and  $12.2 \pm 0.54$   $\gamma$ H2A.X foci per nucleus, respectively (mean  $\pm$ SE, from at least 3 replicate experiments). Significant differences were seen between 40 kVp and 4 MVp (t-test,  $p= 0.008$ ) and between 220 kVp and 4 MVp voltages (t-test,  $p= 0.01$ ).

### ***Spatial distribution of $\gamma$ H2A.X foci per nucleus***

To investigate if this decrease in mean values could be due to differences in the spatial distribution of  $\gamma$ H2A.X foci, we analyzed the mean distance from the nearest neighbor of  $\gamma$ H2A.X foci as a function of their number per nuclei (figures 6), 30 min post-exposure at 0.25, 0.5, 1 and 2 Gy, and 5 h post-exposure at 5 Gy, among the 3 tested X-ray energies. As expected, the distances from the nearest neighbor were dependent on the number of  $\gamma$ H2A.X foci per nuclei, *ie*, the more  $\gamma$ H2A.X foci, the lower the distance from the nearest neighbor will be. The mean distance was obtained by using the x, y coordinates of all  $\gamma$ H2A.X foci, keeping the minimum distance of each  $\gamma$ H2A.X focus from each other and calculating the average of all the minimum distances per nucleus. For all doses, 30 min and 5 h post-irradiation, there was no significant difference between the three qualities of radiation (t-test,  $p>0.05$ ).

### ***Cell division and mortality rate as a function of the energy spectra of irradiation***

We also investigated if this difference in the mean number of foci had an impact on cell behavior like cell division and mortality rates. We focused on the two most different energy spectra: 40 kVp and 4 MVp. To identify cells able to complete a full cell cycle after exposure, we used phase contrast live-cell imaging of synchronized cells exposed to 5 Gy. All results reported here are from 4 replicate experiments per condition. Around 1500 and 500 events per



condition (division + death) were counted for the non-irradiated and irradiated cells, respectively.

Figure 7 shows the cumulated number of cell division events per step of 6 hours, for the non-irradiated and 5 Gy irradiated cells. For the control irradiation, we observed that division events began 18 h post-plating, and seemed to be delayed by around 6 h for the exposure conditions. For the 5 Gy irradiated cells, more than a third of the initial cells achieved one cell division within 42 h following exposure. No significant difference was found between the two qualities of radiation studied, with  $34.2 \pm 24.2\%$  and  $40.9 \pm 7.7\%$  of division frequency 42 h post-exposure after 5 Gy of irradiation at 40 kVp and 4 MVp, respectively (mean  $\pm$  SE, t-test,  $p > 0.05$ ).

Figure 8 shows the division frequency during 6-h periods over 96 hours after exposure. The post-irradiation cell cycle recovery was the same for the two ionizing radiation qualities. The cell division activity peaked between 24 and 30 h post-irradiation and stopped 60 h after exposure. No significant difference was observed between 40 kVp and 4 MVp (t-test,  $p > 0.05$ ).

Figure 9 shows the frequency of mortality for the 5 Gy irradiated cells at 40 kVp and 4 MVp. We observed that the mortality frequency started to increase between 24 and 30 h post-irradiation for both energies, with  $0.6 \pm 0.58\%$ , and  $0.6 \pm 0.61\%$  of cells that had died, at 40 kVp and 4 MVp, respectively. We observed a maximum in the relative frequency of mortality between 54 and 60 h post-irradiation, with a mortality frequency of  $4.1 \pm 1.92\%$ , and  $5.3 \pm 0.78\%$ , respectively, at 40 kVp and 4 MVp. There was no significant difference between the two radiation qualities (mean  $\pm$  SE, t-test,  $p > 0.05$ ). Also, we found no difference with our experimental protocol in terms of radiation-induced cell death.

#### ***Missegregation events following exposure at two radiation qualities after cell division***

The synchronization of cells at the time of exposure and their ability to divide in the same

proportions for both qualities of radiation allowed the comparative measurement of missegregation events observed 48 h post-irradiation. These missegregation events gave us an indication of the rate of abnormal chromosomal structures formed in each of the studied irradiation conditions. This analysis was performed on the same slides as those used for the  $\gamma$ H2A.X foci scoring and allowed continuity to be maintained between different biological measurements. Around 4100 micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in mono- and binucleated G1 cells were scored per condition. Among the entire population of G1 cells, the frequency of micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in mono- and binucleated cells was not significantly different between 40 kVp and 4 MVp (t-test,  $p > 0.05$ ), with  $8.68 \pm 3.82\%$  and  $11.78 \pm 4.40\%$  of missegregation events (mean  $\pm$ SE from at least 3 replicate experiments), respectively (table 3).

## **Discussion**

The question of the biological effectiveness of X-rays as a function of their energy spectra was raised several decades ago (Brenner & Amols, 1989; Albrecht M Kellerer, 2002; Lehnert et al., 2008, 2006), but is hard to solve definitively. The main reason is that the development of irradiation configurations suitable for a biological comparison is complicated by the combination of strong dosimetric constraints related to low-energy X-rays (Kegel et al., 2007) and the need to carry out biological experiments under relevant and robust conditions. The goal is to evaluate a possible difference in effects on a biological target by ensuring that the absorbed dose at this target is equal. In other words, it is a matter of verifying whether the micro- and nanodosimetric differences between low- and high-energy X-rays are sufficient, by themselves, to lead to different biological consequences. In this complex comparison, the role of the nano- and micro-organization of the biological target of interest such as local or temporal variations in DNA density (chromatin organization and cell cycle, respectively) should not be forgotten. We sought to take into account these considerations in the

experimental development of irradiation and the interpretation of our results. We also maximized the robustness of our biological quantifications by analyzing several thousand cells for each experimental condition and replicate experiments.

In the present work, we observed no difference between the biological endpoint studies with 40 kVp and 220 kVp X-ray spectra. This lack of difference could be explained by the relative similarity of the calculated energy spectra of secondary electrons at the cell monolayer. Indeed, the mean energies of the 2 spectra of secondary electrons were 14 keV and 20 keV and the shape of these spectra is also quite similar. This emphasizes the difficulty of interpreting biological results only on the basis of X-ray irradiation voltage settings or initial photon energies. In our experimental settings, despite a significant difference in energy spectra of photons between 40 kVp and 220 kVp (mean energy of photons at 40 kVp = 25.6 keV; mean energy of photons at 220 kVp = 70.2 keV; figure 2), the calculated energy spectra of secondary electrons at the cell level were close (mean energy of secondary electrons at 40 kVp = 14 keV; mean energy of secondary electrons at 220 kVp = 20 keV; figure 3).

Nevertheless, we report a higher number of DNA double-strand breaks signaled by  $\gamma$ H2A.X for 40 kVp and/or 220 kVp compared to 4 MVp for the highest tested doses of 2 and 5 Gy. Our results seems to indicate that as the energy spectrum of secondary electrons increases, the DNA damage signaled by  $\gamma$ H2A.X decreases and this effect is observable beyond 220 kVp. In other words, the increase in the number of  $\gamma$ H2A.X already reported by Beyreuther *et al.* for low-energy X-rays (Beyreuther, Lessmann, et al., 2009) could still be measured in our case by taking a reference radiation of 4 MVp. In fact, Beyreuther *et al.* studied energy spectra below 40 kVp and reported an increase of the number of  $\gamma$ H2A.X and 53BP1 co-located foci for 10 kVp and 25 kVp compared to 200 kVp, 2 h post-irradiation, at 0.5, 1, 2, 4 and 6 Gy (Beyreuther, Lessmann, et al., 2009). In their experimental conditions, the reported mean energy of secondary electrons at the cell monolayer was significantly lower

for the 2 tested low-energy X-ray conditions (3.7 keV and 7 keV for 10 kVp and 25 kVp, respectively) compared to their reference X-ray voltage of 200 kVp (21.4 keV as mean energy of secondary electrons). This confirms that the analysis of the relation between the mean number of foci and the energy of the X-rays must be made in terms of the energy of secondary electrons at the cell level and not directly on the photon spectra. This is something to keep in mind as the energy of the secondary electrons interacting with cells can be strongly influenced by the experimental set-up.

Furthermore, this effect seems also to be related to the absorbed dose. In our work, the differences between 40/220 kVp and 4 MVp exposures were observed only for absorbed doses higher than or equal to 2 Gy. Beyreuther *et al.* reported the same kind of effect. They did not observe a significant difference 24 h after exposure for doses up to 2 Gy, but they reported an elevated yield for higher doses, (*ie*, 4 Gy and more) between 10/25 kVp and 200 kV. Thus, to observe a differential effect between the radiation qualities, doses above a specific threshold had to be used. This might suggest a joint role of the absorbed doses and secondary electron energy spectra in the ability to observe biological difference in terms of DNA damage signaled by  $\gamma$ H2A.X. This could be consistent with a specific nanodosimetric explanation of these differences. This still needs to be identified, and this hypothesis is currently being explored in our laboratory.

However, there are also several methodological differences between the work of Beyreuther *et al.* and ours that could partly explain the differences in reported results. One of them is that we chose to work on synchronized cells in the G0/G1 phase of the cell cycle at the time of irradiation. We made this choice to generate damage in cells that are mostly in the same state of the cell cycle, with the same amount and spatial distribution of DNA. The other advantage of this choice concerns the study of late DNA damage signaling. There are different repair pathways with their own repair kinetics and risk of failure. Some depend on

the state of the cell cycle in which the damage occurs. Thus the rate of persistent damage can be strongly correlated with the distribution of cells in the cell cycle at the time of irradiation. In the work by Beyreuther *et al.*, we can assume that their cells, at the time of irradiation, were not synchronized. They do not specify their distribution among the different cell cycle phases, nor the phase of the cell cycle of the cells in which they scored DNA damage signaling. It would be particularly interesting to investigate if these experimental differences contribute to the results.

Independently of the measurements of DNA damage signaling, two groups have reported differences in the number of chromosome aberrations in lymphocytes for different X-ray energy spectra. Mestres *et al.* showed that exposure to 30 kVp X-rays resulted in a slight increase in the  $\alpha$  coefficient of dose-effect curves compared to 80 and 120 kVp X rays (Mestres *et al.*, 2011). They also reported that 30 kVp X rays were more efficient in inducing complex aberrations than 120 kVp. Schmid *et al.* observed an increase of the frequency of dicentric per cell after irradiation at 10 kV compared to 60 kV (Schmid, Regulla, Kramer, & Harder, 2002). Once again, these increases in the rate of mostly unstable chromosome aberrations were reported for X-ray irradiation below 40 kVp. It would have been interesting to know the energy spectrum of secondary electrons corresponding to their experimental conditions. However, with our experimental set-up, no difference in the rate of missegregation was measured between 40 kVp and 4 MVp. Thus, the extra 15% of  $\gamma$ H2A.X foci observed 30 min after 2 Gy of 40 kVp X-rays may not be sufficient to generate a detectable increase of the frequency of unstable chromosome aberrations leading to missegregation events. However, one should keep in mind that the geometry and size of lymphocytes are significantly different from those of the HUVECs used in the present study. The nuclei of HUVECs have a volume two times larger than lymphocyte nuclei, which implies a mean density of DNA twice that in the latter. So the impact on DNA damage of the spatial distribution of energy deposits for a

given photon energy spectra may not be the same in lymphocytes and in endothelial cells. In addition to the difference of size, the shape of adherent cells like HUVEC compared to lymphocytes may also be involved in the probability of formation of chromosome aberrations. The involvement of these geometric parameters in differential effects of X-rays as a function of their energy is currently under investigation.

In conclusion, the results presented here indicate that the energy spectrum of secondary electrons seems to be more closely related to the level of DNA damage measured by  $\gamma$ H2A.X than the initial spectrum of photon energy or voltage settings. They confirm the potential joint role of the absorbed doses and secondary electron energy spectra in the ability to observed biological difference in terms of DNA damage signaled by  $\gamma$ H2A.X. This highlights the importance of identifying and characterizing specific nanodosimetric explanations of these differences. However, from a radiation protection point of view, it is important to note that differences in the level of DNA damage observed at doses of 2 Gy and over could not be associated with differential effects on downstream biological endpoints in the range of tested energies under our experimental conditions.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Y. Ristic for performing the radiation exposure with the Elekta Synergy accelerator.

### **Declaration of interest**

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell*. (Garland Science, Ed.) (5th ed.).
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *51*(1938), 786–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Ayscough, K., Hayles, J., MacNeill, S. A., & Nurse, P. (1992). Cold-sensitive mutants of p34cdc2 that suppress a mitotic catastrophe phenotype in fission yeast. *Molecular & General Genetics : MGG*, *232*(3), 344–350. <https://doi.org/10.1007/BF00266236>
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, *421*(6922), 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters*, *490*(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02114-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02114-7)
- Bensasson, R, Land, E.J, Truscott, T. G. (1993). Light and ionizing radiation: generation of excited states and radicals. *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 249–289.
- Bernhardt, P., Friedland, W., Jacob, P., & Paretzke, H. . (2003). Modeling of ultrasoft X-ray induced DNA damage using structured higher order DNA targets. *International Journal of Mass Spectrometry*, *223–224*, 579–597. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00879-5](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00879-5)
- Beyreuther, E., Dörr, W., Lehnert, A., Lessmann, E., & Pawelke, J. (2009). Relative biological effectiveness of 25 and 10 kV X-rays for the induction of chromosomal aberrations in two human mammary epithelial cell lines. *Radiation and Environmental Biophysics*, *48*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s00411-009-0221-4>
- Beyreuther, E., Lessmann, E., Pawelke, J., & Pieck, S. (2009). DNA double-strand break signalling: X-ray energy dependence of residual co-localised foci of gamma-H2AX and 53BP1. *International Journal of Radiation Biology*, *85*(11), 1042–1050. <https://doi.org/10.3109/09553000903232884>
- Bhaumik, S. R., Smith, E., & Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(11), 1008–1016. <https://doi.org/10.1038/nsmb1337>
- Boutros, R., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature Reviews. Cancer*, *7*(7), 495–507. <https://doi.org/10.1038/nrc2169>
- Brenner, D. J., & Amols, H. I. (1989). Enhanced risk from low-energy screen-film mammography X rays. *The British Journal of Radiology*, *62*(742), 910–914. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-62-742-910>
- Bruyère, C., & Meijer, L. (2013). Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(6), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.08.004>
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *131*, 1–87. [https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5_5)

- Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a012559–a012559. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559>
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J.-L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., & Losson, R. (2002). Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 17), 3439–3448. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036713129&partnerID=40&md5=e6626bfd5f65ff1e10a20e9fd6cf2fdc>
- Campisi, J., & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J., Pope, B. D., Ryba, T., Newman, S., ... Narita, M. (2012). Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Molecular Cell*, 47(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- Chowdhury, D., Choi, Y. E., & Brault, M. E. (2013). Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(3), 181–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3523>
- Conradt, B. (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annual Review of Genetics*, 43, 493–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533>
- Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29568–29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>
- Cordoliani, Yves-Sébastien, Foehrenbach, H. (2014). *Radioprotection en milieu médical*. (E. Masson, Ed.) (Third).
- Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H., & Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation Research*, 704(1–3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.006>
- Cristofalo, V. J. (1988). Cellular biomarkers of aging. *Experimental Gerontology*, 23(4–5), 297–307. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90032-0)
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 827–848. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.010>
- Daley, J. M., & Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 34(8), 1380–1388. <https://doi.org/10.1128/MCB.01639-13>
- Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair*, 11(1), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.024>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895–9901. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3036875>
- Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 761–770.



- [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9)
- De, D. D. E. L. a R. (2010). Doses Délivrées Aux Patients En Scanographie. *Health (San Francisco)*.
- Di Micco, R., Sulli, G., Dobрева, M., Lontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., ... d'Adda di Fagagna, F. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*, *13*(3), 292–302. <https://doi.org/10.1038/ncb2170>
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., & Kaina, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, *73*(3), 269–278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525255>
- Dodson, H., Wheatley, S. P., & Morrison, C. G. (2007). Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(3), 364–370. <https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3834>
- Dos Santos, M., Paget, V., Ben Kacem, M., Trompier, F., Benadjaoud, M. A., François, A., ... Milliat, F. (2018). Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response. *International Journal of Radiation Biology*, *94*(6), 597–606. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466205>
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, *567*(1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, *410*(6830), 842–847. <https://doi.org/10.1038/35071124>
- Favaudon, V. (2000). [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiotherapie : Journal de La Societe Francaise de Radiotherapie Oncologique*, *4*(5), 355–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098223>
- Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, kern und zelltheilung. *F.C.W. Vogel, Leipzig*, 419. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=ndYcngEACAAJ&pgis=1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zellsubstanz,+kern+und+zelltheilung#0>
- Galle, P, Paulin, R. (2000). *Biophysique, Radiobiologie, Radiopathologie*. (E. Masson, Ed.).
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell*, *159*(6), 1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.006>
- Gambini, Denis-Jean, Granier, R. (2007). *Manuel pratique de radioprotection*. (Lavoisier, Ed.) (Third).
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, *13*(9), 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Goodhead, D. T. (1988). Spatial and temporal distribution of energy. *Health Physics*, *55*(2), 231–240. <https://doi.org/10.1097/00004032-198808000-00015>
- Goodhead, D. T., & Nikjoo, H. (1990). Current Status of Ultrasoft X Rays and Track Structure Analysis as Tools for Testing and Developing Biophysical Models of Radiation Action. *Radiation Protection Dosimetry*, *31*(1–4), 343–350. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a080694>
- Gorjiara, T., Hill, R., Kuncic, Z., Adamovics, J., Bosi, S., Kim, J.-H., & Baldock, C. (2011). Investigation of radiological properties and water equivalency of PRESAGE<sup>®</sup> dosimeters. *Medical Physics*, *38*(4), 2265–2274. <https://doi.org/10.1118/1.3561509>

- Gräff, J., & Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research*, *192*(1), 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.021>
- Grallert, B., & Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *7*(15), 2315–2320. <https://doi.org/10.4161/cc.6389>
- Gruel, G., Villagrasa, C., Voisin, P., Clairand, I., Benderitter, M., Bottollier-Depois, J.-F., & Barquinero, J. F. (2016). Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition. *PloS One*, *11*(1), e0145786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145786>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, *15*(4), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-Q)
- Hait, W. N., Jin, S., & Yang, J.-M. (2006). A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(7 Pt 1), 1961–1965. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0011>
- Hall, Eric J, Giaccia, A. J. (2011). *Radiobiology for the Radiologist* (Seventh). Lippincott Williams & Wilkins.
- Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P., & Fukasawa, K. (2008). Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene*, *27*(40), 5288–5302. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.161>
- Happel, N., & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, *431*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *37*(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *25*(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J., & Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, *135*(7), 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.044>
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hone, P. A., Edwards, A. A., Lloyd, D. C., & Moquet, J. E. (2005). The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *International Journal of Radiation Biology*, *81*(7), 523–529. <https://doi.org/10.1080/09553000500303591>
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England Journal of Medicine*, *361*(16), 1570–1583. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>
- Hsiao, K.-Y., & Mizzen, C. a. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *Journal of Molecular Cell Biology*, *5*(3), 157–165. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs066>
- Ianzini, F., Bertoldo, A., Kosmacek, E. A., Phillips, S. L., & Mackey, M. A. (2006). Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. *Cancer Cell International*, *6*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-6-11>
- ICRP. (1991). ICRP Publication 60: Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP*, 243575.
- ICRP. (2007). *ICRP publication 103: Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique. Annals of the ICRP* (Vol. 37).

- <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2007.10.004>
- INRS. (2011). *Radioprotection: Secteur Médical, Scanographie*.
- IRSN. (n.d.). La radiothérapie. Retrieved from <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/applications-medicales/radiotherapie/Pages/La-radiotherapie.aspx>
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., ... Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 38(2), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., & Lahav, G. (2012). Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular Cell*, 47(2), 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>
- Kegel, P., Riballo, E., Kühne, M., Jeggo, P. A., & Löbrich, M. (2007). X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair*, 6(11), 1692–1697. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.05.013>
- Kellerer, A. M. (2002). Electron spectra and the RBE of X rays. *Radiation Research*, 158(1), 13–22. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0013:ESATRO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0013:ESATRO]2.0.CO;2)
- Kellerer, A. M., & Rossi, H. H. (1971). RBE and the primary mechanism of radiation action. *Radiation Research*, 47(1), 15–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5559377>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5678–5694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>
- Kliauga, P., & Dvorak, R. (1978). Microdosimetric measurements of ionization by monoenergetic photons. *Radiation Research*, 73(1), 1–20. <https://doi.org/10.2307/3574570>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., & Lavin, M. F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO Journal*, 25(15), 3504–3514. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601231>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiology Review*, 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... Nomenclature Committee on Cell Death 2009. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Krumrey, M., Ulm, G., & Schmid, E. (2004). Dicentric chromosomes in monolayers of human lymphocytes produced by monochromatized synchrotron radiation with photon energies from 1.83 keV to 17.4 keV. *Radiation and Environmental Biophysics*, 43(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00411-004-0232-0>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., ... Peiper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-

- dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019–1031.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 2(20), 3613–3622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877>
- Labattu, M., Guersen, J., Chassin, V., Cassagnes, L., Magnier, F., Donnarieix, D., ... Chabrot, P. (2013). Évaluation de la dose à la peau en radiologie interventionnelle par l'utilisation de films radiochromiques. *Radioprotection*, 48(1), 115–126.  
<https://doi.org/10.1051/radiopro/2012038>
- Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation. *Water*, 3(4), 235–253. <https://doi.org/10.3390/w3010235>
- Lee, J.-H., Goodarzi, A. A., Jeggo, P. A., & Paull, T. T. (2010). 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *The EMBO Journal*, 29(3), 574–585. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.372>
- Lehnert, A., Dörr, W., Lessmann, E., & Pawelke, J. (2008). RBE of 10 kV X rays determined for the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiation Research*, 169(3), 330–336. <https://doi.org/10.1667/RR0874.1>
- Lehnert, A., Lessmann, E., Pawelke, J., & Dörr, W. (2006). RBE of 25 kV X-rays for the survival and induction of micronuclei in the human mammary epithelial cell line MCF-12A. *Radiation and Environmental Biophysics*, 45(4), 253–260.  
<https://doi.org/10.1007/s00411-006-0062-3>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Lisby, M., & Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair*, 8(9), 1068–1076.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.007>
- Loucas, B. D., Eberle, R., Bailey, S. M., & Cornforth, M. N. (2004). Influence of Dose Rate on the Induction of Simple and Complex Chromosome Exchanges by Gamma Rays. *Radiation Research*, 162(4), 339–349. <https://doi.org/10.1667/RR3245>
- Lusser, A., & Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(12), 1192–1200. <https://doi.org/10.1002/bies.10359>
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., ... Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular Cell*, 16(5), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). 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), 781–794.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00671-2)
- Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Ciriollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., & Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 87–93. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.131>
- Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *Journal of Molecular Biology*, 428(9 Pt A), 1659–1680.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.027>
- Mcf-a, C. L., Lehnert, A., & Do, W. (2008). RBE of 10 kV X Rays Determined for the Human Mammary Epithelial of 10 kV X Rays Determined for the Human Mammary Ep-, 336(3), 330–336.
- Mcllwraith, M. J., Mcllwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., &

- West, S. C. (2005). Human DNA polymerase  $\eta$  promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular Cell*, *20*(5), 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001>
- Mestres, M., Benkhaled, L., Caballín, M. R., Barrios, L., Ribas, M., & Barquinero, J.-F. (2011). Induction of incomplete and complex chromosome aberrations by 30 kVp X rays. *Radiation Research*, *175*(2), 201–207. <https://doi.org/10.1667/RR2183.1>
- Mestres, M., Caballín, M. R., Barrios, L., Ribas, M., & Barquinero, J.-F. (2008). RBE of X rays of different energies: a cytogenetic evaluation by FISH. *Radiation Research*, *170*(1), 93–100. <https://doi.org/10.1667/RR1280.1>
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.004>
- Molz, L., Booher, R., Young, P., & Beach, D. (1989). cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes. *Genetics*, *122*(4), 773–782. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90167-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90167-4)
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., ... Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, *113*(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T., & Terrissol, M. (1997). Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International Journal of Radiation Biology*, *71*(5), 467–483. <https://doi.org/10.1080/0955330097143798>
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C., & Carr, A. M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in Cell Biology*, *10*(7), 296–303. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01773-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01773-6)
- Olins, A. L., & Olins, D. E. (1974). Spheroid Chromatin Units (ngr Bodies). *Science*, *183*(4122), 330–332. <https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330>
- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(10), 809–814. <https://doi.org/10.1038/nrm1225>
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., & Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, *4*(4), 281–300. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90149-X)
- Panganiban, R. A. M., & Day, R. M. (2013). Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PloS One*, *8*(10), e78589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078589>
- Panier, S., & Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrm3719>
- Panteleeva, A., Slonina, D., Brankovic, K., Spekl, K., Pawelke, J., Hoinkis, C., & Dörr, W. (2003). Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*, *42*(2), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00411-003-0199-2>
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology: CB*, *10*(15), 886–895. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00610-2)
- Paulsen, R. D., & Cimprich, K. A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair*, *6*(7), 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.015>
- Poludniowski, G., Landry, G., DeBlois, F., Evans, P. M., & Verhaegen, F. (2009). SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes. *Physics in Medicine and Biology*, *54*(19), N433–8. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/19/N01>

- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Zhang, Y.-W., Ji, J. J., Bonner, W. M., Kinders, R. J., ... Pommier, Y. (2010). Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(18), 4532–4542. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0523>
- Rhind, N., & Russell, P. (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 2(Pt 22)), 3889–3896. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058076>
- Rodríguez-Vargas, J. M., Ruiz-Magaña, M. J., Ruiz-Ruiz, C., Majuelos-Melguizo, J., Peralta-Leal, A., Rodríguez, M. I., ... Oliver, F. J. (2012). ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Research*, 22(7), 1181–1198. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.70>
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, a. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Röntgen, W. C. (1896). On a new kind of rays. *Science (New York, N.Y.)*, 3(59), 227–231. <https://doi.org/10.1126/science.3.59.227>
- Rothkamm, K., & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5057–5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>
- Sansare, K., Khanna, V., & Karjodkar, F. (2011). Early victims of X-rays: a tribute and current perception. *Dento Maxillo Facial Radiology*, 40(2), 123–125. <https://doi.org/10.1259/dmfr/73488299>
- Sasaki, M. S., Kobayashi, K., Hieda, K., Yamada, T., Ejima, Y., Maezawa, H., ... Okada, S. (1989). Induction of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes by Monochromatic X-rays of Quantum Energy between 4·8 and 14·6 keV. *International Journal of Radiation Biology*, 56(6), 975–988. <https://doi.org/10.1080/09553008914552431>
- Schmid, E., Regulla, D., Kramer, H.-M., & Harder, D. (2002). The effect of 29 kV X rays on the dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Research*, 158(6), 771–777. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0771:teokxr\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0771:teokxr]2.0.co;2)
- Science & Santé. (2011). Radioactivité: Le double visage de l'atome.
- Sheikh-Bagheri, D., & Rogers, D. W. O. (2002). Monte Carlo calculation of nine megavoltage photon beam spectra using the BEAM code. *Medical Physics*, 29(3), 391–402. <https://doi.org/10.1118/1.1445413>
- Singh, S. K., Szulik, M. W., Ganguly, M., Khutsishvili, I., Stone, M. P., Marky, L. A., & Gold, B. (2011). Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6789–6801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr275>
- Slonina, D., Spekl, K., Panteleeva, A., Brankovic, K., Hoinkis, C., & Dorr, W. (2003). Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*, 42(1), 55–61. <https://doi.org/10.1007/s00411-003-0177-8>
- Smith, G. C., & Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Development*, 13(8), 916–934. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.916>
- Stenerlöv, B., Karlsson, K. H., Cooper, B., & Rydberg, B. (2003). Measurement of prompt DNA double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: results for cells deficient in nonhomologous end joining. *Radiation Research*, 159(4),

- 502–510. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0502:MOPDDS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0502:MOPDDS]2.0.CO;2)
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, *403*(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, *123*(7), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>
- Talbert, P. B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P. L., ... Henikoff, S. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics & Chromatin*, *5*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-7>
- Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., ... Kroemer, G. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology*, *10*(6), 676–687. <https://doi.org/10.1038/ncb1730>
- Thiriet, C., & Hayes, J. J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Molecular Cell*, *18*(6), 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.008>
- Tissandier, G. (1894). *La Nature*.
- Tubiana, M. (2008). *Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection: Bases fondamentales*. (Hermann, Ed.).
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*, *22*(20), 5612–5621. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg541>
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(10), 757–765. <https://doi.org/10.1038/nrm1737>
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in Cell Biology*, *19*(5), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.03.001>
- Vaurijoux, A., Voisin, P., Freneau, A., Barquinero, J. F., & Gruel, G. (2017). Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells. *Mutation Research*, *797–799*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.03.003>
- Verhaegen, F., & Vral, A. (1994). Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low-LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET. *Radiation Research*, *139*(2), 208–213. <https://doi.org/10.2307/3578666>
- Vessoni, A. T., Filippi-Chiela, E. C., Menck, C. F. M., & Lenz, G. (2013). Autophagy and genomic integrity. *Cell Death and Differentiation*, *20*(11), 1444–1454. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.103>
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(6), 385–392. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *35*(C), 95–125. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60611-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60611-X)
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, *171*(4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Williams, G. J., Hammel, M., Radhakrishnan, S. K., Ramsden, D., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2014). Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair*, *17*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.009>

- 
- Willis, N., & Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Division*, *4*, 13. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-13>
- Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., & Dickerson, R. E. (1980). Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, *287*(5784), 755–758. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7432492>
- Wong, J., Armour, E., Kazanzides, P., Iordachita, I., Tryggestad, E., Deng, H., ... DeWeese, T. L. (2008). High-Resolution, Small Animal Radiation Research Platform With X-Ray Tomographic Guidance Capabilities. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *71*(5), 1591–1599. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.04.025>



|                                      |  |  |                                     |
|--------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| High voltage                         | 40 kVp   | 220 kVp  | 4 MVp                               |
| Intensity<br>(mA)                    | 26   | 2.5  | -                                   |
| Filtration                           | 0.8 mm of Be + 1 mm of Al                                  | 0.8 mm of Be + 1 mm of Al  |                                     |
| HVL value                            | 0.852 mm of aluminum                                       | 0.667 mm of copper   | -                                   |
| Irradiation field (cm <sup>2</sup> ) | 8 x 8 cm <sup>2</sup>                                      | 8 x 8 cm <sup>2</sup>  | 30 x 30 cm <sup>2</sup>             |
| Source sample distance<br>(cm)       | 30.5   | 30.5   | 120                                 |
| Dose rate on cells<br>(Gy/min)       | 0.905<br>air kerma   | 1.041<br>air kerma   | 1<br>air kerma                      |
| Effective energy (keV)               | 25.6   | 70.2   |                                     |
| Detector used                        | Ionization chamber<br>TM23342 & EBT3<br>radiochromic films | Ionization chamber PTW<br>0.125 cc3 & EBT3<br>radiochromic films | Ionization chamber PTW<br>0.125 cc3 |

Table 1: Irradiation and dosimetry specifications for 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp irradiations.

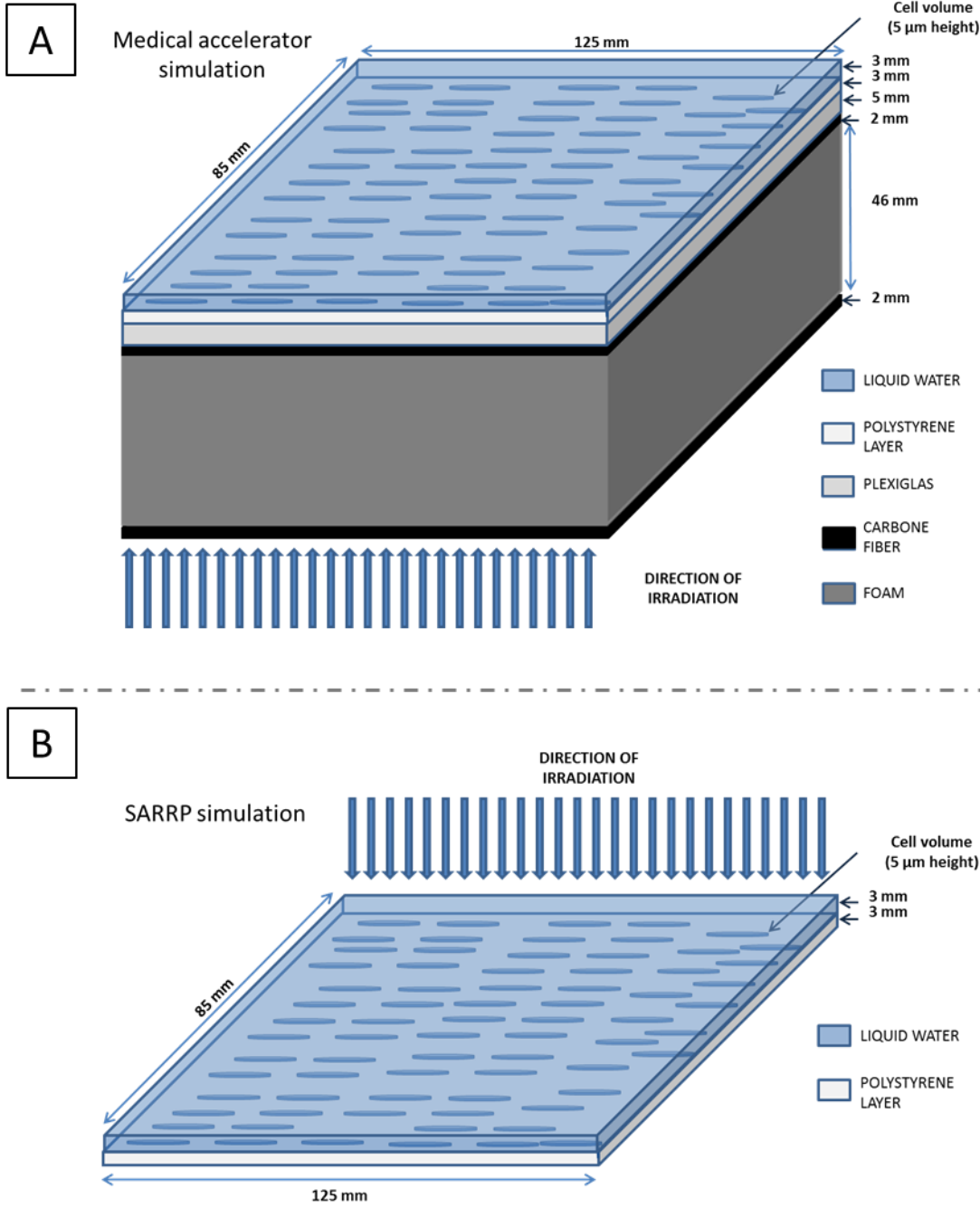


Figure 1: Modelling of irradiation configurations for the medical linear accelerator (panel A) and the SARRP configuration (panel B) used for the Monte Carlo simulations

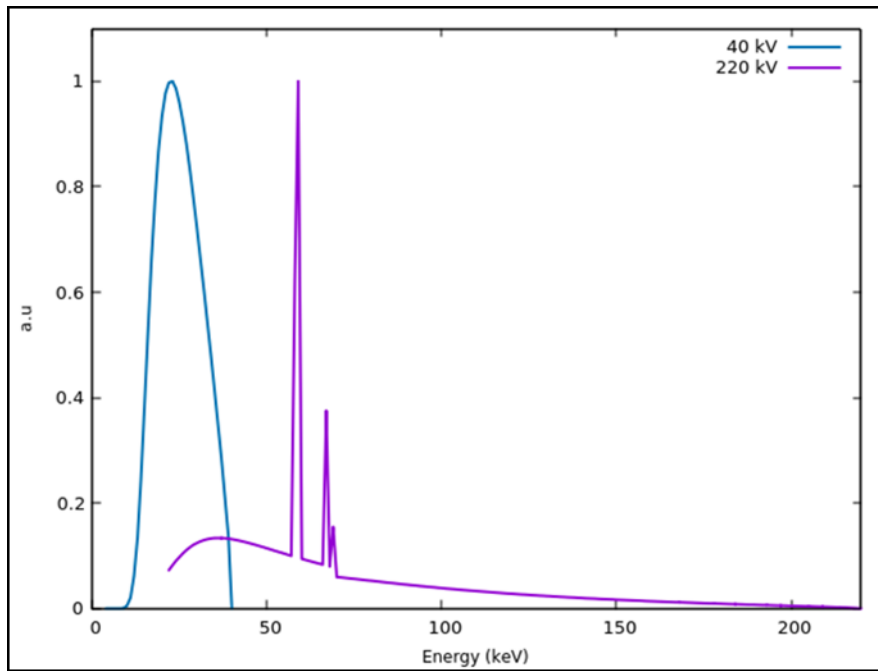


Figure 2: X-ray photon energy spectra obtained at 40 kVp (blue line) and 220 kVp (purple line) using SpekCalc software. Their mean energies are 25.6 keV and 70.2 keV, respectively.

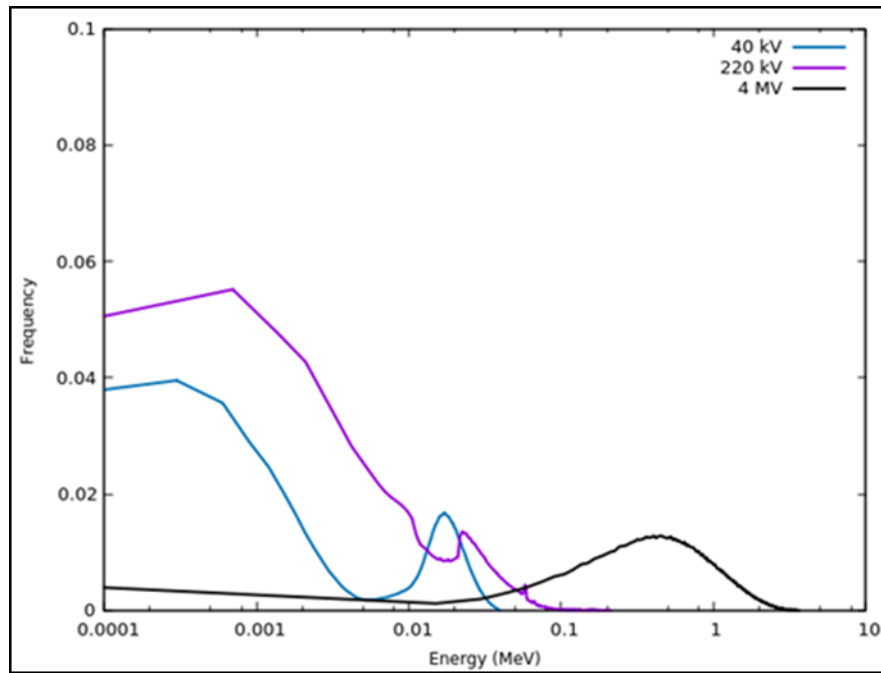


Figure 3: Secondary electron energy spectra at the cell volume level, obtained by Monte Carlo simulations using Geant4 on the SARRP at 40 kVp (blue line) and 220 kVp (purple line) and on the linear accelerator at 4 MVp (black line). Their mean energies are 14 keV, 20 keV and 859 keV, respectively.

---

|         | 40 kVp      | 220 kVp     | 4 MVp       |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| 0.25 Gy | 5.35 ±1.13  | 7.35 ±2.17  | 4.35 ±0.21  |
| 0.5 Gy  | 9.88 ±0.87  | 10.24 ±1.73 | 8.54 ±1.42  |
| 1 Gy    | 18.59 ±0.43 | 18.64 ±2.33 | 16.46 ±1.63 |
| 2 Gy    | 30.30 ±2.21 | 30.59 ±2.96 | 26.42 ±0.87 |

Table 2: Dose response of the mean number ( $\pm$  S.E.) of  $\gamma$ -H2A.X IRIF per nucleus measured in G0/G1 primary HUVECs, 30 min after irradiation at 0.25, 0.5, 1 and 2 Gy. The measured values are given for 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp X-rays. Mean numbers  $\gamma$ -H2A.X IRIF per nucleus were evaluated with image analysis software on around 4200 cells for each dose, and obtained from at least 3 experiments. Significance was tested using Student's t test.

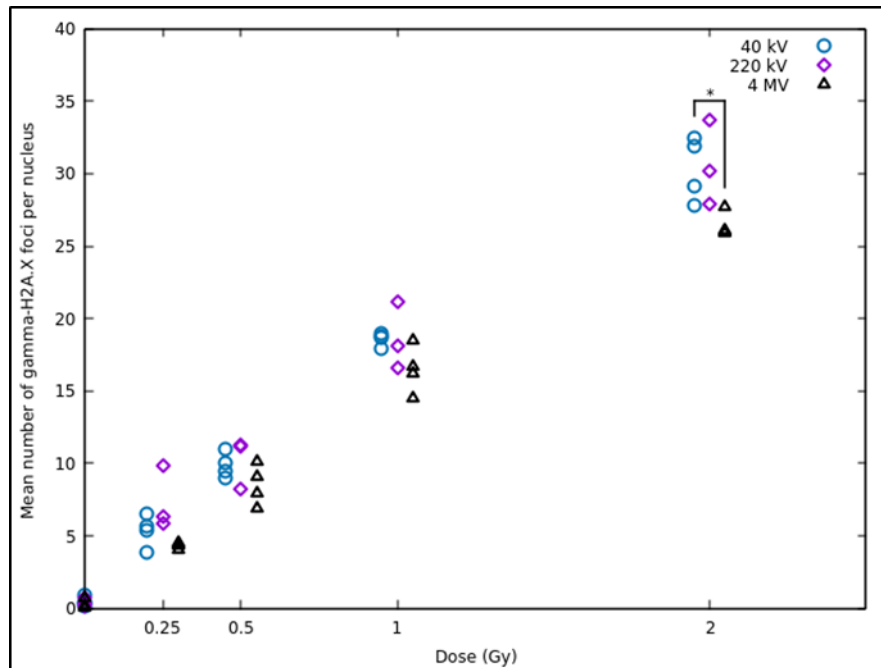


Figure 4: Dose-effect curves derived from the average number of  $\gamma$ -H2A.X IRIF per nucleus measured in G0/G1 primary HUVECs as a function of X-ray energy, 30 min after irradiation. The measured values are given for 40 kVp (blue open circles), 220 kVp (violet open diamonds) and 4 MVp (black open triangles) X-rays. Mean numbers  $\gamma$ -H2A.X IRIF per nucleus were evaluated with image analysis software on around 4200 cells for each dose, and obtained from at least 3 experiments. Significance was tested using Student's t test.

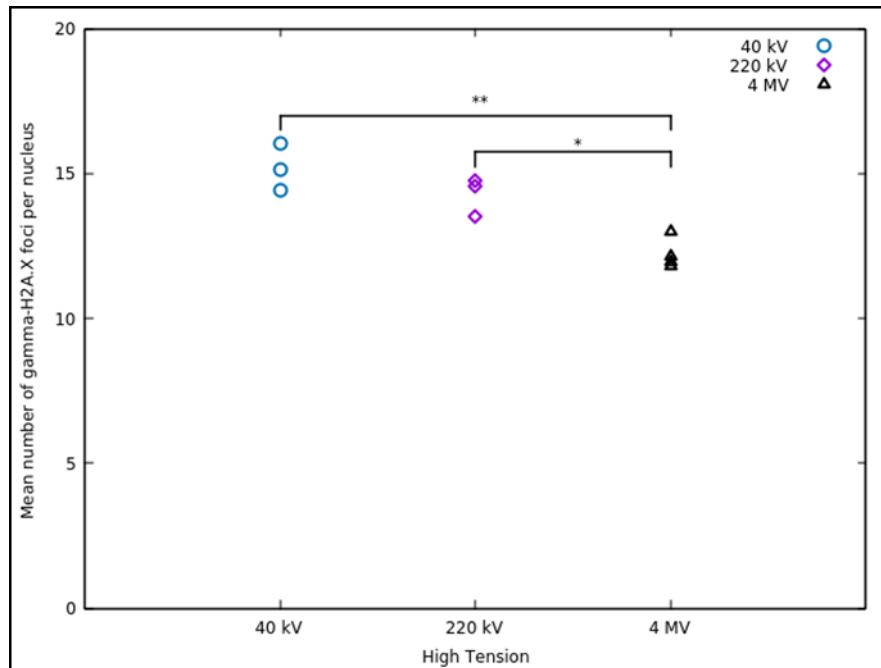
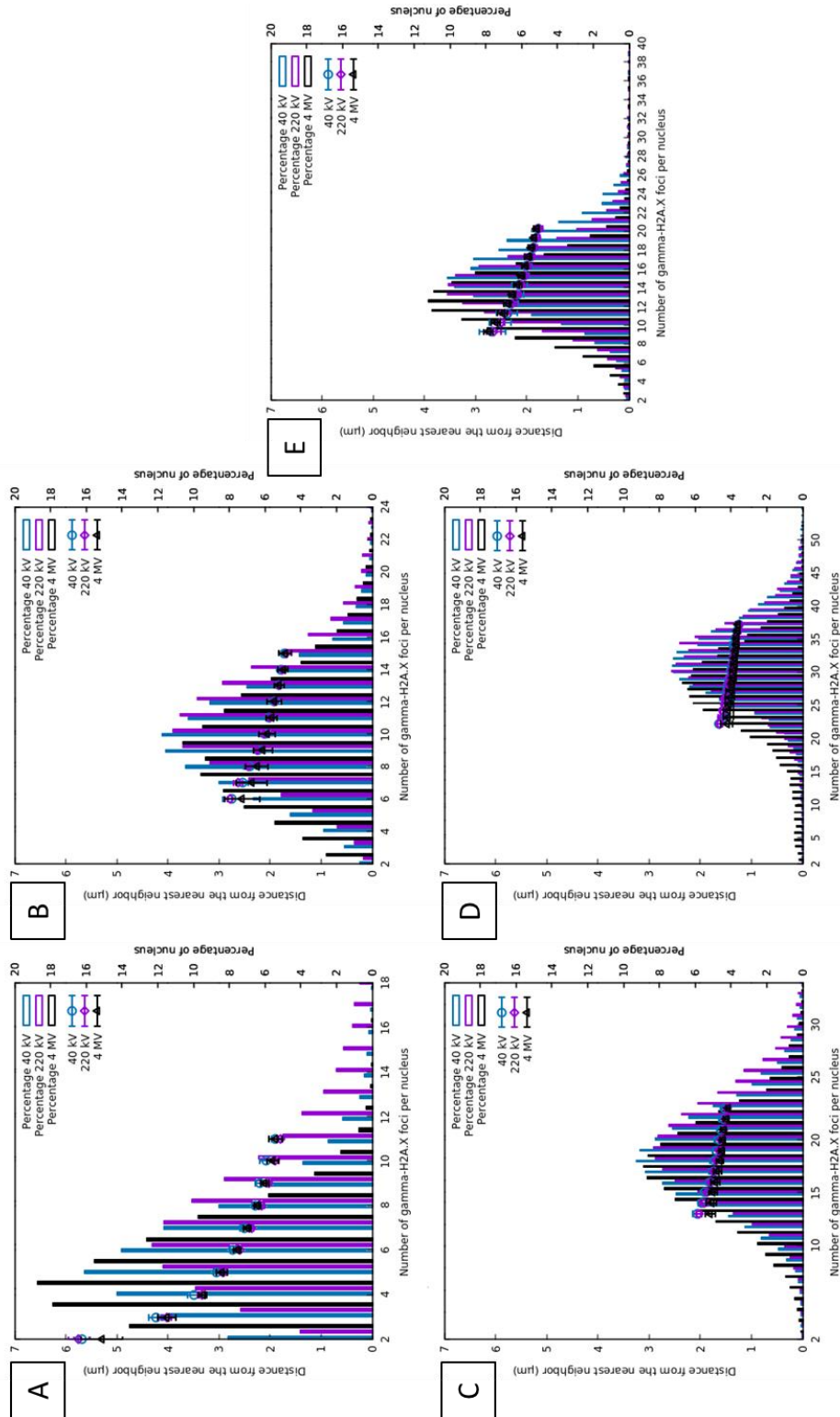


Figure 5: Average number of  $\gamma$ H2A.X foci in G0/G1 primary HUVEC cells ( $\pm$ S.E.) after irradiation by 5 Gy as a function of X-ray energy (blue open circles, violet diamonds and black triangles, respectively 40 kVp, 220 kVp and 4 MVp) 5 h after irradiation. The measured values were evaluated with image analysis software on around 4500 cells for each energy X-ray, corresponding to 3 or 4 experiments.



Figures 6: Distance from the nearest neighbor as a function of the number of  $\gamma$ H2A.X foci per nucleus and the percentage of the number of nuclei and the X-ray energy after irradiation by 0.25, 0.5, 1 and 2 Gy, 30 min post-irradiation (panels A, B, C and D, respectively) and 5 Gy, 5 h post-irradiation (panel E). The measured values ( $\pm$  S.E.) are given for 40 kVp (blue open



circles), 220 kVp (violet open diamonds) and 4 MVp (black open triangles) X-rays. Percentages of the number of nuclei were calculated in around 4400 G0/G1 cells exposed to 40 kVp (blue bar), 220 kVp (violet bar) and 4 MVp (grey bar) X-rays. Values were obtained from at least 3 experiments. Significance was tested using Student's t test.

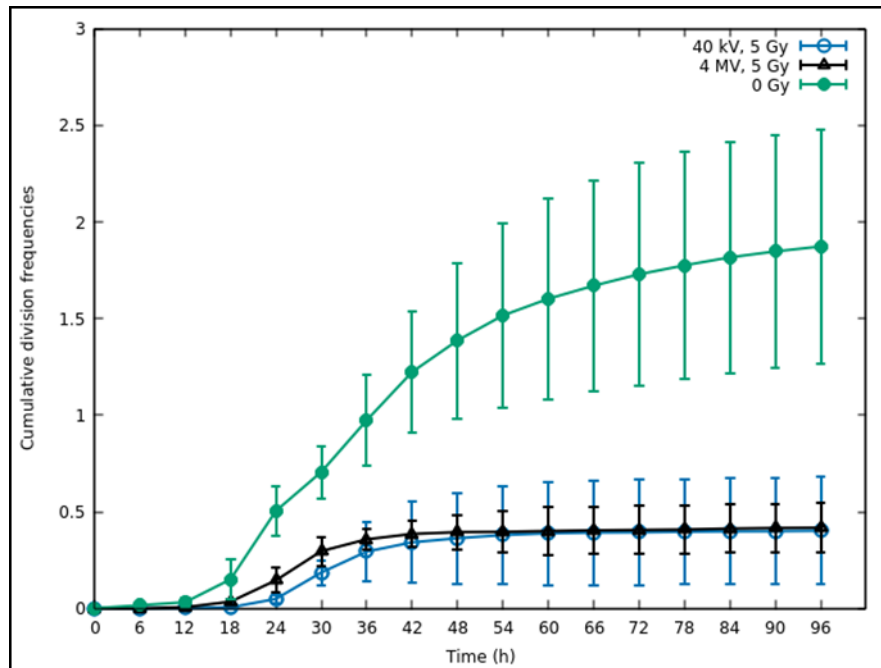


Figure 7: Cumulated number of cell division events ( $\pm$  S.E.) for non-irradiated cells and for cells after 5 Gy irradiation. The results shown were obtained by averaging the data of 8 experiments, for the control condition (green curve), and 4 experiments for the irradiated conditions at 40 kVp and 4 MVp (blue and black curves, respectively), and correspond to the analysis of the cumulative division events, until 96 hours.

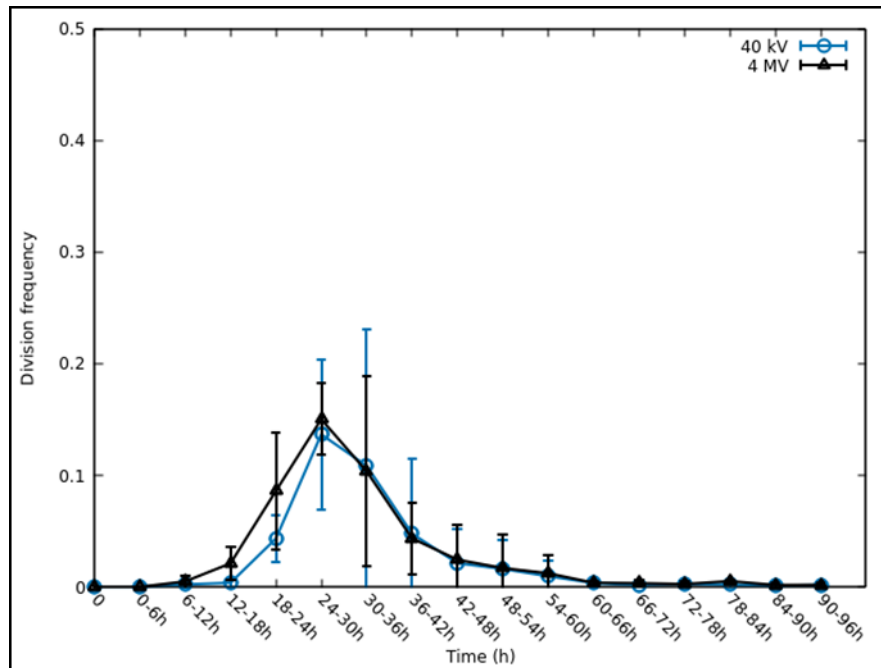


Figure 8: Frequencies of HUVEC mother cells able to form 2 HUVEC daughter cells, called “cell division” events. The results shown were obtained by averaging the data of 4 experiments for the irradiated conditions at 40 kVp and 4 MVp (blue and black curves, respectively) after 5 Gy of irradiation and correspond to the analysis of the division events, during 6-hour periods, over 96 hours after exposure.

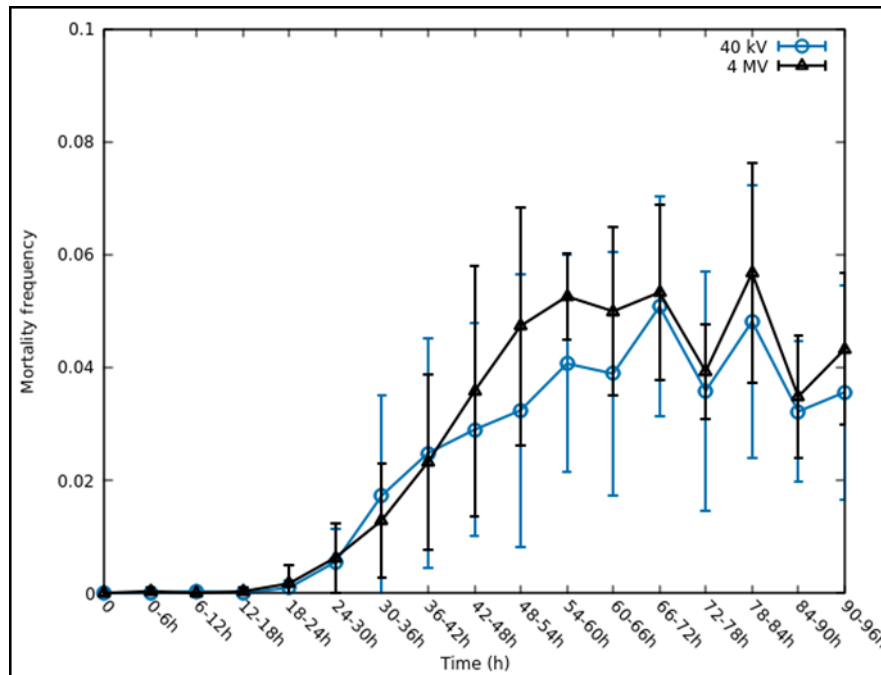


Figure 9: Mortality frequencies ( $\pm$  S.E.) of HUVECs. The results shown were obtained by averaging the data of 4 experiments for the irradiated conditions at 40 kVp and 4 MVp (blue and black curves, respectively) after 5 Gy of irradiation and correspond to the analysis of the frequency of mortality, during 6-hour periods, over 96 hours after exposure.

---

| Radiation quality | All cells      |
|-------------------|----------------|
| Control           | 1.69% ± 1.03%  |
| 40 kVp            | 8.68% ± 3.82%  |
| 4 MVp             | 11.78% ± 4.40% |

Table 3: Frequencies of cells with micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in G0/G1 cells, 48 h after exposure to 5 Gy. Values represent means and S.E. calculated from at least 4 experiments (around 4100 cells per condition). Significant differences were tested with Student's t test.



**Titre:** Etude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies.

**Mots clés:** Energies de rayonnements X, électrons secondaires, dommages de l'ADN, foyers  $\gamma$ H2A.X, devenir cellulaire, anomalies de ségrégation

**Résumé:** Lors d'un examen ou radiologique, des rayonnements X de basse énergie sont utilisés (<100 keV). Pour certains traitements radiologiques, l'énergie utilisée est de plusieurs MeV. La publication 103 de la CIPR considère actuellement que les photons, indépendamment de leur énergie, ont le même facteur de pondération. Cependant, il existe des différences topologiques à l'échelle nanométrique du dépôt d'énergie des rayonnements X en fonction de leur spectre énergétique. En effet, à mesure que l'énergie des photons décroît, la nature de leurs interactions avec la matière vivante se modifie. Pour étudier ces différences, nous avons caractérisé nos conditions d'irradiation en termes d'énergies initiales des photons, mais surtout en termes de spectres d'énergie des électrons secondaires au niveau du volume cellulaire, en utilisant des simulations de Monte Carlo. Nous nous sommes intéressés à la signalisation des dommages de l'ADN en analysant un grand nombre de foyers  $\gamma$ H2A.X après exposition de cellules endothéliales humaines synchronisées en phase G0/G1 à des doses allant de 0,25 à 5 Gy à 40 kV, 220 kV et 4 MV. Le nombre et la distribution spatiale des foyers  $\gamma$ H2A.X ont été explorés. Aussi, nous avons étudié la fréquence de division et de mort cellulaire. Nous avons également étudié le taux d'anomalies de ségrégation après la division cellulaire. Nous avons mis en évidence un nombre plus élevé de cassures double-brin de l'ADN signalisées par  $\gamma$ H2A.X pour 40 kVp et/ou 220 kVp, comparé à 4 MVp pour les plus fortes doses testées de 2 et 5 Gy. Entre 40 et 220 kVp, aucune différence biologique n'a été observée. Ce manque de différence pourrait s'expliquer par la grande similarité des spectres énergétiques des électrons secondaires, au niveau du volume cellulaire. Le spectre d'énergie des électrons secondaires semble être plus étroitement lié au niveau de dommage à l'ADN mesuré par  $\gamma$ H2A.X que le spectre initial des paramètres d'énergie ou de tension des photons. Nos résultats indiquent qu'à mesure que le spectre d'énergie des électrons secondaires augmente, les dommages à l'ADN signalés par  $\gamma$ H2A.X diminuent et cet effet est observable au-delà de 220 kVp.

**Title:** Relation between DNA double-strand breaks and energy spectra of secondary electrons produced by different X-ray energies.

**Keywords :** energy X-rays, secondary electrons, DNA damage,  $\gamma$ H2A.X foci, cell behavior, missegregation

**Abstract:** In a radiological examination, low-energy X-radiation is used (<100 keV). For other radiological procedures, the energy used is several MeV. ICRP in publication 103 has currently considered that photons irrespective of their energy have the same radiation weighting factor. Nevertheless, there are topological differences at the nanoscale of X-ray energy deposition as a function of its energy spectrum, meaning that the different interactions with living matter could vary in biological efficacy. To study these differences, we characterized our irradiation conditions in terms of initial photon energies, but especially in terms of energy spectra of secondary electrons at the cell nucleus level, using Monte Carlo simulations. We evaluated signaling of DNA damage by monitoring a large number of  $\gamma$ H2A.X foci after exposure of G0/G1-phase synchronized human primary endothelial cells at a dose from 0.25 to 5 Gy at 40 kV, 220 kV and 4 MV X-rays. Number and spatial distribution of  $\gamma$ H2A.X foci were explored. In parallel, we investigated cell behavior through cell death and ability of a mother cell to produce two daughter cells. We also studied the missegregation rate after cell division. We report a higher number of DNA double-strand breaks signaled by  $\gamma$ H2A.X for 40 kVp and/or 220 kVp compared to 4 MVp for the highest tested doses of 2 and 5 Gy. We observed no difference between the biological endpoint studies with 40 kVp and 220 kVp X-ray spectra. This lack of difference could be explained by the relative similarity of the calculated energy spectra of secondary electrons at the cell monolayer. The energy spectrum of secondary electrons seems to be more closely related to the level of DNA damage measured by  $\gamma$ H2A.X than the initial spectrum of photon energy or voltage settings. Our results indicate that as the energy spectrum of secondary electrons increases, the DNA damage signaled by  $\gamma$ H2A.X decreases and this effect is observable beyond 220 kVp.