

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

PSE-SANTE/SERAMED/ Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMed)

Intérêt d'implémentation de mesures biologiques multiparamétriques pour prédire le risque de complications aux tissus sains après une radiothérapie

Présentée par

Mariam Ben Kacem

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr. Fabien MILLIAT et encadrée par le Dr. Vincent PAGET

Présentée et soutenue publiquement le 19 février 2020

Devant un jury composé de :

Pr. Olivier LUCIDARME	Président
Pr. Jacques BALOSSO	Rapporteur
Dr. Jean-Pierre POUGET	Rapporteur
Dr. Sylvie CHEVILLARD	Examinatrice
Dr. Yolanda PREZADO	Examinatrice
Dr. Fabien MILLIAT	Directeur de thèse
Dr. Vincent PAGET	Encadrant

“Don’t quit. Suffer now and live the rest of your life as a champion”
Mohamed-Ali

A mes grands parents

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

- Le président : le Professeur **Olivier Lucidarme** pour avoir accepté de participer à ce jury
- Les rapporteurs : le Professeur **Jacques Balosso** et le Docteur **Jean-Pierre Pouget** pour avoir consacré du temps à la lecture ainsi qu'à l'évaluation de ce manuscrit
- Les examinatrices : le Docteur **Yolanda Prezado** mais aussi le Docteur **Sylvie Chevillard** qui a par ailleurs suivi mon travail de thèse en tant qu'experte scientifique

Je remercie également tous les membres du **SERAMED** et **SESANE** de m'avoir accueillie, pour leur bonne humeur et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir autour d'un café, dans un laboratoire ou en se croisant dans les couloirs.

Un immense merci à **Fabien Milliat**, mon directeur de thèse et chef du laboratoire, pour ton accueil, ta disponibilité, tes conseils et ton encadrement. Merci aussi pour ta lumière scientifique et tes critiques toujours constructives qui m'ont fait avancer et prendre du recul sur mes résultats. Merci pour ton humanité et les liens que tu as su créer dans ce grand labo qui ont permis d'avoir une bonne ambiance quotidienne. Je suis ravie d'avoir pu réaliser ma thèse dans ces conditions.

Un grand merci à **Vincent Paget**, mon encadrant, pour tout le temps que tu m'as accordé, pour tes conseils techniques et ton sens critique qui m'ont permis d'affiner mon esprit scientifique. Merci aussi pour l'indépendance que tu as su m'accorder et ta confiance malgré mes maladresses du début (oui faire tomber une pile de T25 avec des cellules ce n'est pas une bonne idée et se tromper de département pour l'entretien non plus...). Tu voulais que je remercie Lonza pour leur rapidité d'envoi (8 mois de retard ce n'est pas si long au final...) mais je ne suis pas sûre que ça en vaille la peine ...

Je souhaite également remercier **Amine Benadjaoud** à qui je dois les magnifiques modélisations de mes résultats. Merci pour le temps que tu m'as accordé, ta pédagogie et ta patience, surtout quand il était question du choix des couleurs pour les graphiques.

Merci à **Marc Benderitter** et **Stéphanie Daré-Doyen** de m'avoir accueillie dans leur service pour réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues du **LRMed** en commençant par **Agnès**, je te remercie pour ta présence, tes conseils avisés et ton soutien, **Olivier** pour la radio en salle de culture qui permettait de rendre le temps moins long, **Christine**, pour ta bonne humeur et tes conseils toujours à pic, **Alain** pour tes remarques inattendues chaque jour ("le visage cadavérique" aura peut-être "meilleure mine" après la soutenance). Merci également à **Valérie et Georges**, le binôme de choc, pour votre joie de vivre, votre gentillesse et votre présence que ce soit pour les manips ou juste pour discuter. Merci d'être vous tout simplement. Sans oublier **Alexandra, Claire** et **Noëlle** pour votre présence et vos animations dans les couloirs tous les matins, **Christelle**, pour ta bonne humeur surtout lorsqu'il s'agit de régler les problèmes du VIP et **Ian** pour ta gentillesse.

Je ne vais pas oublier **Annaïg** et **Alexia** les co-thésardes avec qui j'ai partagé ces 3 dernières années et qui étaient présentes à coup de Nutella et tablettes de Milka, je vous souhaite de bonnes choses pour la suite. Yes we did it ! **Ségolène** et **Clément** vous êtes maintenant au milieu de cette aventure qu'est la thèse ce n'est que le début mais je vous souhaite une bonne fin de thèse avec beaucoup de souffrance mdr (oui je ne pouvais pas être trop gentille ça serait bizarre...). Mention spéciale à **Ségolène**, mini prout-prout, on se refait une bataille de glaçons quand tu veux ! Pour finir, merci aux 3 nouvelles thésardes **Lydia**, **Mallia** et **Sarah** pour les discussions que l'on a pu avoir, particulièrement **Lydia** qui a supporté mes craquages de fin de thèse et qui passait souvent me faire un petit coucou dans mon petit bureau. **Emilie**, mon binôme de bureau, merci pour ton écoute et tes pétages de plomb c'était bien marrant. Merci également aux dernières venues : **Monica** pour ton dynamisme et ton sourire quotidien, **Anne-Charlotte**, bébé prout-prout, avec ses ongles carrés, merci pour ta bonne humeur malgré ta discrétion ; et **Mani-Méga** alias Bollywood pour nos nombreux échanges.

Merci à tous les anciens : **Fredouda**, Titi, Fredi Fred ou fré-dé-ri-que comme tu veux, j'étais obligée de commencer par toi. Merci d'avoir été là pour mes deux premières années elles n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ton aide en 107 avec le nanodrop et tes passages en salle de culture lorsque j'y passais la journée à compter (mais c'est à ton tour maintenant ce n'est que le Karma). Merci pour tous les fous rires et longues discussions existentielles que l'on a pu avoir et promis je ne me prends plus la tête. Merci aux 3 inséparables princesses de l'IRSN : **Khady**, **Clémence** et **Cloé** pour leur soutien inébranlable en cette fin de thèse et les soirées déjantées où on travaillait bien les abdos. La « mystique » **Khady** pour tes délires « On yon n'a marre » (voilà maintenant je l'ai dans la tête) et ta fidélité pour m'accompagner au MFC quand je le voulais. **Clémence**, miss rugby, pour tes chorégraphies sur des musiques Disney pendant les pauses et tu as de la chance je n'arrive pas à trouver d'adjectif approprié pour décrire ta folie illimitée. Et enfin bébé **Cloé**, la sauveuse de tortue, pour tes nombreuses histoires et ta discrétion (pas tant que ça finalement). Merci à **Cyprien** pour tes sujets de discussions variés et ta culture G que j'envie. **Jeremy**, le toulousain, même si je n'arrivais pas toujours à te comprendre à cause de ton accent du sud, j'ai apprécié les échanges qu'on a pu avoir. J'ai aussi amélioré mes réflexes à cause de la balle que tu me lançais tous les jours. Merci à **Mariem**, la matheuse, pour les différents sujets et anecdotes à propos du Maroc et des maths. Merci à **Amélie**, Bicheette, pour les fous rires et j'espère que tout se passe bien en Vendée. Merci à **Nicolas V.** alias poussin pour toutes les discussions plus ou moins sérieuses que l'on a pu avoir. Merci à **Nicolas P.** ou mexicano, **Fazia** qui aime la « mixiture » et enfin la magnifique et magique **Sandra** Beyoncé Licorne Paillette qui éguayait les journées par ses chants mélodieux et qui était maître du temps quand il était question de manger à midi pile attention !

Je tiens également à remercier les membres du **LRAcc** pour m'avoir prêtée un bureau lorsque je n'étais qu'une petite stagiaire sans défense. Merci notamment à **Gaëtan** pour ta disponibilité, **Éric** ou Papa, **Géraldine**, **Juan**, **Aurélie**, **Bruno**, **Delphine**, **Pascale**, **Stéphane**, **Céline L.**, **Céline B.** et **Hayat** pour nos différents échanges et vos nombreux conseils. Merci à **Mamaar** pour tes encouragements. Merci à **Edmond** même si je n'arrivais pas toujours à t'entendre malgré que tu sois à côté de moi (sauf si c'est moi qui vieillis...). Bon courage pour ta thèse tu vas gérer « tout le village compte sur toi ». Enfin merci à maman **Morgane**, la meilleure, tu me faisais peur au début

et je n'osais pas te parler mais finalement tu es trop marrante, même si tu me fais toujours peur quand je fais du sport avec toi (à vos ordres chef!). Merci pour ton œil critique, tes conseils, tes explications simplifiées de la physique et ta disponibilité quand j'avais besoin de me vider la tête.

Merci également aux autres physiciens qui sans eux cette thèse n'aurait pas eu lieu : **Yoann** pour ta patience durant toutes ces heures/journées passées à l'irradiateur pendant au moins 2 ans, j'espère que tu ne m'en veux pas trop. **Miray**, la pipelette d'Alphee, pour ton énergie et ces quelques moments que j'ai pu passer avec toi pendant la dernière année (vive la rédaction !)

Merci à toute l'équipe du GSEA et en particulier à **Delphine, Amandine, Romain, Sébastien** et **Wissem** pour votre disponibilité, vos conseils et vos soucis du détail pour s'occuper de mes animaux.

Une pensée aux membres du LRTox chez qui je passais la plupart de mes pauses café particulièrement **Alice** ma binôme de sport, **Dimitri, Saloua, Céline S., Léo, Victor** (la petite sirène) et **Nicolas** qui va réussir à utiliser le cytomètre plus que moi.

Merci à **Véronique** pour ta disponibilité et ton aide dans les démarches administratives. Merci aussi à **Chloé** pour les madeleines que tu nous apportais et l'animation dans les couloirs, les pots de départ, les anniversaires ...

Merci également à **Celine D.** et **Gauzelin** pour votre soutien qui nous a permis d'organiser de nombreux évènements pour les doctorants de l'IRSN. Merci à **Ekoé** qui était là quand il le fallait même si tu n'étais pas toujours gentil avec moi ! « Mi la dou cloclo esso ? » Merci à **Jacques** et **Ibrahim** les BG libanais, **Flomin, Tiffany, Manon, Dallila, Lucie, Hugues, Kossi,** Alexandre (accessoirement **Benjamin**), **Valentin, Manon B.** et tous les autres. Je ne vous oublie pas.

Une pensée à tous mes amis : **Hanane, Siham, Emeline, Catherine H., Anne-Claire, Catherine N., Yvonne, Faie, Clarisse, Doirfat, Karine, Syra, Lydia, Ines, Shirley, Ramy** et **Pam.**

Un grand merci à **mes parents, mon frère** et **ma sœur** qui m'ont toujours soutenue et compris pendant toutes ces années. C'est en partie grâce à vous que je n'ai jamais lâché.

Un merci aux familles **Nouali** et **Kohler** pour leur soutien, leur confiance en moi (qui m'a mis la pression) et leur conseil.

Enfin, merci aux meilleures : ma jumelle **Mayssa** et ma zougoulou **Zey** pour être toujours là quand il le fallait. Merci d'être vous ♥

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	6
Publications, Communications & Distinction	10
Table des abréviations	13
Table des illustrations.....	16
Table des tableaux	18
Table des équations	19
Avant-propos	20
Introduction	21
Chapitre 1 : Expositions aux rayonnements ionisants.....	22
I. Interaction des rayonnements avec la matière	23
A. Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ?	23
B. Propriétés d'un rayonnement ionisant	23
C. Interaction des photons avec la matière.....	24
II. Radiologie médicale	25
A. Radiologie conventionnelle	26
B. Radiologie interventionnelle.....	27
III. La radiothérapie externe	28
A. Etapes d'un traitement par radiothérapie	28
B. But de la radiothérapie.....	30
C. Principe de fonctionnement d'un accélérateur linéaire médical.....	33
IV. Evolutions en radiothérapie externe	34
A. Amélioration balistique	35
1. La radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT).....	35
2. La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI)	38
3. La radiothérapie stéréotaxique.....	39
B. Evolution des modalités de délivrance de la dose	40
1. Faisceaux d'irradiation statiques et dynamiques	41
2. Radiothérapie guidée par l'image.....	41
3. Fractionnement en radiothérapie	43

4.	Variation du débit de dose	44
	Chapitre 2 : Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	46
I.	Effets physico-chimiques et lésions moléculaires	48
A.	Stress oxydatif et génération d'espèces réactives.....	48
B.	Cible majeure de l'irradiation et du stress oxydatif : la molécule d'ADN	50
1.	Dommages radio-induits au niveau de l'ADN	50
2.	Réponses aux dommages à l'ADN	52
3.	Mécanismes de réparation de l'ADN	53
C.	Autres conséquences du stress oxydatif	57
1.	Lésions des protéines.....	57
2.	Lésions des lipides.....	57
II.	Réponse cellulaire aux rayonnements ionisants.....	58
A.	Changement de l'organisation cellulaire	58
1.	Membrane nucléaire	58
2.	Membrane cellulaire	59
3.	Lysosomes	59
4.	Réticulum endoplasmique et Golgi	60
5.	Mitochondrie	60
B.	Impact sur les fonctions cellulaires	61
1.	Communication cellulaire.....	61
2.	Cycle cellulaire	62
3.	Sénescence répliquative et radio-induite	63
4.	Mortalité cellulaire	66
III.	Effets indésirables au niveau tissulaire	67
A.	Généralités	67
B.	Dommages radio-induits dans la zone thoracique.....	68
1.	Anatomie et physiologie pulmonaire.....	68
2.	Radiopathologie pulmonaire.....	70
C.	Dommages radio-induits dans la zone abdomino-pelvienne.....	74
1.	Anatomie et physiologie intestinale	74
2.	Physiopathologie intestinale radio-induite	76
IV.	Compartiment vasculaire et lésions radio-induites	79

A.	Structure et fonction du réseau vasculaire	79
B.	Rôle de l'endothélium vasculaire	80
1.	Angiogenèse	81
2.	Perméabilité vasculaire	81
3.	Tonus vasculaire	82
4.	Hémostase	82
5.	Inflammation	83
C.	Réponse de l'endothélium à l'irradiation	83
1.	Apoptose endothéliale radio-induite	83
2.	Acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-coagulant	84
3.	Transition endothélio-mésenchymateuse	86
4.	Sénescence endothéliale radio-induite	87
5.	Autres conséquences de l'irradiation sur l'endothélium	87
Chapitre 3 : Evaluation du risque en radiothérapie externe		89
I.	Variation du débit de dose et effets biologiques	91
A.	Impact du débit de dose pour différentes sources d'irradiation	91
1.	Etudes <i>in vitro</i>	91
2.	Etudes <i>in vivo</i>	92
B.	Impact du débit de dose pour des irradiations aux rayons X	93
1.	Etudes <i>in vitro</i>	93
2.	Etudes <i>in vivo</i>	95
II.	Connaissances sur le fractionnement de la dose	95
A.	Etudes <i>in vitro</i>	96
B.	Etudes cliniques	97
III.	Qu'est-ce qu'un risque en radioprotection ?	102
IV.	Prédiction du risque de complications de nos jours	104
A.	Modèle LQ et notion d'EBR	104
B.	Un modèle prédictif ou des modèles prédictifs ?	108
C.	Notion de BED	110
V.	Modèles d'études <i>in vivo</i> en radiobiologie	111
A.	Irradiation en corps entier	112
B.	Irradiation de la zone abdominale	113

C. Irradiation de la zone thoracique	115
Problématique & Objectifs.....	118
Résultats	121
Axe 1 : Impact du débit de dose sur la réponse biologique.....	122
Article 1: Variation of 4 MV X-rays dose rate strongly impacts biological response both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	122
Données complémentaires : <i>In vitro</i> , sur les HMVEC-L, l'impact du débit de dose sur les effets biologiques est moins important.	155
Axe 2 : Impact du fractionnement de la dose sur la réponse biologique	162
Discussion & Perspectives	182
Conclusion générale	211
Annexes.....	213
Annexe 1 : Liste des 44 gènes « signature sénescence ».....	214
Annexe 2 : Morphologie cellulaire des HUVECs à J3, J7 et J21 suite à une irradiation à deux débits de dose.....	215
Annexe 3 : Morphologie cellulaire des HUVECs à J7 suite à une irradiation fractionnée à deux débits de dose.....	216
Annexe 4 : 1 ^{er} article supplémentaire « <i>Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness : comparison between 220 kV and 4 MV</i> »	217
Annexe 5 : 2 ^{ème} article supplémentaire « <i>Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response</i> »	237
Bibliographie.....	250

Publications, Communications & Distinction

Publications

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, M. Dos Santos, F. Soysouvanh, V. Buard, G. Tarlet, B. Le Guen, A. François, O. Guipaud, F. Milliat and V. Paget. *Variation of 4 MV X-ray dose rate strongly impacts biological response both in vitro and in vivo*. En révision, Scientific Reports.

V. Paget, **M. Ben Kacem**, M. Dos Santos, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, V. Buard, G. Tarlet, A. Vaurijoux, G. Gruel, A. François, O. Guipaud and F. Milliat. *Multi-parametric radiobiological assays show that variation of X-rays energy strongly impacts the RBE: comparison between 220 KV and 4 MV*. Scientific Report, 9:1, 14328, 2019.

M. Dos Santos, V. Paget, **M. Ben Kacem**, F. Trompier, M. Benadjaoud, A. François, O. Guipaud, M. Benderitter & F. Milliat. *Importance of dosimetry formalism for cell irradiations on a low X-rays facility and consequences for the biological response*. International Journal of Radiation Biology, 94:6, pages 597-606, 2018.

Communications orales

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget. *Intérêt d'implémentation de mesures multiparamétriques radio-biologiques pour mieux prédire les risques de complications aux tissus sains après radiothérapie*, **SFRP 2019**, Juin 2019, La Rochelle, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, G. Tarlet, V. Buard, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Intérêt d'implémentation de mesures multiparamétriques radio-biologiques pour mieux prédire les risques de complications aux tissus sains après radiothérapie*, **Journées des thèses de l'IRSN**, Avril 2019, La Grande Motte, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget. *Intérêt d'implémentation de mesures multiparamétriques radio-biologiques pour mieux prédire les risques de complications aux tissus sains après radiothérapie*, **SFRO 2018**, Octobre 2018, Paris, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget. *Use of molecular and functional measures of Relative Biological Effectiveness to predict the risk of radiotherapy - Application to high dose per fraction and high dose rate*, **Journées des thèses de l'école doctorale**, Mai 2018, Paris, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, G. Tarlet, V. Buard, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Utilisation de mesures d'Efficacité Biologique Relative moléculaires et fonctionnelles pour prédire le risque après radiothérapie – Application aux fortes doses par fraction et aux forts débits de dose*, **Journées des thèses de l'IRSN**, Avril 2018, Annecy, France.

Communications affichées

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Multiparametric radiobiological parameters implementation to predict radiation-induced adverse effects*. Août 2019, **ICRR**, Manchester, Royaume-Uni.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Multiparametric radiobiological parameters implementation to predict radiation-induced adverse effects*. **Journées des thèses de l'école doctorale**, Mai 2019, Paris, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, M. Dos Santos, G. Tarlet, V. Buard, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Multiparametric radiobiological parameters implementation to predict radiation-induced side effects (PO-1065)*, Avril 2019, **ESTRO 38**, Milan, Italie

M. Dos Santos, V. Paget, **M. Ben Kacem**, F. Trompier, M. Benadjaoud, A. François, O. Guipaud, M. Benderitter, F. Milliat, *Importance of dosimetry formalism for cells irradiation on a SARRP and consequences for RBE (PO-0777)*, Mai 2017, **ESTRO 36**, Vienne, Autriche

V. Paget, **M. Ben Kacem**, M. Dos Santos, F. Soysouvanh, M. Benadjaoud, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat, *Prediction of irradiated cells fate: the necessity to revisit RBE by multiparametric investigations (PO-0956)*, Mai 2017, **ESTRO 36**, Vienne, Autriche

M. Ben Kacem, F. Soysouvanh, G. Tarlet, V. Buard, M. Benadjaoud, A. François, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Use of molecular and functional measures of Relative Biological Effectiveness to predict the risk of radiotherapy - Application to high dose per fraction and high dose rate*, **Journées des thèses de l'école doctorale**, Mai 2017, Paris, France.

V. Paget, **M. Ben Kacem**, M. Dos Santos, F. Soysouvanh, M. Benadjaoud, A. François, O. Guipaud, F. Milliat, *55-p Low and high energy X rays lead to different levels of senescent phenotype on HUVECs*, Mai 2017, **International Cell Senescence Conference**, Paris, France.

M. Ben Kacem, M. Benadjaoud, F. Soysouvanh, G. Tarlet, V. Buard, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat & V. Paget, *Utilisation de mesures d'Efficacité Biologique Relative moléculaires et fonctionnelles pour prédire le risque après radiothérapie – Application aux fortes doses par fraction et aux forts débits de dose*, **Journées des thèses de l'IRSN**, Avril 2017, Carry-le-Rouet, France.

Distinction

Lauréate en équipe pluridisciplinaire du **concours de valorisation et d'innovation scientifique**, Séminaires des Doctoriales de Sorbonne Université 2019, Sèvre, France.

Table des abréviations

2D-RT	Radiothérapie classique en deux dimensions	CTV	<i>Clinical Target Volume</i>
3D-CRT	Radiothérapie conformationnelle en trois dimensions	DDR	<i>DNA Damage Response</i>
9L	Cellules cancéreuses de rats	DSB	<i>Double Strand Break</i>
A549	Cellules cancéreuses pulmonaires humaines	DU145	Cellules cancéreuses de prostate
ADN	Acide désoxyribonucléique	EBR	Efficacité Biologique Relative
AECII	<i>Type II Alveolar Cells</i>	EMT	<i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i>
Alt-EJ	<i>Alternative End joining</i>	EndoMT	<i>Endothelial-to-Mesenchymal Transition</i>
Ang	angiopoïétines	ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
ARF	<i>Alternate-Reading Frame protein</i>	FaDuDD	Cellules de carcinome de la tête et du cou
ARN	Acide ribonucléique	FF	<i>Flattering Filter</i>
ASN	Autorité de sûreté nucléaire	FFF	<i>Flattering Filter Free</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia-Mutated</i>	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
ATR	<i>ATM-Rad3-related</i>	GTV	<i>Gross Tumor Volume</i>
BED	<i>Biologically Effective Dose</i>	Gy	Gray
BER	<i>Base Excision Repair</i>	H460	Cellules NSCLC humaines
BEV	<i>Beam Eye View</i> , logiciel de visualisation	HDM	Histogramme Dose Masse
C12FDG	<i>5-Dodecanoylamino fluorescein di-β-D-galactopyranoside</i>	HDV	Histogramme Dose Volume
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>	HIMECs	<i>Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells</i>
CBC	<i>Crypt-Based columnar Cells</i>	HIMECs	<i>Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells</i>
CBCT	<i>Cone Beam Computerized Tomography</i>	HMVEC-C	<i>Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>	HMVEC-D	<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives	HPAEC	<i>Human Pulmonary Artery Endothelial Cells</i>
CIPR	Commission Internationale de Protection Radiologique	HR	<i>Homologous Recombinaison</i>
CKI	<i>CDK Inhibitor</i>	HMVEC-L	<i>Human Lung Microvascular Vein Endothelial Cells</i>
CML	Cellules Musculaires Lisses	HUAEC	<i>Human Umbilical Artery Endothelial Cells</i>
CMLV	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires	HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>	IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
CRE	<i>Chronic Radiation Enteritis</i>	ICAM	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i>
CRP	<i>Ceramide Rich Platform</i>	ICAM-1	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule 1</i>
CSFs	<i>Colony-Stimulating Factors</i>	ICRU	<i>International Commission on Radiation Units and Measurements</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>	IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>

IGRT	<i>Image Guided Radiation Therap</i>	PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
IL-6	Interleukine 6	PE	Plating Efficiency
IL-8	Interleukine 8	PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
IMAT	<i>Intensity Modulated Arc Therap</i>	PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
IMRT	<i>Intensity Modulated Radiotherapy</i>	PNK	<i>Polynucleotide Kinase</i>
INCa	Institut national du cancer	pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
INRS	Institut national de recherche et de sécurité	PTV	<i>Planning Target Volume</i>
IPF	<i>Idiopathic Pulmonary Fibrosis</i>	RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i>
IRIF	<i>Ionizing Radiation Induced Foci</i>	RCMI	Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité
IRSN	Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire	RE	Réticulum endoplasmique
ITV	<i>Internal Target Volume</i>	RIBE	<i>Radiation-Induced Bystander Effect</i>
IV	<i>Irradiated Volume</i>	RILD	<i>Radiation-Induced Lung Disease</i>
keV	kilo-électronVolt	RIPF	<i>Radiation-induced pulmonary fibrosis</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>	RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>	ROS	<i>Reactive Oxygène Species</i>
Linac	<i>Linear Accelerator</i>	ROSIRIS	Radiobiologie des systèmes intégrés pour l'optimisation des traitements utilisant des rayonnements ionisants et évaluation du risque associé
LQ	Linéaire Quadratique	RT	Radiothérapie
MCF-7	Cellules d'adénocarcinome de sein humain	SABR	<i>Stereotactic Ablative Radiation Therapy</i>
MEC	Matrice extracellulaire	SAI	Syndrome Aigu d'Irradiation
MeV	Méga-électronVolt	SARRP	<i>Small Animal Radiation Research Platform</i>
MMP10	<i>Matrix Metalloproteinase 10</i>	SASP	<i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i>
MMP3	<i>Matrix Metalloproteinase 3</i>	SBRT	<i>Stereotactic Body Radiotherapy</i>
MMPs	Métalloprotéinases	SCLC	<i>Small Cell Lung Carcinoma</i>
MV	MégaVolt	SFRO	Société Française de radiothérapie Oncologique
NCIH460	Cellules de NSCLC	SGI	Syndrome gastro-Intestinal
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>	SMS	<i>Senescence Messaging Secretome</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End-Joining</i>	SOBP	<i>Spread-Out Bragg Peak</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>	SRS	<i>Stereotactic Radiosurgery</i>
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Carcinoma</i>	SRT	<i>Stereotactic Radiotherapy</i>
NTCP	<i>Normal Tissue Complication Probability</i>	SSB	<i>Single Strand Break</i>
OARs	<i>Organs At Risk</i>	TBI	<i>Total Body Irradiation</i>
PAEC	<i>Pulmonary Artery Endothelial Cells</i>	TCP	<i>Tumor Control Probability</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>	TCP	<i>Transcription Coupled Factor</i>
PARP	<i>Poly (ADP-Ribose) Polymerase</i>	TEL	Transfert d'énergie linéique

TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TPS	<i>Treatment Planning System</i>
TV	<i>Treated Volume, volume traité</i>
UNSCEAR	<i>United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation</i>
UPMC	Université Pierre et Marie Curie
V79	Cellules de hamster chinois
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth factor</i>
XRCC1	<i>X-ray Repair Cross Complementing protein 1</i>

Table des illustrations

Figure 1 : Spectre des rayonnements électromagnétiques en fonction de leurs longueurs d'onde	23
Figure 2 : Différents pouvoirs de pénétration en fonction du type de rayonnement	24
Figure 3 : Schéma récapitulatif des différents modes d'interaction des photons X et γ avec la matière	25
Figure 4 : Principe de la radiographie.....	26
Figure 5 : Principe de la scannographie	27
Figure 6 : Les volumes d'intérêt pour un traitement en radiothérapie	29
Figure 7 : Notion de balance Bénéfice/Risque en radiothérapie	31
Figure 8 : Concept de fenêtre thérapeutique	31
Figure 9 : Histogramme dose volume (HDV) et histogramme dose masse (HDM) de la zone thoracique dans le cadre d'une irradiation d'une tumeur solide centrale dans le poumon droit	33
Figure 10 : Principe de fonctionnement d'un accélérateur linéaire utilisé en clinique	34
Figure 11 : Principe de filtration d'un accélérateur linéaire médical par un cône égalisateur.....	34
Figure 12 : Répartition des traitements par radiothérapie selon la technique d'irradiation utilisée en 2011.....	35
Figure 13 : Courbes isodose pour un traitement par radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT) d'un cancer de la prostate	37
Figure 14 : Principe de fonctionnement d'un collimateur multilames	37
Figure 15 : Courbes isodose pour un traitement par radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) d'un cancer de la prostate.....	38
Figure 16 : Courbes isodose pour un traitement par radiothérapie stéréotaxique (SBRT) d'un cancer de la prostate.....	40
Figure 17 : Méthodes actives pour la radiothérapie guidée par l'image	43
Figure 18 : Apparition des effets biologiques radio-induits en fonction du temps	47
Figure 19 : Ionisation et excitation des molécules d'eau suite à l'irradiation	49
Figure 20 : Schéma récapitulatif des dommages radio-induits au niveau de l'ADN	51
Figure 21 : Transducteurs ATM et ATR.....	53
Figure 22 : Mécanisme de la réparation par excision de base (BER)	54
Figure 23 : Mécanisme de recombinaison homologue (HR) et jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)	56
Figure 24 : Modifications radio-induites de la structure de l'appareil de Golgi	60
Figure 25 : Altération de la structure mitochondriale suite à une irradiation	61
Figure 26 : Régulateurs du cycle cellulaire	62
Figure 27 : Contrôle de la sénescence par les voies p53 et p16-pRB.....	64
Figure 28 : Marquage au X-gal de cellules endothéliales humaines 7 jours après irradiation au LINAC	65
Figure 29 : Répartition du nombre de patients traités par radiothérapie en fonction de la localisation tumorale en 2017.....	68
Figure 30 : Schéma de l'organisation du poumon.....	69
Figure 31 : Schéma d'une alvéole pulmonaire	70

Figure 32 : Réponse radio-induite du parenchyme pulmonaire	72
Figure 33 : Mécanismes du remodelage pulmonaire au cours de la fibrose	73
Figure 34 : Organisation fonctionnelle de l'intestin grêle chez l'homme	75
Figure 35 : Mécanismes de réponses à l'irradiation au niveau intestinal.....	77
Figure 36 : Structure d'une artère.....	80
Figure 37 : Principales fonctions de l'endothélium vasculaire.....	81
Figure 38 : Principaux effets de l'irradiation sur le compartiment endothélial.....	85
Figure 39 : Récapitulatif des études <i>in vitro</i> réalisées sur l'étude des effets biologiques dus à une variation du débit de dose pour des rayons X.....	94
Figure 40 : Effets stochastiques et déterministes	103
Figure 41 : Principe du test de clonogénicité	104
Figure 42 : Représentation du modèle linéaire.....	105
Figure 43 : Représentation du modèle quadratique	105
Figure 44 : Représentation du modèle LQ	106
Figure 45 : Rapports α/β identiques pour deux lignées de radiosensibilités différentes	106
Figure 46 : Concept d'EBR et son application pour la comparaison de différents types de rayonnements	107
Figure 47 : Photos de l'irradiation en TBI chez la souris C57BL/6J à l'aide d'un accélérateur linéaire médical (LINAC)	112
Figure 48 : Illustrations pour les irradiations abdominales au niveau de l'anse intestinale extériorisée chez la souris C57BL/6J	114
Figure 49 : Photos de l'irradiation en thorax entier chez la souris C57BL/6J à l'aide d'un accélérateur linéaire médical (LINAC).....	116
Figure 50 : Photos de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris C57BL/6J à l'aide du SARRP	117
Figure 51 : Récapitulatif de notre étude sur l'impact du débit de dose sur la réponse radio-induite <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	192
Figure 52 : Récapitulatif de notre étude sur l'impact du fractionnement de la dose <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	198
Figure 53 : Perspectives du modèle prédictif des effets radio-induits des nouvelles modalités d'irradiation aux rayons X	200
Figure 54 : Distribution du dépôt de la dose en fonction de la distance parcourue	205

Table des tableaux

Tableau I : Doses de tolérance et OARs	32
Tableau II : Nombre et spécificité des dommages radio-induits à l'ADN.....	52
Tableau III : Principales études réalisées <i>in vitro</i> sur le fractionnement de la dose.....	97
Tableau IV : Etudes cliniques en phase II	99
Tableau V : Etudes cliniques en phase III pour le cancer de la prostate et une étude rétrospective pour le cancer du sein	101

Table des équations

Équation 1 : Facteur G	109
Équation 2 : Modèle TCP	110
Équation 3 : Modèle NTCP de Lyman.....	110
Équation 4 : Concept de BED.....	111
Équation 5 : Formule de BED selon Fowler.	111

Avant-propos

Wilhelm Röntgen, physicien allemand, découvre les rayons X en 1895. Cette découverte est l'initiatrice d'une évolution constante des techniques médicales pour la prise en charge des patients atteints de cancers. Cette avancée amène à l'apparition des premiers accélérateurs linéaires médicaux à la fin des années 1940. Au cours des dernières décennies, les connaissances sur les effets biologiques des rayonnements ionisants n'ont cessé de croître. Elles ont permis une amélioration des performances de la radiothérapie en termes de contrôle tumoral tout en réduisant la toxicité aux tissus sains. Les recherches se poursuivent pour améliorer les connaissances des effets radio-induits dans le domaine médical afin de permettre par la suite une amélioration de l'index thérapeutique (notion de rapport bénéfice/risque). C'est dans ce cadre que s'insèrent les recherches du Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMed) au sein de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN). Une des missions du laboratoire est d'acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes biologiques d'initiation et de progression des lésions sur les tissus sains. En particulier, le laboratoire s'intéresse aux lésions résultant d'expositions aux rayonnements ionisants dans le domaine médical à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. L'objectif est de mieux prédire les risques de complications aux tissus sains, mieux les comprendre et les traiter. Ainsi les travaux du laboratoire s'intègrent dans un programme de recherche, lancé en 2009 par l'IRSN, appelé ROSIRIS (Radiobiologie des systèmes intégrés pour l'optimisation des traitements utilisant des rayonnements ionisants et évaluation du risque associé). La finalité de ce programme est de mieux identifier et prévenir les effets secondaires liés à une radiothérapie.

Ce travail de thèse, faisant partie intégrante du programme ROSIRIS, a pour objectif d'apporter des éléments de réponse sur l'impact des nouvelles technologies et pratiques cliniques utilisées au cours d'un traitement par radiothérapie, ceci dans le but d'aider à une meilleure prédiction des effets biologiques. Une première partie se focalise sur l'impact d'une variation du débit de dose en tant que preuve de concept. Le deuxième axe de recherche se concentre sur l'étude de l'impact d'un fractionnement de la dose en lien avec les nouveaux protocoles d'hypofractionnement utilisés en clinique.

Introduction

Chapitre 1 : Expositions aux rayonnements ionisants

I. Interaction des rayonnements avec la matière

A. Qu'est-ce qu'un rayonnement ionisant ?

La radioactivité est un phénomène physique lié à l'instabilité de certains atomes, appelés « radionucléides », qui composent la matière. Un rayonnement correspond à un transfert d'énergie émise par une source radioactive naturelle ou artificielle sous forme d'ondes particulaires ou électromagnétiques. Un rayonnement est ionisant lorsqu'il est susceptible d'arracher un ou plusieurs électrons du cortège électronique des atomes qui composent la matière avec lequel il interagit. Il existe différents types de rayonnements ionisants (RI). D'une part, les rayonnements particulaires directement ionisants sont constitués de particules électriquement chargées (α , β , protons) d'énergie suffisante pour produire des ions par interaction avec la matière. D'autre part, les rayonnements électromagnétiques indirectement ionisants sont, quant à eux, constitués de particules non chargées électriquement (neutrons, photons : rayons X, γ) dont l'énergie est suffisante pour produire, selon plusieurs types d'interactions, une ionisation de la matière (Figure 1).

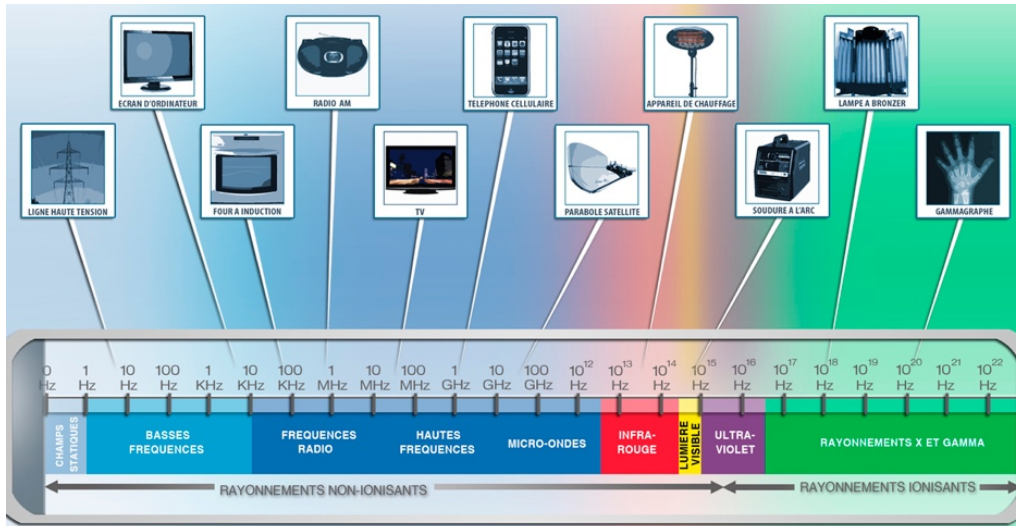


Figure 1 : Spectre des rayonnements électromagnétiques en fonction de leurs longueurs d'onde (IRSN)

B. Propriétés d'un rayonnement ionisant

Les rayonnements interagissent avec la matière en cédant toute, ou en partie, leur énergie aux atomes qui composent le milieu qu'ils traversent par l'intermédiaire de différentes interactions qui seront développées dans la partie suivante. Le Transfert d'Énergie Linéique

(TEL ou LET : *Linear Energy Transfer*) correspond à la capacité d'un RI à traverser la matière et à déposer son énergie (Figure 2). Sa valeur dépend de la masse volumique du milieu traversé, de l'énergie et la nature du rayonnement. Le TEL permet de mesurer la quantité d'énergie cédée par unité de distance parcourue dans la matière et s'exprime en $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Ainsi, plus la valeur de TEL est faible, plus le rayonnement dépose son énergie sur une longue distance et possède alors une grande capacité de pénétration dans la matière. On distingue les rayonnements de fort TEL et les rayonnements de faible TEL. Le pouvoir de pénétration dépend de l'énergie émise en fonction du rayonnement considéré.

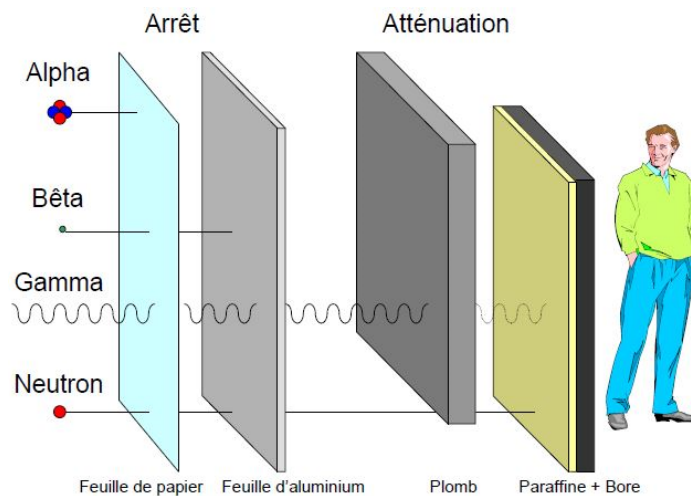


Figure 2 : Différents pouvoirs de pénétration en fonction du type de rayonnement
(Ammerich, 2015).

C. Interaction des photons avec la matière

Les rayons X et γ émettent des photons qui interagissent avec la matière selon plusieurs processus. D'une part, les photons peuvent interagir avec des électrons par effet photoélectrique, effet Compton ou par diffusion de Thomson et Rayleigh. D'autre part l'interaction peut se faire avec des noyaux par production de paires, réaction photonucléaire ou diffusion Thomson (Gambini et al., 2007).

Lors d'un effet photoélectrique, un photon incident interagit avec un électron du cortège électronique de l'atome en émettant un photoélectron qui va perdre son énergie dans le milieu traversé (Figure 3). Ce phénomène est à l'origine des lésions radio-induites. Il se produit uniquement si l'énergie du photon incident est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron.

L'effet Compton se caractérise quant à lui par la collision d'un photon incident avec un électron ayant une faible énergie de liaison. L'électron est alors arraché du cortège électronique et le photon est dévié en perdant une partie de son énergie dans le milieu traversé (Figure 3).

Les photons peuvent également interagir avec une perte d'énergie quasi nulle dans le milieu mais subissent par ailleurs un changement de direction : c'est la diffusion de Thomson (électron libre ou noyau) et Rayleigh (électron lié). En effet, les électrons sont transitoirement excités et se désexcitent en émettant des photons de même énergie mais de directions différentes entraînant un élargissement du faisceau initial de photons (Figure 3).

Les photons ayant une énergie supérieure à 1,02 MeV « entrant » dans le champ électrique du noyau vont donner naissance simultanément à un positron (ou électron positif) et un électron négatif : c'est la production de paires (Figure 3).

Enfin, les réactions photonucléaires sont rares et n'apparaissent qu'à une énergie élevée (de l'ordre du MeV) au niveau du noyau qui absorbe totalement l'énergie du photon (Figure 3). Si l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de liaison du dernier nucléon, celui-ci peut être éjecté.

En résumé, il existe différents moyens d'interaction du photon avec la matière qui peuvent entraîner ou non une ionisation. L'énergie du photon incident est importante quant à la probabilité d'un mode d'interaction par rapport à l'autre.

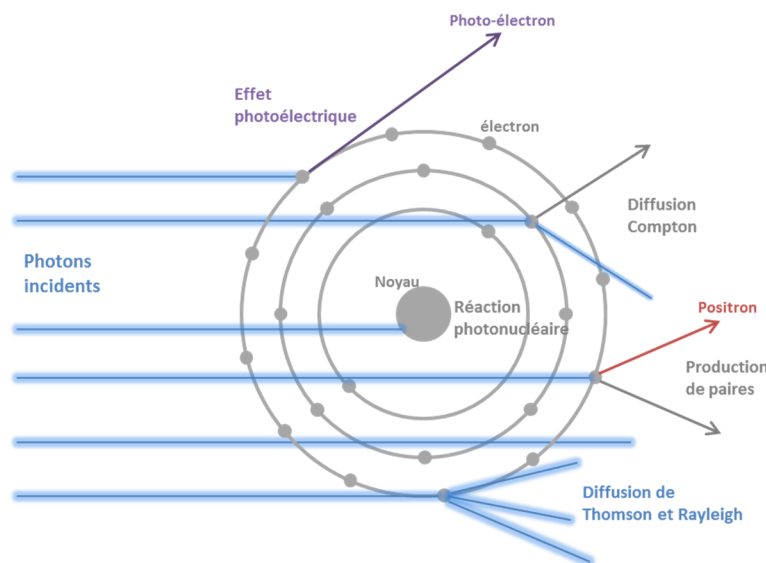


Figure 3 : Schéma récapitulatif des différents modes d'interaction des photons X et γ avec la matière

Inspiré de (Gambini & Granier, 2007).

II. Radiologie médicale

Les rayonnements ionisants sont utilisés de façon courante en clinique pour le diagnostic ou le traitement de nombreuses pathologies. La radiologie au sens large désigne tous les actes

médicaux utilisant ces rayonnements. On distingue d'une part la radiologie conventionnelle et d'autre part la radiologie interventionnelle.

A. Radiologie conventionnelle

Selon l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN), la radiologie conventionnelle désigne l'ensemble des techniques d'imagerie utilisant une source de rayonnements externe au patient pour informer le médecin dans un but de diagnostic ou d'évaluation thérapeutique (ASN). En 2012, environ 44 % de la population française a été exposée lors d'un ou plusieurs examens diagnostiques (IRSN, 2014).

Nous retrouvons plusieurs actes de radiologie utilisant des rayonnements non ionisants comme l'échographie (ondes acoustiques) et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM, champs magnétiques). Cependant nous nous focaliserons sur les techniques d'imagerie utilisant des rayonnements ionisants (rayons X) comme la radiographie et la scannographie. La radiographie permet d'obtenir des images par l'utilisation des rayons X qui vont traverser le corps du patient en étant partiellement absorbés en fonction des organes se trouvant dans le champ d'irradiation (Figure 4). L'atténuation dépend de la densité ainsi que de l'épaisseur des tissus considérés. Les images sont par la suite recueillies à l'aide de détecteurs.

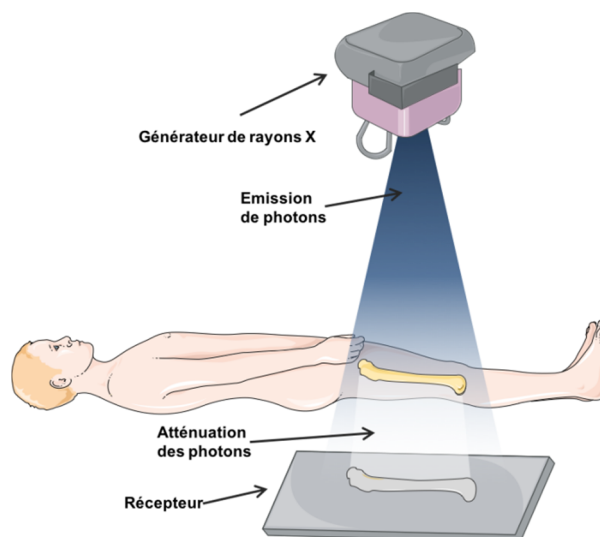


Figure 4 : Principe de la radiographie

La scannographie (ou tomodensitométrie ou encore CT-scan, *Computed Tomography*) est, comme la radiographie, une technique basée sur la capacité des rayons X à traverser la matière qui absorbe les photons en fonction de sa densité. Pendant cet examen, la source de rayons X

est mobile autour du patient contrairement à la radiographie. Cette technique d'analyse multiangulaire permet à la fois de réaliser des images en 2D et en 3D (Figure 5).

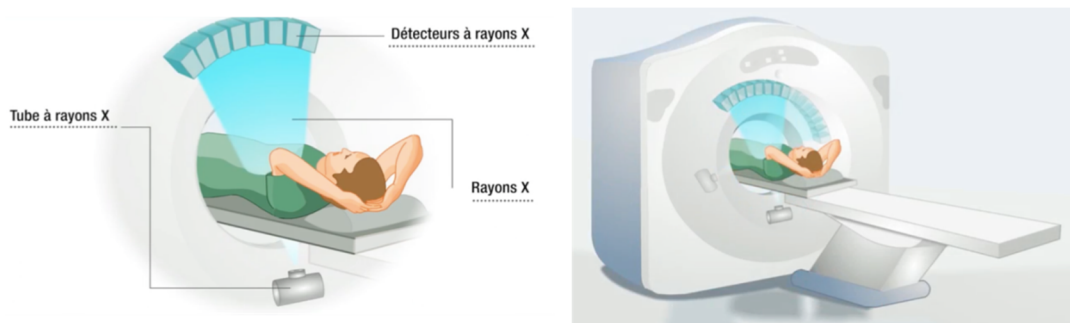


Figure 5 : Principe de la scannographie
(CEA, 2014)

Les examens en radiologie conventionnelle utilisent des photons ayant une énergie moyenne de l'ordre du keV (15-20 keV en radiographie et environ 40-60 keV pour un scanner). Les doses reçues par le patient sont assez limitées : une dizaine de mGy à la peau et quelques mGy à l'organe (Chateil et al., 2010).

B. Radiologie interventionnelle

Grâce à un appareil émettant des rayons X, la radiologie interventionnelle permet au médecin de guider son geste, au cours d'une biopsie par exemple (ASN, 2017). La radiologie interventionnelle peut présenter dans certains cas une alternative à la chirurgie. En effet, cette technique permet d'accéder à une cible tumorale en profondeur en utilisant le réseau vasculaire ou encore le tube digestif. Par exemple, dans le cas d'un cancer du foie, le radiologue interventionnel introduit un cathéter dans l'artère fémorale qui se poursuit jusqu'à l'artère hépatique grâce à un radioguidage précis pour permettre une chimio-embolisation par la suite (CIRSE, 2011). Contrairement à la chirurgie, l'opérateur ne voit pas directement l'organe et la lésion qui sont en réalité observés à l'aide d'un écran. L'acte médical est alors moins invasif et permet de réduire les complications et le temps d'hospitalisation (ASN, 2017). Ainsi, cette technique participe à l'amélioration des soins reçus par le patient. Au cours de cet acte médical, le rayonnement utilisé est peu pénétrant mais la dose reçue au niveau de la peau est non négligeable à cause de la durée et de la complexité de l'intervention. En effet, la dose à la peau peut atteindre jusqu'à 10 - 15 Gy délivrée en 2 à 3 jours (Chateil et al., 2010). L'irradiation reste cependant localisée et ne dépasse pas quelques dizaines de centimètres.

III. La radiothérapie externe

En plus du diagnostic, les rayonnements ionisants peuvent également être utilisés à des fins thérapeutiques. En France, l'Institut National du Cancer (INCa) estime le nombre de nouveaux cas de cancers à 382 000 en 2018 (INCa, 2019). La majorité de ces patients (57 %) ont bénéficié d'une radiothérapie seule ou en combinaison avec un traitement par chimiothérapie. Il existe la radiothérapie métabolique au cours de laquelle l'administration d'une substance radioactive par voie orale ou par injection ira se fixer préférentiellement sur les cellules tumorales. Contrairement à cette technique et à la curiethérapie où la source radioactive est à l'intérieur du corps du patient, la radiothérapie externe permet d'émettre des rayons à partir d'une source ou d'un appareil situés à côté du patient. L'irradiation est transcutanée à l'aide d'un ou plusieurs faisceaux d'irradiation, statique(s) ou mobile(s) (cf page 41). De nos jours, la radiothérapie externe reste le moyen le plus utilisé pour traiter les patients à l'aide des rayonnements ionisants.

A. Etapes d'un traitement par radiothérapie

La prise de décision thérapeutique s'effectue dans le cadre d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) par une équipe d'oncologues, radiothérapeutes, radiophysiciens, anatomopathologistes et chirurgiens. D'autres professionnels peuvent également faire partie de la RCP en fonction de l'âge (pédiatre ou gériatre), du sexe (gynécologue) ou des antécédents médicaux du patient (SFRO, 2007). La radiothérapie débute dans les délais les plus brefs possibles c'est-à-dire quelques jours à une semaine après le diagnostic. Il se peut que la radiothérapie ait lieu après quelques semaines si elle est associée à une chirurgie ou plus si un traitement par chimiothérapie est initié en première intention (SFRO, 2007).

Lorsque la radiothérapie est initiée, une première phase de « contention » consiste à positionner et immobiliser le patient à l'aide de moyens de contention adaptés à la zone de traitement. Lors d'une étape d'« acquisition des données anatomiques », la cible tumorale est repérée à l'aide de l'imagerie permettant d'acquérir les données nécessaires pour contourner le ou les volumes cibles. Les recommandations de la commission internationale des unités et mesures radiologiques (ICRU, *International Commission on Radiation Units and Measurements*) (Landberg et al., 1993; Landberg et al., 1999; Chavaudra et al., 2001) permettent de standardiser les volumes à définir pour un traitement par radiothérapie (Figure 6)

:

- Le volume tumoral objectifable (GTV, *Gross Tumor Volume*) comprend la tumeur primitive et ses extensions macroscopiques (palpables ou visibles) ;
- Le volume cible anatomo-clinique (CTV, *Clinical Target Volume*) prend en compte la probabilité d’envahissement microscopique de la tumeur en fonction de la pathologie ;
- Le volume cible interne (ITV, *Internal Target Volume*) tient compte des mouvements des organes contenant la tumeur et des changements de forme du CTV ;
- Le volume cible prévisionnel ou planifié (PTV, *Planning Target Volume*) prend en compte une marge de sécurité (SM, *Set-up Margin*) liée à l’incertitude de la machine et la technique d’irradiation. Selon le rapport 83 de l’ICRU (ICRU, 2016), la SM a été jugée excessive et l’ITV serait suffisant pour délimiter le PTV ;
- Le volume traité (TV, *Treated Volume*) ;
- Le volume irradié (IV, *Irradiated Volume*) défini comme le volume de tissu recevant une dose.

Le GTV permet à l’oncologue de prescrire des doses thérapeutiques (sous forme d’unités moniteurs U.M.) et l’évaluation de la réponse tumorale à la radiothérapie. Les CTV et PTV sont des concepts respectivement anatomo-cliniques et géométriques définis lors du choix du plan de traitement. Ainsi, les GTV, CTV et ITV sont liés à la position et la morphologie du patient alors que le PTV dépend de la pratique de radiothérapie (Purdy, 2008). Le volume irradié comprend le volume tumoral à traiter mais également les tissus sains adjacents à la tumeur pouvant être des organes à risque (OARs, *Organs At Risk*) (Figure 6).

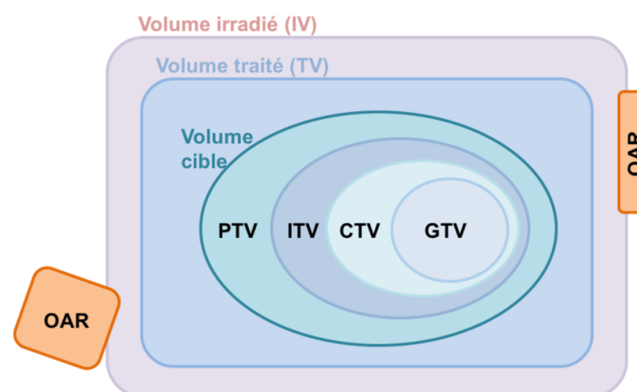


Figure 6 : Les volumes d’intérêt pour un traitement en radiothérapie

Inspiré de (Chavaudra & Bridier, 2001).

Après la définition des différents volumes par l’imagerie médicale, une mise en place des faisceaux d’irradiation à l’aide d’un simulateur et/ou scanographe permet de réaliser l’étape de « simulation virtuelle du traitement » dépendant de la technique de radiothérapie choisie

(cf page 34). Cette étape nécessite des logiciels de visualisation depuis la source d'irradiation : BEV (*Beam Eye View*) permettant le positionnement virtuel des faisceaux.

Lors d'une « étude planimétrique » ou « dosimétrique », l'oncologue radiothérapeute et le radiophysicien définissent la balistique du traitement, calculent la dose et optimisent la technique d'irradiation (nombre et orientation des faisceaux, types d'énergie, dimensions des champs d'irradiations et caractéristiques du rayonnement). Cette étape est réalisée à l'aide d'un logiciel spécifique de planification : le TPS (*Treatment Planning System*). Suite à la validation du plan de traitement définitif, le calcul du temps de traitement est réalisé en nombre d'unité moniteur pour chaque séance d'irradiation sur les accélérateurs de particules (cf page 34). Il est recommandé de confirmer ce calcul par une deuxième méthode indépendante (SFRO, 2007).

Ces différentes phases aboutissent à une étape de « traitement » au cours de laquelle le patient bénéficie de séances d'irradiation délivrées par un appareil de radiothérapie. Les séances durent généralement quelques minutes, et débutent systématiquement avec un contrôle de la forme, du positionnement des faisceaux ainsi que de la dose délivrée.

A la fin du traitement par radiothérapie, la prise en charge du patient est assurée par l'ensemble de l'équipe médicale. Pour apprécier l'efficacité thérapeutique, l'oncologue va surveiller une fois par an minimum l'état du patient traité (SFRO, 2007).

B. But de la radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers à visée curative, palliative ou symptomatique (SFRO, 2007). La radiothérapie curative a pour objectif la guérison totale et définitive d'un cancer. Lorsque le cancer est à un stade avancé et que la guérison n'est plus envisageable, la radiothérapie palliative permet de ralentir la progression du cancer et de prolonger l'espérance de vie du patient. Enfin, la radiothérapie symptomatique permet d'améliorer le confort et la qualité de vie du patient dans un but antalgique pour une tumeur locorégionale avancée voire métastatique (SFRO, 2007). La délivrance d'une dose d'irradiation permettant le contrôle tumoral tout en épargnant les tissus sains (ou OARs) est le challenge perpétuel de la radiothérapie. En clinique, la notion de balance bénéfique/risque est au centre de la décision thérapeutique afin de permettre un équilibre entre un bon contrôle tumoral tout en limitant les dommages aux tissus sains adjacents (Figure 7).

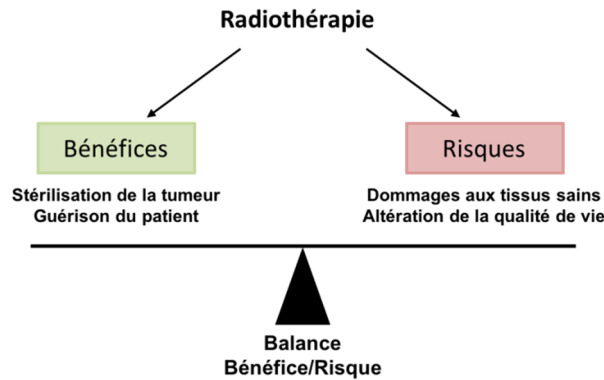


Figure 7 : Notion de balance Bénéfice/Risque en radiothérapie

La radiothérapie est basée sur la différence de radiosensibilité entre les cellules saines et les cellules tumorales. Le radiothérapeute dispose d'une fenêtre thérapeutique (Figure 8) dans laquelle la dose pour traiter un cancer prend en compte la dose nécessaire à un bon contrôle tumoral et la dose de tolérance aux organes à risque. La dose correspond à un dépôt d'énergie par unité de masse. Dans le système international, la dose absorbée se mesure en Gray (Gy) et correspond à un dépôt d'énergie d'un joule par kilogramme de matière traversée (1 Gy = 1 J/kg).

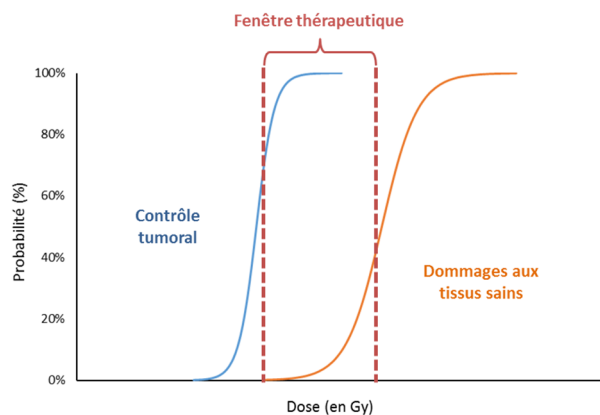


Figure 8 : Concept de fenêtre thérapeutique

Les courbes dose réponse représentent la probabilité d'apparition d'un effet biologique (en ordonnée) en fonction de la dose (en abscisse). Inspiré de (Liauw et al., 2013).

En radiothérapie, la dose de contrôle tumoral est la dose nécessaire pour obtenir une stérilisation définitive de la tumeur. Cette dose dépend du type histologique et du volume de la tumeur. Elle varie de 60 à 80 Gy au GTV et de 45 à 60 Gy au CTV en fractionnement conventionnel selon le type de cancer (SFRO, 2007). La dose de tolérance aux OARs est également importante lors de la planification d'un traitement puisqu'elle constitue le principal facteur limitant de la dose que l'on peut délivrer au niveau tumoral. En effet, certains organes qui assurent des fonctions vitales (tronc cérébral, moelle, poumon et cœur) doivent rester

fonctionnels après l'irradiation alors que d'autres organes non vitaux (glandes salivaires, œil et os) permettent de maintenir une qualité de vie après le traitement. La dose de tolérance dépend de la radiosensibilité des tissus (Tableau I).

Sensibilité du tissu	Organes	Doses de tolérance
Très radiosensible	Œil, Ovaire, Testicule, Rein, Foie, Glandes salivaires, Moelle osseuse	Doses faibles
Moyennement radiosensible	Intestin grêle, Estomac, Colon, Rectum, Œsophage, Cœur, Poumon, Peau, Thyroïde, Cerveau	Doses moyennes
Peu radiosensible	Muscle, Utérus, Vagin, Os, Tissu conjonctif	Doses importantes

Tableau I : Doses de tolérance et OARs
Inspiré de (SFRO, 2007).

Chaque organe est constitué de sous-unités fonctionnelles organisées en série ou en parallèle qui déterminent leur tolérance fonctionnelle à l'irradiation. Pour les tissus organisés en série (moelle épinière, nerf, tube digestif), la destruction d'une sous-unité altère toute la fonction de l'organe. Ainsi, une dose élevée sur un petit volume est toxique. La dose de tolérance est représentée par une dose maximale de X Gy, ce qui signifie que la dose délivrée à cet organe doit être en tout point inférieure à X Gy. Les tissus organisés en parallèle (poumon, rein, foie) sont constitués de sous-unités indépendantes les unes des autres. La fonction de l'organe est altérée lorsqu'un certain nombre de sous-unités sont détruites. Pour ces organes, la dose de tolérance s'exprime en $V_x \leq Y\%$ ce qui signifie que la dose X Gy ne doit pas être délivrée dans plus de Y % du volume de l'OAR. La dose de tolérance dépend de la distribution de la dose qui est représentée par un histogramme dose volume (HDV). L'HDV permet de résumer la distribution 3D de la dose d'irradiation en fonction du volume des organes (Figure 9).

Depuis quelques années une nouvelle notion est décrite par certains auteurs : l'histogramme dose masse (HDM) (Butler et al., 2004; Mavroidis et al., 2006). En effet, la plupart des OARs sont constitués de plusieurs types de tissus ce qui explique une distribution de la dose inhomogène. Ainsi, l'HDM permet de prendre en compte la densité des organes pour la distribution de la dose (Figure 9) et permet une optimisation de traitement notamment pour les cancers pulmonaires (Tyler Watkins et al., 2017). En effet, l'HDV dépend de la phase du cycle respiratoire considérée puisque le volume pulmonaire dépend de la respiration. De plus,

la masse pulmonaire est considérée comme constante puisque la masse de l'air inspiré est négligeable, l'HDM permet donc de s'affranchir de la respiration du patient (Nioutsikou et al., 2005). Ainsi l'HDM semble décrire de manière plus réaliste la distribution de la dose délivrée aux poumons (Mavroidis et al., 2006).

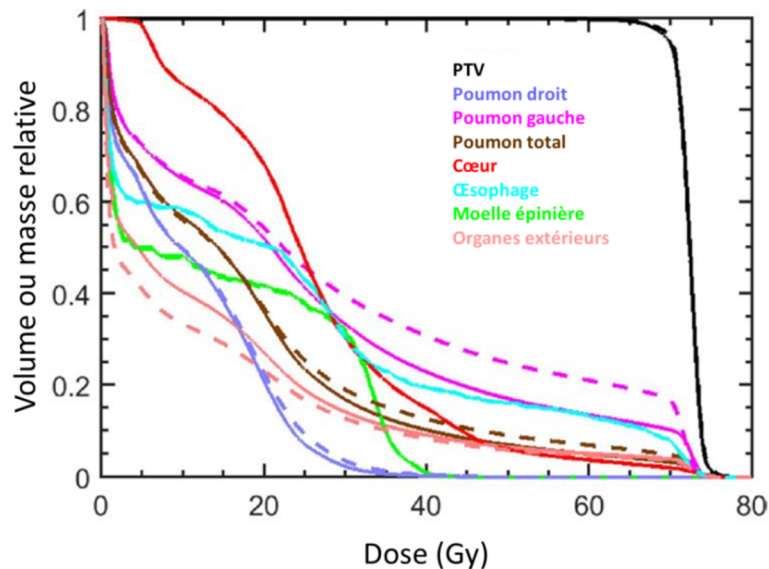


Figure 9 : Histogramme dose volume (HDV) et histogramme dose masse (HDM) de la zone thoracique dans le cadre d'une irradiation d'une tumeur solide centrale dans le poumon droit
 Représentation graphique du volume ou masse relative de l'organe irradié (en ordonné) en fonction de la dose (en abscisse) pour chaque organe. Les courbes en trait plein et pointillé correspondent aux courbes HDV et HDM respectivement (Tyler Watkins et al., 2017)

C. Principe de fonctionnement d'un accélérateur linéaire médical

La radiothérapie externe consiste à émettre un faisceau de rayons ciblés sur la tumeur au moyen d'un accélérateur linéaire de particules ou Linac (*Linear Accelerator*). Au niveau du canon de l'accélérateur, la mise sous tension d'un filament de tungstène dans une enceinte sous vide permet l'émission d'électrons (Figure 10). La tension d'un accélérateur est en général de 4 à 25 MV. L'impact du faisceau d'électrons sur une plaque métallique (en or ou en tungstène) va entraîner la création d'un faisceau de rayons X qui traversera un collimateur primaire définissant des faisceaux d'irradiation carrés ou rectangulaires. Le cône égalisateur est un filtre métallique (cuivre ou aluminium) permettant d'aplatir le profil de dose des faisceaux de photons, afin de le rendre conforme à une utilisation en clinique ainsi que d'assurer la délivrance de la dose parfaitement homogène sur la cible (Sharma, 2011) (Figure 11). L'utilisation d'un cône égalisateur entraîne une diminution du débit de dose du faisceau d'irradiation. En effet, un rayonnement non filtré peut atteindre un débit de dose jusqu'à 5 fois plus important que celui d'un même rayonnement filtré (Lasio et al., 2014).

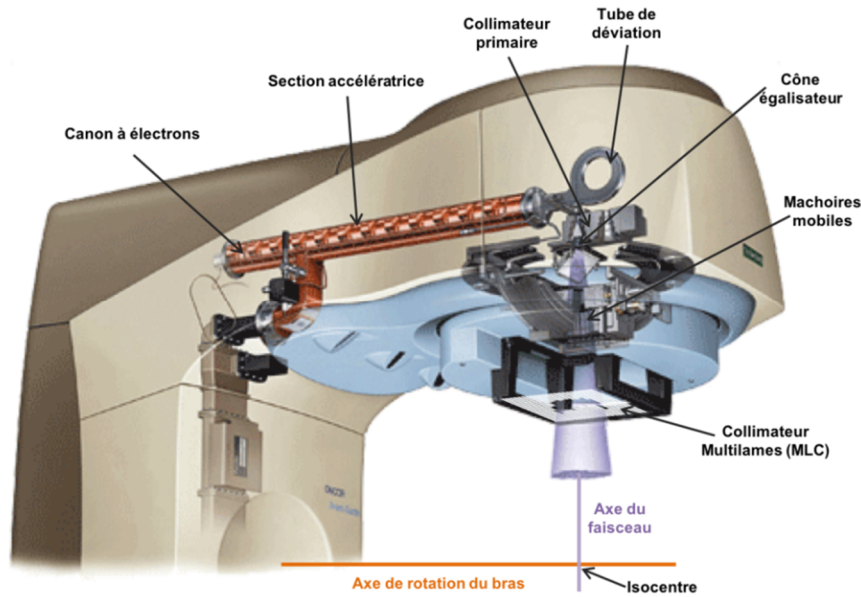


Figure 10 : Principe de fonctionnement d'un accélérateur linéaire utilisé en clinique
Image adaptée de (Bourge, 2005).

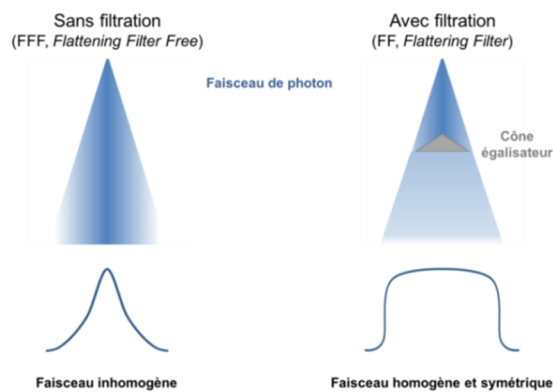


Figure 11 : Principe de filtration d'un accélérateur linéaire médical par un cône égalisateur
Inspiré de (Sharma, 2011).

IV. Evolutions en radiothérapie externe

Historiquement, la radiothérapie en deux dimensions (ou 2D-RT) était utilisée et reposait sur la définition des volumes cibles à l'aide de radiographies planaires. Les faisceaux se distribuaient sur les axes antéro-postérieurs et latéraux de la zone à traiter. Avec cette technique, la zone d'irradiation est large et les tissus sains avoisinants recevaient une dose d'irradiation non négligeable. Par exemple, pour le traitement d'un cancer de la prostate, le rectum recevait au moins 60 % de la dose à la cible (Purdy, 2008).

Au cours des dernières décennies, les techniques de radiothérapie ont connu des avancées majeures avec pour but unique une meilleure administration de la dose à la tumeur en épargnant au maximum les tissus sains avoisinants. Les avancées concernent d'abord une optimisation de

la distribution de la dose par l'amélioration balistique, possible grâce aux progrès de l'imagerie 3D permettant une meilleure définition de la cible tumorale à irradier. Selon le rapport de l'INCa (INCa, 2012), les techniques utilisées lors d'un traitement par radiothérapie en France sont la radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT) à 88 %, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) à 6,2 %, la stéréotaxie à 3 % et enfin d'autres techniques à 2,8 % comme l'hadronthérapie (0,33 %) (Figure 12). Des progrès technologiques concernent également les modalités de délivrance de la dose prenant en compte les variations anatomiques du patient au cours de l'irradiation et tout au long du traitement. Le nombre d'appareils de radiothérapie externe a augmenté de 14 % entre 2012 et 2017 avec de plus en plus d'accélérateurs innovants (CyberKnife et Novalis pour la stéréotaxie ; TomoTherapy pour la RCMI) (INCa, 2018).

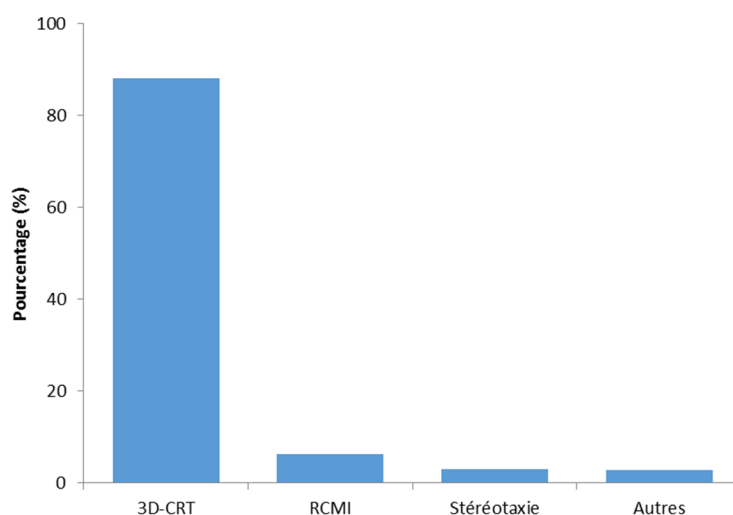


Figure 12 : Répartition des traitements par radiothérapie selon la technique d'irradiation utilisée en 2011

3D-CRT : Radiothérapie Conformationnelle 3D (88 %) ; RCMI : Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité (6,2 %) ; Stéréotaxie (3 %) et les autres techniques (2,8 %) (INCa, 2012).

A. Amélioration balistique

1. La radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT)

La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (3D-CRT, *Three-Dimensional Conformal Radiotherapy*) utilise des images 3D de la tumeur et des organes obtenues par scanner. Ces images sont par la suite intégrées dans un logiciel de BEV pour réaliser une simulation virtuelle de la forme des faisceaux d'irradiation afin qu'ils correspondent le plus précisément possible au volume de la tumeur (HAS, 2015). La 3D-CRT est une technique utilisée pour le traitement à visée curative des tumeurs de la zone abdominale (foie, pancréas),

pelvienne (prostate, rectum), thoracique ainsi que de la sphère ORL (voies aérodigestives supérieures). L'approche classique de la 3D-CRT comprend l'utilisation de plusieurs faisceaux larges et fixes dont l'intersection correspond à une zone irradiée où sera délivrée une forte dose. Cette méthode ne permet pas d'éviter les OARs se trouvant dans le champ d'irradiation même si elle permet en revanche de diminuer leur exposition par rapport à la 2D-RT (Figure 13) (Purdy, 2008). En effet, pour le cancer de la prostate, la distribution de la dose est plus précise par la 3D-CRT et les OARs reçoivent moins de dose au cours du traitement : environ 50 % de la dose à la cible pour le rectum (Figure 13). De plus, la 3D-CRT permet une diminution de la toxicité gastro-intestinale comparé à la 2D-RT (Dearnaley et al., 1999). La dose administrée à la tumeur dépend du seuil critique des OARs mais ne correspond pas forcément à la dose efficace pour le bon contrôle tumoral. Ce dernier point a constitué la principale limite de cette technique pendant des années étant donné la distribution d'une dose uniforme sur le volume traversé par le faisceau.

Historiquement, les radiothérapeutes réalisaient des caches amovibles pour adapter la direction des faisceaux d'irradiation. Depuis les années 2000, la généralisation des collimateurs multilames contrôlés par ordinateur permet de définir des formes plus complexes et ainsi de limiter l'exposition des tissus sains entourant la tumeur (Bortfeld, 2006). Un collimateur multilames (MLC, *MultiLeaf Collimator*) est composé d'un assemblage de lames qui peuvent être déplacées indépendamment les unes des autres pour permettre la modification de la forme du champ d'irradiation (Figure 14). Toutefois malgré cette avancée technique, la 3D-CRT est limitée lors de l'irradiation d'une cible ayant des formes concaves surtout si des OARs se trouvent à proximité, d'où le développement d'une autre technique : la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité.

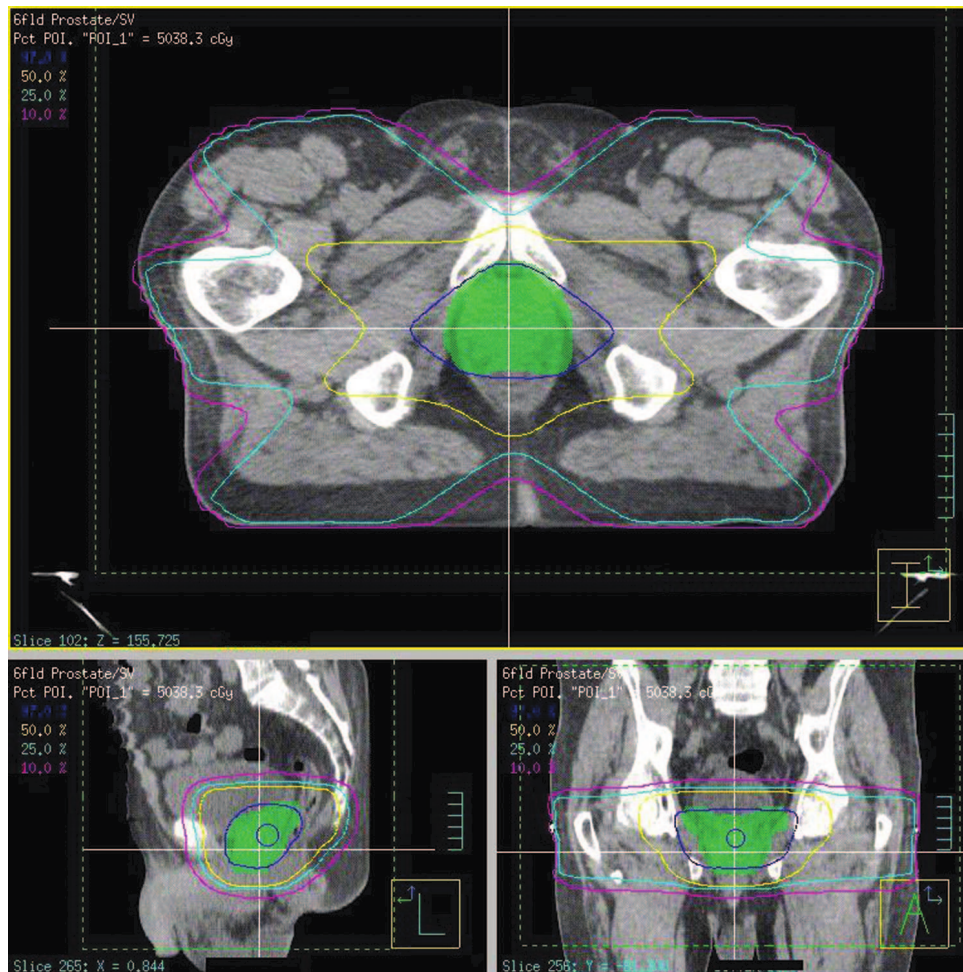


Figure 13 : Courbes isodoses pour un traitement par radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions (3D-CRT) d'un cancer de la prostate

L'irradiation est réalisée à l'aide de 6 faisceaux par les rayons X à une tension de 15 MV. Les isodoses de 97 %, 50 %, 25 % et 10 % sont représentées par les lignes bleues, jaunes, turquoise et roses respectivement (Purdy, 2008).

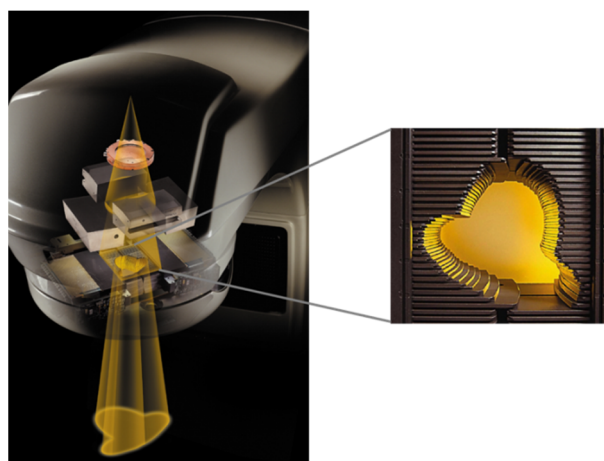


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'un collimateur multilames

Le collimateur multilames permet de donner la forme souhaité au faisceau d'irradiation (Bortfeld, 2006).

2. La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI)

La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI ou IMRT, *Intensity Modulated Radiotherapy*) permet de traiter les tumeurs ayant des formes plus complexes comme par exemple les tumeurs de la tête et du cou se situant en général autour de la moelle épinière. La RCMI consiste à faire varier l'intensité du faisceau au cours d'une même séance pour s'adapter précisément à la zone à traiter et éviter les OARs dans le but de limiter la toxicité aux tissus sains. La fluence correspond à l'intégrale d'une densité de flux de particules sur un intervalle de temps donné. Pour la RCMI, on parle alors de modulation de fluence. Au cours du traitement d'un cancer de la prostate, la dose est distribuée avec plus de précision par rapport à la 3D-CRT (Purdy, 2008; Fischer-Valuck et al., 2018). Le rectum reçoit entre 25 et 50 % de la dose à la cible au cours de l'irradiation (Figure 15).

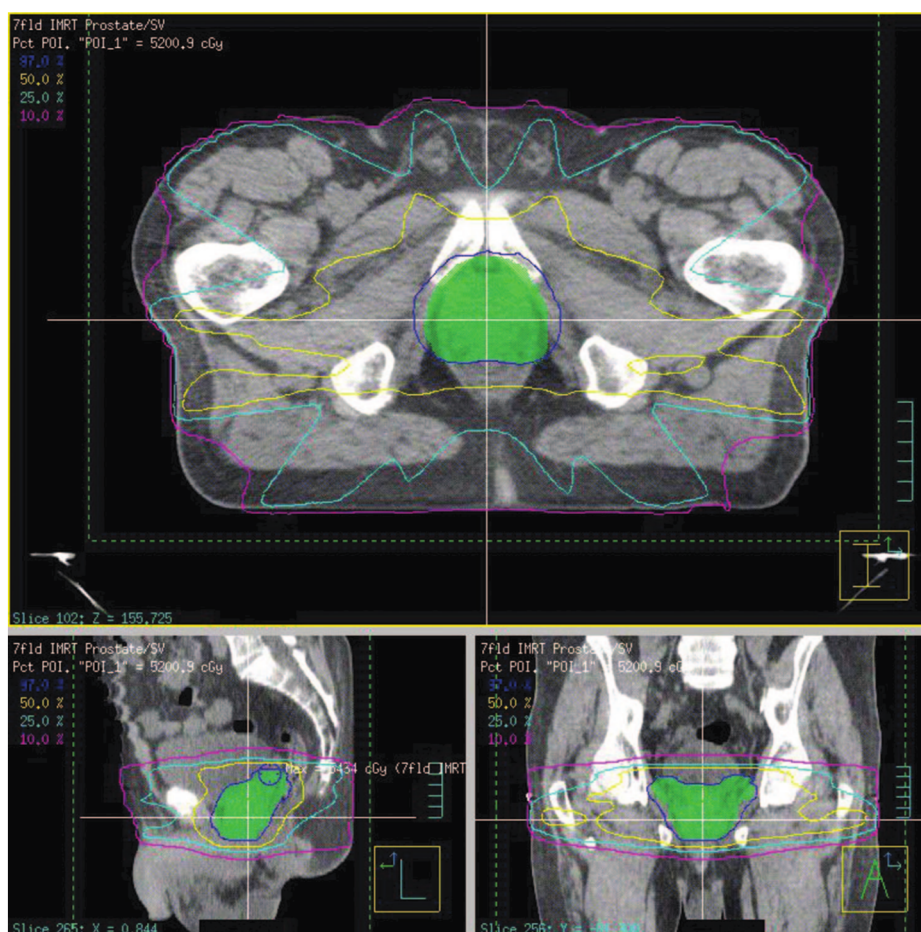


Figure 15 : Courbes isodoses pour un traitement par radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI) d'un cancer de la prostate

L'irradiation est réalisée à l'aide de 7 faisceaux par les rayons X à une tension de 15 MV. Les isodoses de 97 %, 50 %, 25 % et 10 % sont représentées par les lignes bleues, jaunes, turquoise et roses respectivement (Purdy, 2008).

La RCMI est devenue une modalité plus couramment utilisée en radiothérapie depuis l'invention du concept de « planification inverse ». Ce concept consiste dans un premier temps à fixer des paramètres physiques et biologiques qui permettront grâce à des techniques d'optimisation mathématiques de déterminer les caractéristiques du champ optimal de traitement à utiliser (Lefkopoulos et al., 1999). Les paramètres physiques prennent en compte le volume de tissus à irradier, la dose minimale à administrer dans la cible pour obtenir un bon contrôle tumoral ainsi que les doses maximales aux OARs pour éviter les complications au niveau de tissus sains. Les paramètres biologiques, quant à eux, prennent en compte la qualité de vie du patient après l'irradiation. Ainsi, la probabilité de réussite d'un traitement est directement déterminée en termes de probabilité de contrôle tumoral (TCP, *Tumor Control Probability*) et de probabilité de complication aux tissus sains (NTCP, *Normal Tissue Complication Probability*) (Dejean et al., 2001).

Par le passé, les radio-oncologistes utilisaient la méthode de planification directe ou conventionnelle qui est un processus d'essai-erreur (ou *trial-and-error*). Le médecin commence par installer un champ d'irradiation (nombre, énergie et forme des faisceaux) puis évalue la dose que le patient recevra. Si elle n'est pas acceptable en termes de dose minimale à la cible et de dose maximale aux OARs, il reitère le processus jusqu'à ce que les critères optimaux soient atteints (Lefkopoulos et al., 1999).

3. La radiothérapie stéréotaxique

La radiothérapie stéréotaxique (SRT, *Stereotactic Radiotherapy*) est apparue lorsque les radiothérapeutes avaient la nécessité de délivrer des fortes doses en une fraction pour une cible intracrânienne (ICRU, 2017). Dans les années qui suivent la SRT s'étend à des cibles extracrâniennes. Elle regroupe la radiochirurgie (SRS, *Stereotactic Radiosurgery*) aussi appelée radiothérapie stéréotaxique ablative (SABR, *Stereotactic Ablative Radiation Therapy*) et la radiothérapie stéréotaxique corporelle (SBRT, *Stereotactic Body Radiotherapy*). On parle de SRS lorsque le traitement est délivré en une seule fraction d'irradiation. Cette technique de radiochirurgie était et est toujours principalement utilisée pour le traitement des tumeurs localisées dans le système nerveux central. La SBRT, appelée plus couramment « radiothérapie stéréotaxique », permet l'administration de doses par fraction très élevées (dites ablatives) lors des protocoles hypofractionnés (cf page 43). La stéréotaxie est une technique d'irradiation par des photons de haute énergie avec une précision submillimétrique utilisant des minifaisceaux convergents pour irradier à de fortes doses par fraction de très petits volumes (HAS, 2006). La

SBRT est réalisée soit à l'aide d'un appareil dédié comme le Cyberknife d'Accuray ; soit d'un Linac muni de collimateurs coniques de diamètres variables comme le TrueBeam STX de Varian ; soit d'un Linac couplé à un scanner CT comme le TomoTherapy Hi-Art d'Accuray (ICRU, 2017). La radiothérapie stéréotaxique requiert une conformation précise du gradient de dose en dehors du PTV ce qui est possible par l'implémentation d'un système d'imagerie en temps réel sur ces appareils (cf partie IV.B.2).

La stéréotaxie est utilisée pour traiter certaines tumeurs solides non métastatiques au niveau cérébral, pulmonaire ou hépatique ayant un diamètre inférieur à 3 centimètres (ICRU, 2017). Plusieurs études cliniques montrent un avantage de la SBRT par rapport à la radiothérapie avec modulation d'intensité. En effet, cette technique permettrait de réduire la dose reçue aux OARs (reins, estomac et moelle épinière) pour le traitement d'un cancer hépatique grâce à l'utilisation de 14 à 22 faisceaux d'irradiation non coplanaires (Dong et al., 2013). Pour le traitement d'un cancer pulmonaire par stéréotaxie, l'utilisation de 30 faisceaux non coplanaires permet de garder la même limite de dose aux OARs (trachée, cœur, œsophage, moelle épinière et poumon ipsilatéral) par rapport à une radiothérapie conventionnelle (Dong et al., 2013; Rwigema et al., 2015). La SBRT permet une escalade de la dose par fraction pouvant atteindre 20 Gy (Blais et al., 2017). Ainsi, lors du traitement d'un cancer de la prostate, le rectum reçoit moins de 80 % de la dose à la tumeur avec une décroissance de dose rapide qui permet de diminuer le volume de rectum irradié (Figure 16) (Lin et al., 2014).

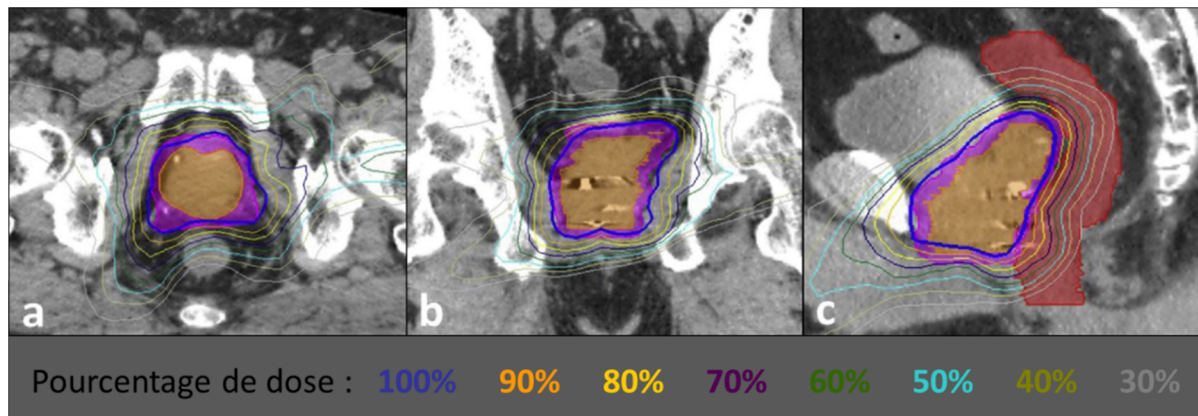


Figure 16 : Courbes isodoses pour un traitement par radiothérapie stéréotaxique (SBRT) d'un cancer de la prostate

L'irradiation est réalisée à l'aide d'un cyberknife à une tension de 6 MV (Lin et al., 2014).

B. Evolution des modalités de délivrance de la dose

La distribution de la dose à la tumeur est de plus en plus précise avec la 3D-CRT, la RCMi et la stéréotaxie. L'évolution balistique des appareils de radiothérapie a permis une amélioration

considérable de l'index thérapeutique c'est à dire une augmentation du contrôle tumoral et une diminution de la toxicité aux tissus sains. Les appareils de radiothérapie peuvent également être implémentés d'un ou plusieurs équipements complémentaires afin d'optimiser la délivrance de la dose à des facteurs indépendants de l'appareil et de permettre une adaptation personnalisée des traitements pour le patient.

1. Faisceaux d'irradiation statiques et dynamiques

Lors du traitement par radiothérapie, les patients peuvent être irradiés par des faisceaux statiques ou dynamiques suivant des axes coplanaires ou non. On parle d'arc thérapie lorsque les faisceaux se déplacent autour du patient en suivant un plan fixe de 0 à 360°. L'arc thérapie est utilisée dans la modulation d'intensité par Arc Thérapie (IMAT, *Intensity Modulated Arc Therapy*) et la modulation volumétrique par Arc Thérapie (VMAT, *Volumetric Modulated Arc Therapy*). L'IMAT correspond à une RCMI avec une rotation du faisceau autour du patient. Lorsque la rotation est discontinue, chaque faisceau d'irradiation est fixe et est délivré l'un à la suite de l'autre avec un arrêt transitoire d'émission de photons : c'est la RCMI *step and shot*. Au contraire, la RCMI *sliding window* permet d'irradier le patient à l'aide d'un faisceau dynamique qui se déplace de façon continue autour du patient pendant tout le tir (Cho, 2018).

L'Arc Thérapie non coplanaire permet d'avoir de nombreux avantages pour les traitements des tumeurs cérébrales, prostatiques, hépatiques et mammaires (Smyth et al., 2019). Pour une irradiation d'un cancer de la tête et du cou, cette technique permet de diminuer la fatigue ressentie par les patients ainsi que l'incidence des effets secondaires neurocognitifs observés (Gulliford et al., 2012). De plus, l'Arc Thérapie dynamique et continue permet un gain de temps de traitement pour délivrer la dose à la cible. En effet, une irradiation avec des faisceaux statiques requiert un repositionnement et un contrôle à chaque fois que le faisceau change de direction, ce qui n'est pas le cas lors d'une irradiation avec un faisceau dynamique où le contrôle est réalisé avant le début du tir. Il a été montré qu'à l'aide du Cyberknife le temps pour délivrer le traitement pouvait être divisé par 2 voir 3 grâce à l'Arc Thérapie dynamique (Smyth et al., 2019).

2. Radiothérapie guidée par l'image

L'utilisation en routine de l'imagerie tridimensionnelle permet de prendre en compte le mouvement des organes internes et de la cible thérapeutique ce qui permet d'ajuster le traitement en temps réel. La radiothérapie guidée par l'image (IGRT, *Image-Guided Radiation*

Therapy) est assurée par l'implémentation d'appareils d'imagerie aux machines de radiothérapie : soit un tomographe à faisceau conique (CBCT, *Cone Beam Computed Tomography*), soit un tomographe hélicoïdal délivrant des rayonnements à haute (MV) ou basse énergie (kV) respectivement (Purdy, 2008). L'acquisition répétée d'images peut conduire à des doses additionnelles aux tissus sains qui doivent être prises en compte pour l'estimation du risque de complications. De récentes modalités permettent de combiner l'imagerie IRM pendant les irradiations grâce à l'IRM-LINAC. En France, il existe à ce jour 3 installations destinées à la pratique clinique (Unicancer, 2017; Centre Georges François Leclerc, 2019; Unicancer, 2019).

Les récentes avancées de l'IGRT permettent de mesurer et de prendre en compte les mouvements du patient impactés par la respiration pendant le traitement. Ainsi, les mouvements des tumeurs de la zone thoracique sont suivis tout au long du cycle respiratoire et peuvent être traités par des méthodes passives ou actives (Beaton et al., 2019). La méthode passive se base sur la reconstruction d'images à l'aide des données obtenues pendant la phase de planification de traitement. La méthode active permet de s'adapter à la respiration du patient en temps réel (Figure 17). Cette dernière est utilisée pour le traitement de petites tumeurs primitives ou métastatiques en conditions stéréotaxiques par des méthodes d'inspiration forcée, « *Gating* ou *Tracking* ». L'inspiration forcée se fait à 70-80 % de l'inspiration maximale pour permettre un maintien optimal de la position du patient pendant le traitement (Aboudaram et al., 2018). L'inspiration est vérifiée à l'aide d'un spiromètre. La technique de « *Gating* » permet de reconnaître les différentes phases du cycle respiratoire du patient et adapte le traitement par un déclenchement de l'irradiation lorsque la cible passe devant le faisceau et d'un arrêt lorsqu'elle s'en éloigne. Ces deux techniques d'asservissement respiratoire permettent un traitement dans une fenêtre réduite du cycle respiratoire afin de réduire les incertitudes de mouvements (Aboudaram et al., 2018). La technique de « *Tracking* » consiste à diriger le faisceau d'irradiation de manière continue et dynamique sur la cible tumorale en mouvement.

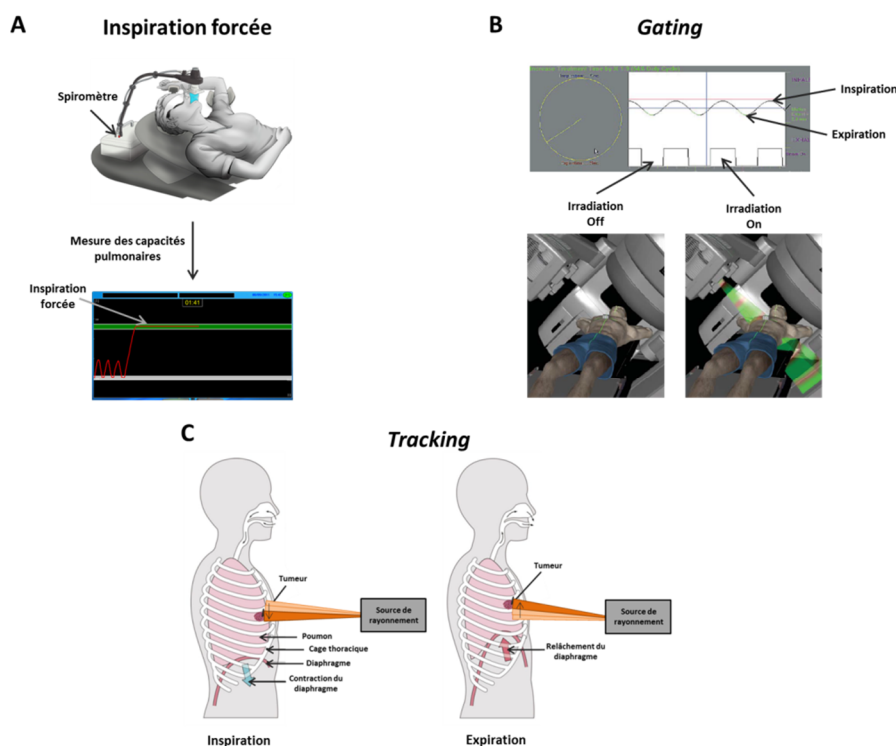


Figure 17 : Méthodes actives pour la radiothérapie guidée par l'image

Les méthodes actives de l'IGRT permettent de s'adapter à la respiration du patient pendant le traitement. Pour la méthode d'inspiration forcée (A), l'irradiation a lieu lors du blocage de l'inspiration par le patient (ligne verte). La technique du « *Gating* » (B) permet d'irradier la tumeur lorsqu'elle passe devant le faisceau d'irradiation en général au moment de l'expiration du patient. La technique du « *tracking* » (C) permet d'avoir un faisceau d'irradiation mobile qui va suivre la tumeur avec les mouvements respiratoire. Inspiré de (SDX; Varian, 2007).

3. Fractionnement en radiothérapie

Les protocoles de radiothérapie sont principalement définis en fonction du type de tumeur, de sa localisation, de sa taille, de son extension et de son grade. Ainsi, la dose totale ne suffit pas à elle seule pour définir un traitement par irradiation. Il faut également prendre en compte la dose par fraction, le nombre total de fractions, leur fréquence, l'étalement du traitement ainsi que le débit de dose.

Le fractionnement conventionnel en radiothérapie (ou normo-fractionnement) correspond à une dose de 2 Gy par fraction, 1 fraction par jour, 5 jours par semaine (du lundi au vendredi) sur une durée de 5 à 8 semaines. La stéréotaxie est le plus souvent associée à des traitements suivant des protocoles hypofractionnés pour des doses supérieures à 2 Gy par séance, associés à une diminution globale du temps de traitement. On retrouve d'une part des protocoles d'hypofractionnement modéré délivrant des doses par fraction comprises entre 2,2 et 4 Gy ; et d'autre part des protocoles d'hypofractionnement important administrant des doses par fraction allant jusqu'à 15 Gy (Zaorsky et al., 2013; Beckta et al., 2019) voire 20 Gy.

Il existe également des protocoles hyperfractionnés administrant plus d'une fraction par jour (2 à 3 fractions journalières). Ce type de fractionnement peut permettre une diminution du temps de traitement global allant jusqu'à 3 semaines (Kubota et al., 2014). La diminution du temps entre les fractions entraîne une prolifération cellulaire moins importante permettant un meilleur contrôle tumoral.

En radiothérapie, la réponse tumorale suit un certain nombre de réactions correspondant au principe des 5Rs qui a été décrit dans le but de mieux comprendre le succès ou l'échec de la radiothérapie localisée et plus précisément lors d'un fractionnement (Harrington et al., 2007). Ainsi, les différents facteurs pris en compte sont :

- la Réparation différentielle des cellules tumorales et normales entre les fractions d'irradiation ;
- la Repopulation des cellules tumorales entre 2 fractions ;
- la Redistribution des cellules dans des phases du cycle cellulaire plus ou moins radiosensibles ;
- la Réoxygénation des cellules tumorales (initialement hypoxiques) pendant le traitement les rend encore plus sensibles ;
- Radiosensibilité intrinsèque des cellules

4. Variation du débit de dose

Les appareils de radiothérapie actuels délivrent classiquement des rayonnements à des débits de dose allant de 2 à 6 Gy/min et pouvant aller dans certaines applications jusqu'à environ 25 Gy/min pour les accélérateurs linéaires médicaux de dernière génération (ASN, 2010). De nos jours, en pratique clinique, les techniques de 3D-CRT et RCMI utilisent des rayonnements ayant un débit de dose d'environ 2 Gy/min. L'augmentation du débit de dose est possible par un retrait du cône égalisateur (FFF) qui entraîne un dépôt de dose non homogène. Cependant, si la zone d'irradiation se limite à une petite surface (de l'ordre du centimètre) le faisceau est considéré comme homogène (Figure 11). Cette approche peut être utilisée en radiothérapie stéréotaxique pour l'irradiation de petits volumes à fort débit de dose.

Depuis 2016, les irradiations à très haut débit de dose (ou irradiations FLASH) ont un intérêt de plus en plus important pour les acteurs en radiothérapie. Ce sont des méthodes d'irradiation permettant de délivrer des doses cliniques (entre 2 et 15 Gy) en un temps très court grâce à des débits supérieurs à 40 Gy/s (Favaudon et al., 2014) et pouvant aller jusqu'à quelques centaines de Gy/s (Favaudon et al., 2015; Fouillade et al., 2017). Cependant, ces pratiques ne

sont pas utilisées en clinique par manque de connaissances des mécanismes biologiques mis en jeu. L'irradiation FLASH apparaît être une technique qui diminue les dommages aux tissus sains après une irradiation chez les souris au niveau pulmonaire (Favaudon et al., 2014; Fouillade et al., 2019) ou encore chez le cochon et le chat au niveau cutané et nasal respectivement (Vozenin et al., 2019). En 2019, un premier patient atteint d'un lymphome cutané résistant a été traité par radiothérapie FLASH (Bourhis et al., 2019). Ce patient a d'abord bénéficié d'une radiothérapie conventionnelle qui s'est avérée inefficace. L'irradiation FLASH a entraîné chez ce patient un œdème et une épithélite (inflammation de l'épithélium qui se recouvre d'un voile blanc) des tissus autour de la tumeur 3 semaines après l'irradiation. La réponse tumorale est rapide, complète et durable sur les 5 mois suivant la radiothérapie FLASH (Bourhis et al., 2019).

En conclusion, les techniques de radiothérapie ne cessent d'évoluer avec notamment l'amélioration balistique permettant une optimisation de la distribution de la dose à la tumeur mais aussi une évolution des modalités de délivrance de la dose permettant de s'adapter aux variations anatomiques du patient.

Chapitre 2 : Effets biologiques des rayonnements ionisants.

Malgré les avancées techniques et technologiques de la radiothérapie grâce à l'amélioration balistique, les effets indésirables continuent à apparaître après un traitement. Ce chapitre permet de faire un état de l'art non exhaustif des connaissances actuelles sur les effets biologiques suite à une exposition aux rayonnements ionisants chez les mammifères comme l'homme, en particulier au niveau du tissu sain.

L'irradiation génère un enchaînement d'évènements allant du dépôt d'énergie jusqu'à l'apparition et le développement des effets biologiques sur les tissus exposés (Figure 18). Pour faire face au stress radio-induit, les organismes provoquent des réponses transitoires au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire (Azzam et al., 2012). Une mauvaise réparation des dommages au niveau moléculaire et cellulaire peut conduire à l'apparition de dysfonctions tissulaires pouvant mener à l'installation d'une pathologie chronique (Bartling, 2013).

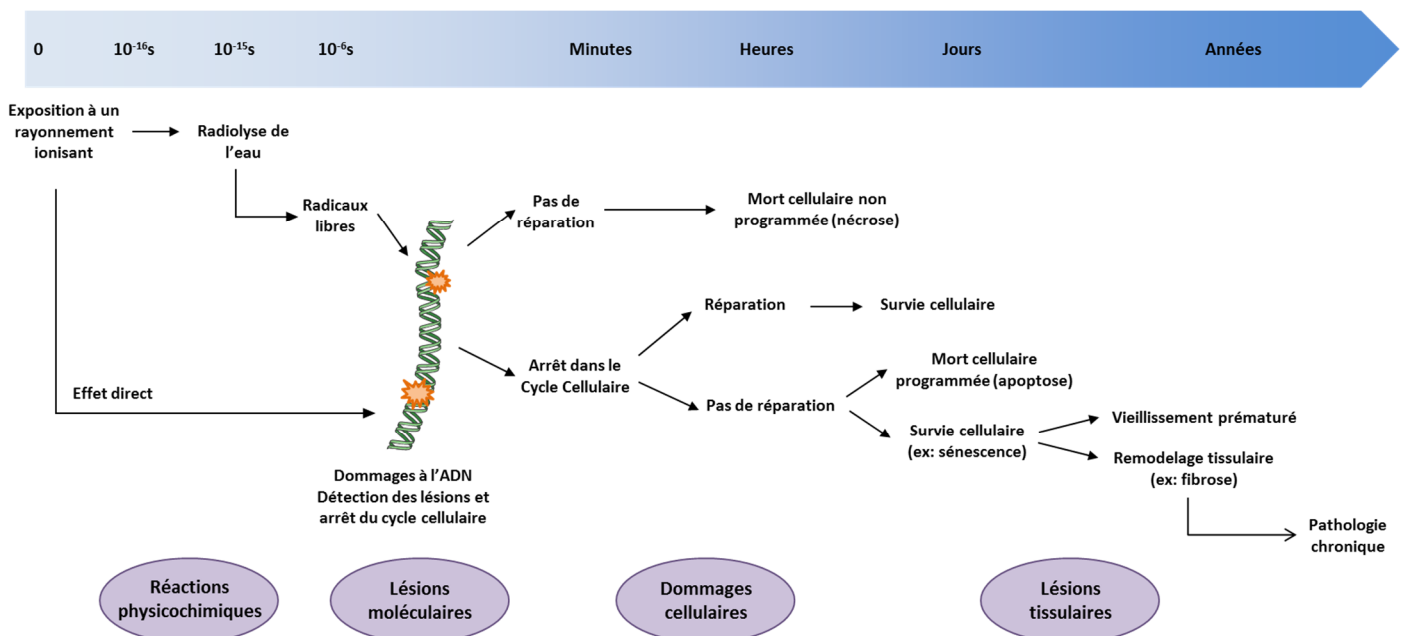


Figure 18 : Apparition des effets biologiques radio-induits en fonction du temps
 Inspirée de (Vogin, 2011; Bartling, 2013).

I. Effets physico-chimiques et lésions moléculaires

Les dommages induits par les rayonnements ionisants sont la conséquence de phénomènes physiques et physico-chimiques se produisant d'une manière directe ou indirecte dans des délais très brefs (de l'ordre de 10^{-12} secondes). Les rayonnements peuvent interagir directement avec les composants cellulaires comme la molécule d'ADN. Les dommages indirects sont quant à eux causés par les radicaux libres résultant de la radiolyse de l'eau se trouvant dans la cellule (Azzam et al., 2012). Les radicaux libres produits transfèrent leur énergie dans l'environnement cellulaire ce qui produit des modifications des macromolécules comme l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines (Hur et al., 2017). Ensemble, les effets directs et indirects des rayonnements déclenchent une cascade de signalisation biochimique et moléculaire qui peut réparer les dommages ou aboutir à des changements génétiques et physiologiques permanents (Spitz et al., 2004).

A. Stress oxydatif et génération d'espèces réactives

Lors d'une ionisation (voir chapitre 1), l'atome se retrouve avec un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés à un électron de spin opposé) qui sont désignés sous le terme de radicaux libres. Naturellement, les électrons auront tendance à interagir avec des électrons d'atomes voisins afin de créer des liaisons covalentes stables. Cette capacité confère aux radicaux libres une grande instabilité et une haute réactivité chimique leur permettant de déclencher une propagation en chaîne d'espèces radicalaires appelée cascade radicalaire (Figure 19). Les radicaux libres les plus communs sont le radical hydroxyle HO° et hydrogène H° . Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'eau, étant donné que le corps humain est composé de $2/3$ d'eau. Une augmentation de la concentration des radicaux libres (HO° et H°) entraîne la formation de molécules d'hydrogène ($\text{H}^\circ + \text{H}^\circ \rightarrow \text{H}_2$), d'eau ($\text{H}^\circ + \text{OH}^\circ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$) et d'eau oxygénée ($\text{OH}^\circ + \text{OH}^\circ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$). Ce dernier est très toxique pour les cellules (Frippiat et al., 2001) et en fonction de sa concentration entraîne une mort cellulaire par apoptose ou induit de la sénescence (Bladier et al., 1997).

Les radicaux libres peuvent également réagir avec l'oxygène du milieu en créant des radicaux libres superoxydes ($e^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\circ-}$) ou hyperoxydes ($\text{H}^\circ + \text{O}_2 \rightarrow \text{OOH}^\circ$). Ce dernier est à l'origine de la formation d'eau oxygénée en plus grande quantité ($2\text{OOH}^\circ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ou $\text{OOH}^\circ + \text{H}^\circ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$). Les radicaux libres possédant un atome d'oxygène O sont appelés les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS, *Reactive Oxygen Species*). Les ERO induisent

plusieurs effets comme l'oxydation des macromolécules biologiques (peroxydation des lipides et oxydation des protéines développées par la suite dans le manuscrit) ou encore l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Reisz et al., 2014; Hur & Yoon, 2017).

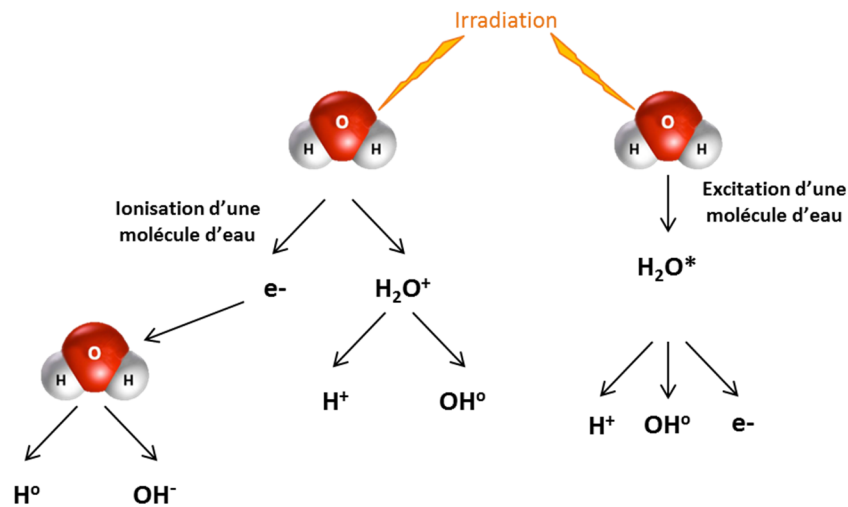


Figure 19 : Ionisation et excitation des molécules d'eau suite à l'irradiation

Par ailleurs, les rayonnements ionisants peuvent stimuler l'activité de la synthèse d'oxyde nitrique (NOS, *Nitric Oxide Synthase*) dans les cellules lésées, générant ainsi de grandes quantités d'oxyde nitrique $^{\circ}NO$. On parle d'espèces réactives de l'azote (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) (Azzam et al., 2012). Bien que l'oxyde nitrique soit chimiquement inerte envers la plupart des constituants cellulaires (sauf pour l'hème), il réagit avec le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) pour former l'anion de peroxynitrite ($^{\circ}NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$). Ce dernier, tout comme les radicaux hydroxyles, est également très réactif et capable d'attaquer un large éventail de cibles cellulaires, y compris les lipides, les thiols, les protéines et les bases de l'ADN (Reisz et al., 2014).

Dans toutes les cellules, il existe des réactions produisant des radicaux libres physiologiquement qui sont identiques à ceux synthétisés lors d'une radio-exposition. Les cellules possèdent alors des enzymes comme la superoxyde dismutase, les peroxydases et les catalases pouvant la détoxifier et éliminer les radicaux libres. Ces derniers sont responsables de la majorité des dommages cellulaires radio-induits. Lorsque les effets indésirables/nocifs sont plus importants que les processus biochimiques homéostatiques, les changements biologiques radio-induits persistent et peuvent être propagés aux autres cellules (Azzam et al., 2012). Cependant, des changements oxydatifs peuvent continuer à se produire pendant des jours et des mois après l'exposition initiale probablement en raison de la génération continue d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène (Petkau, 1987).

B. Cible majeure de l'irradiation et du stress oxydatif : la molécule d'ADN

1. Dommages radio-induits au niveau de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule présente dans toutes les cellules eucaryotes. Elle est constituée de deux chaînes enroulées l'une autour de l'autre, contenant l'intégralité de l'information génétique. Chaque brin est constitué d'une succession de nucléotides qui sont composés d'un phosphate, d'un sucre (désoxyribose) et d'une base azotée. Les bases sont soit puriques (guanine G, adénine A) soit pyrimidiques (cytosine C, thymine T). Des liaisons hydrogène assurent l'appariement et la liaison covalente entre les bases. Les ERO (plus particulièrement le radical hydroxyle) sont responsables des dommages radio-induits au niveau de l'ADN (Reisz et al., 2014). En raison de sa nature électrophile, le radical hydroxyle se fixe sur les sites de doubles liaisons de purines et de pyrimidines ayant une plus forte densité d'électrons (Dizdaroglu, 2015). Les dommages radio-induits au niveau de la molécule d'ADN (Figure 20) sont classés en trois catégories :

- Les **modifications de bases** provoquées par l'hydroxylation des doubles liaisons entre les nucléotides ou par l'addition d'aldéhydes provenant de la décomposition de produits d'oxydation radio-induits de lipides membranaires. On retrouve aussi les pertes de bases suite à la rupture de la liaison N-glycosidique entraînant une séparation du nucléotide et du complexe sucre-phosphate ;
- Les **pontages à l'ADN** (ou *cross-links*) concernent la formation de liaisons intrabrins entre les nucléotides, ou la formation de liaisons covalentes interbrins, ADN-ADN et ADN-protéine ;
- Les **cassures** simple ou double brin à l'ADN. La cassure simple brin (SSB, *Single Strand Break*) est caractérisée par un écart entre les extrémités du brin suite à la rupture causée par la pénétration des molécules d'eau. La cassure double brin (DSB, *Double Strand Break*) est caractérisée par une rupture simultanée des deux brins d'ADN. De plus, deux cassures simple brin à une distance de moins de 30 paires de base sont apparentées à une cassure double brin (Gambini & Granier, 2007).

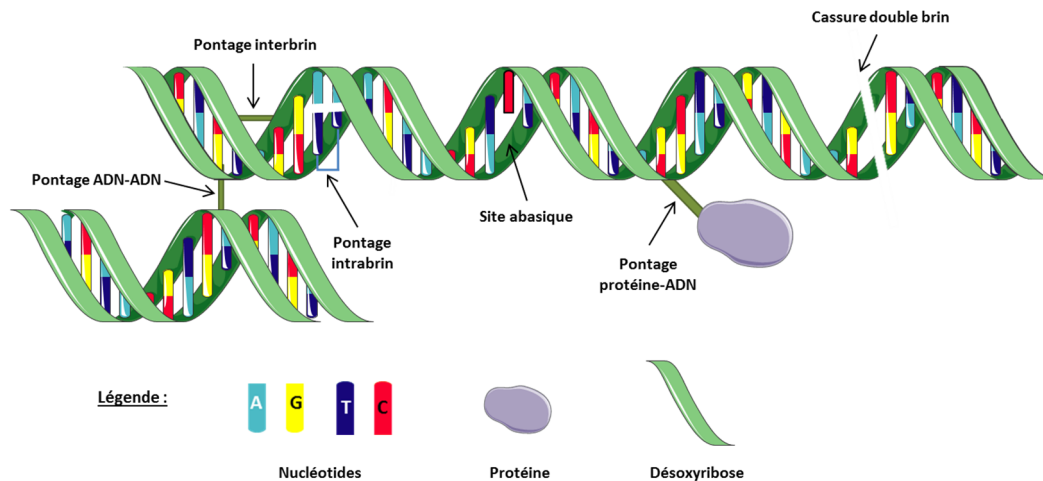


Figure 20 : Schéma récapitulatif des dommages radio-induits au niveau de l'ADN
 Inspiré de (Hoeijmakers, 2001; Gambini & Granier, 2007).

Le type de la lésion au niveau de l'ADN dépend de la densité d'énergie aléatoirement déposée dans la matière par le rayonnement ionisant. En effet, plus la densité d'énergie déposée est importante, plus la lésion est complexe et le dommage créé lent à réparer (Joubert et al., 2007). Lors d'une irradiation, les cassures double brin, induites par un fort dépôt d'énergie, sont moins nombreuses que les dommages de bases, induits par un plus faible dépôt (Tableau II). Une heure après l'irradiation, toutes les modifications de bases, les cassures simple brin et plus de la moitié des cassures double-brin sont réparées (Viau et al., 2016).

La plupart des études se concentrent essentiellement sur les cassures double brin qui sont considérées comme la principale cause de mort radio-induite des cellules (Joubert & Foray, 2007). Au cours d'une cassure double-brin, la lésion est reconnue par un hétérodimère Ku (protéines Ku70 et Ku80) auquel s'ajoute l'enzyme DNA-PK conférant au complexe une activité kinase. Cette activité enzymatique permet la phosphorylation de la sous-unité H2AX de l'histone devenant γ H2AX qui forme des foci dans le noyau, le nombre de ces foci étant proportionnel au nombre des cassures double-brin (Joubert & Foray, 2007). Suite à l'irradiation, la formation des foci se nomme IRIF (*Ionizing Radiation Induced Foci*). La plupart des foci sont réparés dans les 24 h suivant l'irradiation (Li et al., 2018). L'immunofluorescence permet de quantifier et détecter la localisation nucléaire des protéines γ H2AX suite à une irradiation allant de 1 mGy à 10 Gy (Joubert & Foray, 2007). Cependant, toutes les cassures double brin ne sont pas marquées par immunofluorescence puisque le nombre de foci mis en évidence varie en fonction de la technique utilisée et est manipulateur dépendant (Redon et al., 2009).

	Dommages de bases	Cassure simple-brin	Cassure Double-brin	Pontage ADN-ADN
Incidence (par Gy absorbé)	1000 à 10000	1000	40	30
Reconnaissance des dommages	ATR	ATR	ATM	ATM
Temps moyen pour 50% de réparation	< 10 min	10 – 20 min	50 min à 4 h	
Système de réparation	BER	BER	HR et NHEJ	NER

Tableau II : Nombre et spécificité des dommages radio-induits à l'ADN

Les valeurs correspondent à une irradiation aux rayons X d'une tension de 200 kV. ATR: *ATM-Rad3-related*; ATM: *Ataxia telangiectasia-mutated*; BER: *Base Excision Repair*; HR: *Homologous recombination*; NHEJ: *Non Homologous End-Joining*; NER: *Nucleotide Excision Repair*. Inspiré de (Houtgraaf et al., 2006; Joubert & Foray, 2007; Viau et al., 2016).

Physiologiquement, plusieurs dommages à l'ADN se produisent en continu au niveau cellulaire sans toutefois conduire à un impact sur la santé de l'individu. En effet, pour maintenir l'intégrité génomique, les cellules détectent en permanence les signaux de dommages à l'ADN, induisent des mécanismes enzymatiques et donc l'activation des systèmes de réparation de l'ADN en réponse à ces dommages.

2. Réponses aux dommages à l'ADN

Les dommages directs ou indirects au niveau de l'ADN entraînent une cascade de signalisation intracellulaire complexe appelée réponse aux dommages à l'ADN (DDR, *DNA Damage Reponse*). Les DDR comprennent les événements qui coordonnent la réparation de l'ADN, la régulation de la réplication de l'ADN, les points de contrôle du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine ainsi que l'apoptose (Hur & Yoon, 2017). Les protéines sérine/thréonine kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM-Rad3-related*) sont au centre des voies de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN (Figure 21). La protéine ATM est essentiellement impliquée pour les réparations des cassures double brin contrairement à ATR qui est essentiellement induite par les cassures simple brin causées par la réplication de l'ADN et le stress lié aux oncogènes. Ces deux voies de signalisation agissent en

parallèle pour contrôler la réparation des cellules exposées aux rayonnements ionisants (Iliakis et al., 2003).

En plus des protéines permettant la détection des lésions à l'ADN et des transducteurs (ATM et ATR), des protéines effectrices comme Chk1 et Chk2 participent à la cascade de signalisation. Ces protéines ont une activité sérine/thréonine kinase, qui, par phosphorylation, agit sur plusieurs voies de signalisations impliquées dans différents processus biologiques comme le cycle cellulaire, la sénescence ou encore la mortalité cellulaire (Iliakis et al., 2003).

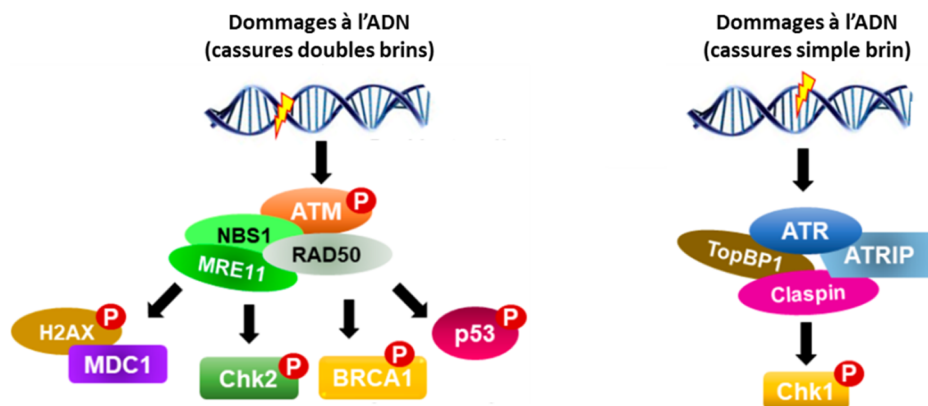


Figure 21 : Transducteurs ATM et ATR
(Hur & Yoon, 2017).

3. Mécanismes de réparation de l'ADN

Pour assurer une stabilité génique, la réparation des dommages radio-induits à l'ADN commence 1 ms après l'irradiation (Reisz et al., 2014). Les lésions à l'ADN directes et indirectes, induites par le stress oxydatif, sont généralement réparées par excision de base (BER, *Base Excision Repair*) et, dans une moindre mesure, par excision de nucléotide (NER, *Nucleotide Excision Repair*). La réparation par excision de base (BER) reconnaît et restaure les modifications de base, les sites abasiques et les ruptures simple-brin (SSB) (Hoeijmakers, 2001). Lorsqu'une base est endommagée, elle est reconnue et clivée par des glycosylases au niveau du sucre-phosphate ce qui entraîne la formation d'un site abasique (Figure 22, étape I). Le site abasique peut également apparaître spontanément suite à l'hydrolyse de l'eau via l'interaction du radical hydroxyle sur la molécule d'ADN. L'endonucléase APE1 reconnaît et incise le brin au niveau du site abasique (Figure 22, étape II). Les cassures simple-brin sont reconnues par la polymérase PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*) et la protéine d'échafaudage XRCC1 (*X-ray Repair Cross Complementing protein 1*) qui induisent le recrutement de la kinase PNK (*Polynucleotide Kinase*) pour protéger et faciliter la synthèse de réparation (Figure 22, étape III).

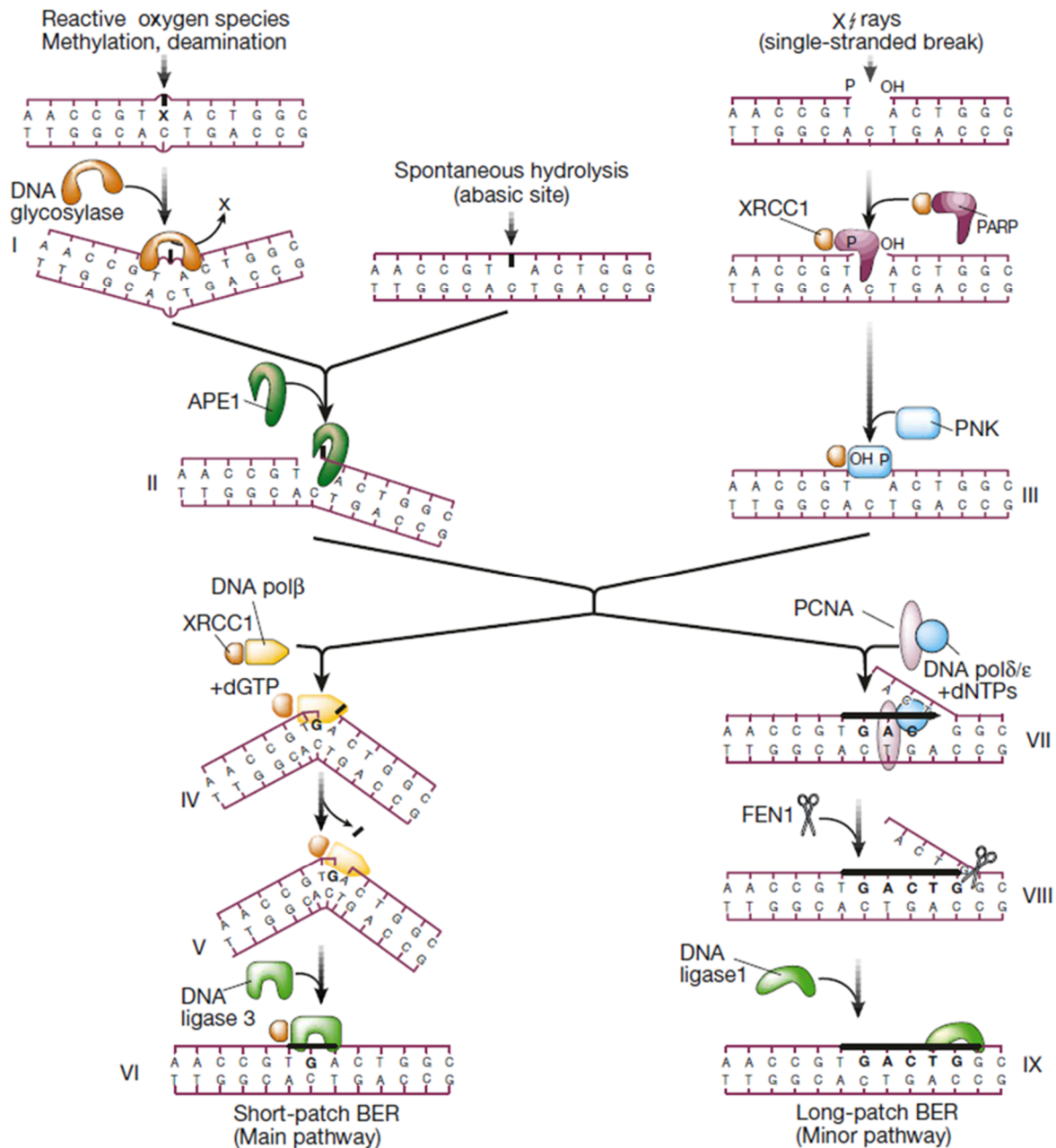


Figure 22 : Mécanisme de la réparation par excision de base (BER)
(Hoeijmakers, 2001).

Suite à la libération d'un site abasique résultant d'une modification de base ou d'une cassure simple-brin, il existe la réparation dite à courte distance (*short-patch BER*) qui est la plus observée et la réparation à patch long (*long-patch BER*) plus rare (Hoeijmakers, 2001). Pour la réparation à courte distance, l'ADN polymérase β et XRCC1 comblent l'espace pour assurer la synthèse du nucléotide complémentaire (Figure 22, étape IV) puis enlèvent le résidu de sucre à l'extrémité 5' par l'intermédiaire de son activité de lyase (Figure 22, étape V). Pour finir, l'ADN ligase 3 s'associe avec XRCC1 pour catalyser la formation d'une liaison phosphodiester afin de suturer les deux extrémités de l'ADN. Concernant la réparation à patch

long, l'espace est comblé par un complexe comprenant l'ADN polymérase β , la polymérase δ/ϵ et PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) pour la synthèse allant de 2 à 10 bases (Figure 22, étape VII). L'endonucléase FEN1 clive ensuite les bases surnuméraires et l'ADN ligase 1 scelle les deux extrémités du brin d'ADN (Figure 22, étapes VIII et IX).

Les pontages à l'ADN inter- et intra-brins ainsi que les distorsions de la double hélice sont généralement réparés par excision de nucléotide (NER). Le processus de NER est le plus polyvalent en termes de réparation à l'ADN. Il existe 2 mécanismes de NER : la NER globale du génome (GG-NER, *Global genome NER*) qui est utilisée suite aux dommages radio-induits par les UV et la réparation couplée à la transcription (TCP, *Transcription Coupled Repair*) qui assure la réparation des dommages aux UV et au stress oxydatif (Hoeijmakers, 2001; Houtgraaf et al., 2006). Ce dernier mécanisme est activé lorsque l'ADN polymérase II est bloqué au moment de la transcription ce qui entraîne le recrutement de plus de 25 protéines pour restaurer le brin d'ADN (Hoeijmakers, 2001).

En plus des dommages de base, des cassures simple-brin et des pontages à l'ADN, il existe des dommages génotoxiques plus complexes : les cassures double-brin (DSB). Tout d'abord, ces dommages peuvent être réparés par la recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombination*). La HR est une voie permettant d'assurer la stabilité du génome, pendant la transition entre la phase S et G2 du cycle cellulaire, car elle conduit à la réparation précise des dommages à l'ADN en utilisant la chromatide sœur non endommagée (Hoeijmakers, 2001). Ces dommages peuvent également être réparés par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, *Non Homologous End Joining*). Cette voie de réparation est moins précise car les extrémités de l'ADN sont modifiées avant leur liaison à l'ADN, ce qui peut entraîner des suppressions ou insertions au niveau de la cassure double brin (Figure 23).

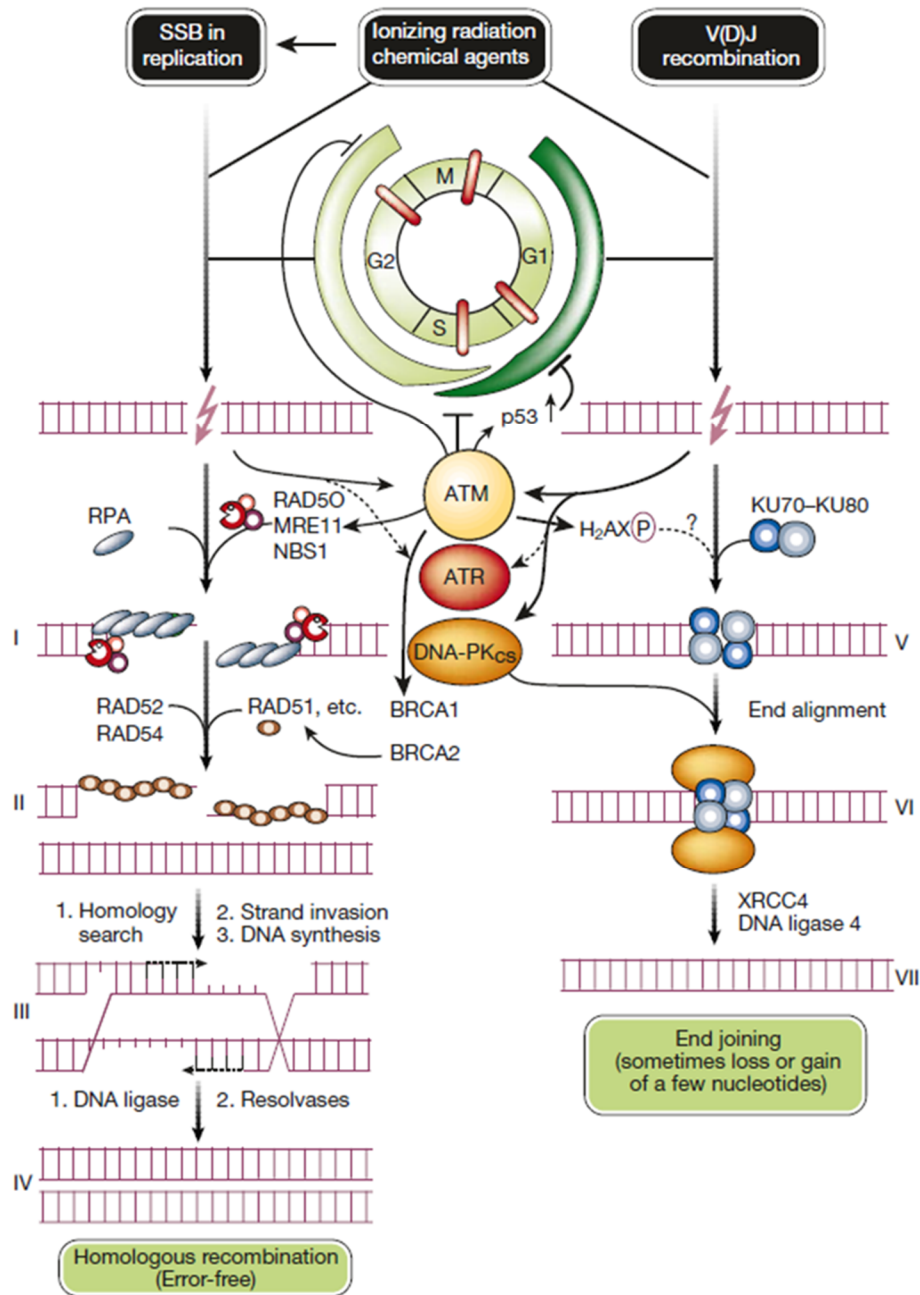


Figure 23 : Mécanisme de recombinaison homologue (HR) et jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)
(Hoeijmakers, 2001).

Enfin, une dernière voie de réparation par jonction d'extrémités alternative (Alt-EJ, *Alternative End Joining*) a été décrite. Cette voie agit comme un mécanisme de réparation de secours de la voie NHEJ. Cependant, elle entraînerait une augmentation de l'instabilité chromosomique (Herskind et al., 2017). En effet, elle supprime les extrémités d'ADN qui n'ont pas été réparées. Cette voie serait favorisée pour de fortes doses d'irradiation lorsque les voies HR et NHEJ sont saturées notamment chez les cellules de hamster chinois (V79) irradiées à 14,3 Gy contrairement à 5,7 Gy (Herskind et al., 2017).

Les différents mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN permettent d'en assurer la suppression et d'éviter la transmission d'erreurs dans le code génétique des cellules filles (Hur & Yoon, 2017).

C. Autres conséquences du stress oxydatif

1. Lésions des protéines

Le stress oxydatif peut altérer les protéines par l'oxydation directe des acides aminés cystéines et méthionines (Reisz et al., 2014), ainsi que par une carbonylation. L'oxydation reste réversible pour la plupart des acides aminés sous l'action d'oxydoréductases, mais certaines d'entre elles sont irréversibles par la formation de liaisons covalentes (Alderson et al., 2006). De plus, ces modifications entraînent un changement conformationnel de la protéine, déstabilisant les interactions protéine-protéine. Il en résulte une dénaturation, une fragmentation, une formation d'agrégats ou un défaut de repliement de la protéine entraînant une perte de fonction (Reisz et al., 2014). La carbonylation des protéines correspond à l'ajout d'une fonction carbonyle à la chaîne d'acides aminés particulièrement sur les lysines, cystéines et histidines. Elle peut avoir lieu suite à l'ajout des produits d'oxydation lipidique (voir partie suivante). A ce jour, la carbonylation est considérée comme irréversible. En effet, aucun processus de réparation de ces lésions n'a été mis en évidence et la dégradation des protéines carbonylées semble être le seul moyen de régulation du protéome au niveau cellulaire (Reisz et al., 2014).

2. Lésions des lipides

Une autre cible des ERO est la couche lipidique de la membrane cellulaire. En effet, ces lipides membranaires sont fortement exposés à l'environnement aqueux de la cellule et donc aux ERO produits suite à une irradiation (Reisz et al., 2014). La peroxydation est une réaction en chaîne induite par l'attaque de radicaux hydroxyles sur les acides gras polyinsaturés (PUFAs, *PolyUnsaturated Fatty Acids*). Elle entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire ainsi qu'une altération de l'activité des protéines associées à la membrane. Les dommages au niveau de la membrane lipidique peuvent être indirects via les radicaux libres mais aussi directs. Les principaux effets radio-induits au niveau de la membrane concernent les changements dans l'organisation et/ou la composition du glycocalyx (Somosy, 2000). Les altérations induites par les radiations au niveau de l'organisation et la fonction des membranes cellulaires jouent un rôle

important dans le développement de lésions précoces. L'oxydation des lipides concerne à la fois les lipides membranaires et circulants. Ces derniers deviennent des LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxydés participant à des processus physiopathologiques divers tels que la formation des plaques d'athérome dans les maladies cardiovasculaires (Gimbrone et al., 2016). L'oxydation des lipides entraîne également la formation d'aldéhydes qui sont capables de se lier aux protéines et d'altérer leur fonction (Reisz et al., 2014).

Dans ce contexte, la progression des dommages causés par les rayonnements ionisants au niveau cellulaire implique probablement des réactions persistantes de peroxydation lipidique qui se combinent avec l'inactivation des protéines (Somosy, 2000).

II. Réponse cellulaire aux rayonnements ionisants

La réponse cellulaire est caractérisée par une modification de l'expression génique des facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN et l'organisation cellulaire. De plus, les cellules stimulent d'autres voies de signalisation en réponse au stress environnant. Elles peuvent activer des voies de mort cellulaire ou encore d'arrêt du cycle cellulaire afin de maintenir leur intégrité génomique.

A. Changement de l'organisation cellulaire

Les recherches récentes montrent que l'irradiation n'entraîne pas uniquement des dommages de l'ADN, des lipides et des protéines mais impacte également la morphologie des cellules et leurs compartiments cellulaires comme la mitochondrie, le lysosome, le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi que ce soit sur des cellules saines ou tumorales.

1. Membrane nucléaire

L'irradiation peut induire des altérations de la membrane nucléaire par un rapide gonflement réversible du noyau pour différents types de cellules irradiées *in vivo* et *in vitro*. Ce gonflement apparaît 30 à 60 min après l'irradiation de fibroblastes humains et peut persister plusieurs jours ou semaines (Somosy, 2000). Plusieurs études montrent également que les cellules réagissent à l'irradiation par une condensation de la chromatine sur la lamina nucléaire ainsi que par la formation d'agrégats de chromatine *in vitro*. Le nombre de nucléoles peut augmenter de manière significative, ce qui peut être lié à l'augmentation de l'activité

transcriptionnelle du noyau (Somosy, 2000). Pendant plusieurs années, l'interaction des rayonnements avec le noyau cellulaire a été considérée comme le principal mécanisme responsable des effets génotoxiques de l'irradiation alimentant les fondements de la radiobiologie (Reisz et al., 2014). Cependant, d'autres composants de la cellule sont altérés suite à une irradiation et participent à la réponse cellulaire radio-induite.

2. Membrane cellulaire

Les rayonnements ionisants peuvent induire d'autres altérations morphologiques visant les membranes cellulaires telles que le développement de cellules géantes qui se produisent dans plusieurs types cellulaires après une exposition à des fortes doses d'irradiation. Par exemple, l'apparition de cellules géantes est un événement dépendant de la dose dans l'intestin grêle irradié et ces cellules peuvent être détectées après irradiation à des doses modérées ou élevées (Rubio et al., 1996). Les principaux signes radio-induits de la perturbation de la membrane sont les changements dans l'organisation et/ou la composition du glycocalyx manifestées sous forme d'altérations de la quantité et/ou de la distribution des composants membranaires chargés négativement comme l'acide sialique ainsi que des sites de liaison au calcium et lectine (Somosy et al., 1986).

3. Lysosomes

Les lysosomes sont des organites impliqués dans le métabolisme cellulaire, l'immunité et la régulation de sécrétion hormonale (Wang et al., 2018). Suite à l'irradiation, le nombre et le volume lysosomal augmentent dans les cellules. Au même moment, les enzymes lysosomales (notamment des hydrolases) peuvent apparaître dans le cytosol et les sécrétions extracellulaires, ce qui entraîne une digestion et une désintégration de la cellule (Azzam et al., 2012). L'augmentation du volume lysosomal peut s'expliquer par la diminution du taux de dégradation protéique qui induit alors une surcharge au niveau du compartiment lysosomal. Certains auteurs pensent que la dérégulation de la libération d'enzymes lysosomales, notamment après une irradiation, entraîne la mort cellulaire comme la nécrose (Somosy, 2000; Negroni et al., 2015). De plus, il a été montré qu'une augmentation de l'activité β -galactosidase dans les lysosomes entraîne un processus de sénescence (Lee et al., 2006) qui sera développé dans la suite de ce manuscrit.

4. Réticulum endoplasmique et Golgi

Le RE est responsable de la synthèse des protéines cellulaires. Lors d'une irradiation il subit une dilatation, une vésicularisation, une fragmentation des cisternae et une dégranulation de sa membrane (pour le rER : RE rugueux). Ces modifications morphologiques participent au stress du RE après irradiation qui peut conduire à la mort cellulaire par apoptose dans les cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaines (PAEC, *Pulmonary Artery Endothelial Cells*) Panganiban et al. (2013). A la suite de la synthèse, les protéines transitent par le Golgi qui est responsable de leur maturation. Après l'irradiation, l'appareil de Golgi se fragmente en petites vésicules qui se dispersent dans le cytoplasme (Figure 24). Des études suggèrent que cette modification est liée à la destruction radio-induite du cytosquelette (Somosy, 2000).

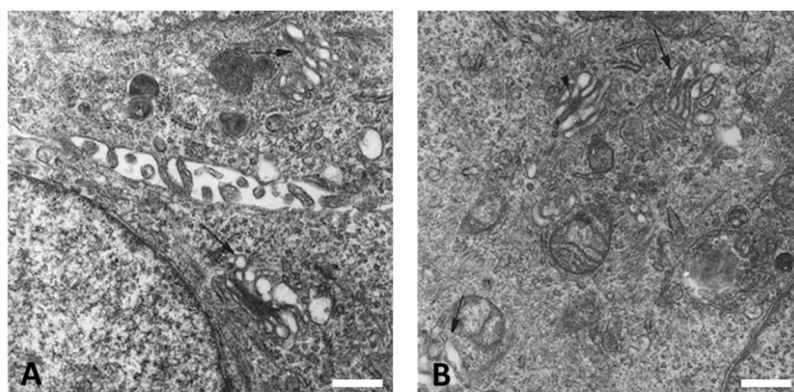


Figure 24 : Modifications radio-induites de la structure de l'appareil de Golgi

Les cellules d'adénocarcinome de colon humain (HT-29) ont été irradiées. A : cellule non irradiée, Golgi avec des saccules peu dilatés entourés par des petites vésicules. B : cellule irradiée, vacuolisation et fragmentation du Golgi. Les flèches noires montrent l'appareil de Golgi. La barre d'échelle blanche correspond à 0,5 μm . (Somosy, 2000).

5. Mitochondrie

Les mitochondries ont longtemps été considérées comme des cibles intracellulaires directes des rayonnements ionisants. Physiologiquement, les mitochondries consomment environ 90 % de l'oxygène corporel (Azzam et al., 2012) et pour cette raison les ERO y sont continuellement produites à une quantité relativement élevée par rapport aux autres compartiments cellulaires. Elles sont constituées de deux membranes avec de longues crêtes arrangées en parallèle (Figure 25-A). Suite à l'irradiation, la concentration des ERO augmente considérablement ce qui entraîne des modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries (Somosy, 2000) notamment par une vacuolisation, un allongement et une augmentation de leur taille ainsi qu'une perturbation des membranes internes et externes impactant le potentiel de membrane (Figure 25). De plus, la dérégulation de la fonction mitochondriale, plus précisément au niveau

de la chaîne respiratoire, est caractérisée par une perturbation des réactions d'oxydoréduction qui participent à l'augmentation de la concentration des ERO dans l'environnement cellulaire après irradiation. Enfin, la dysfonction radio-induite du mécanisme d'importation de protéines mitochondriales peut amplifier le stress oxydatif et conduire à des effets tardifs sur la santé, y compris les maladies dégénératives ou portant sur des troubles métaboliques (Azzam et al., 2012).

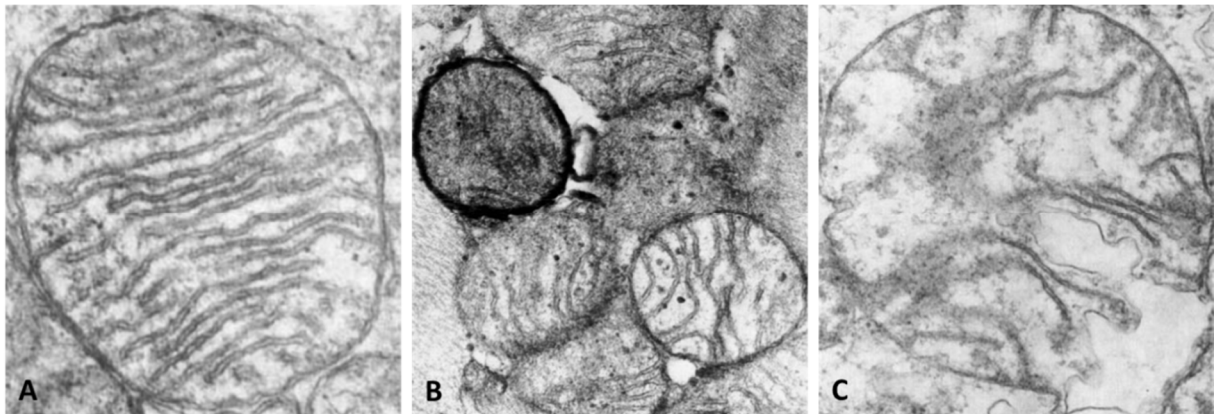


Figure 25 : Altération de la structure mitochondriale suite à une irradiation

Des lapins (*albino short haired*) ont eu une irradiation cardiaque aux rayons X à la dose de 3000 Rad (= 30 Gy). Des coupes histologiques permettent d'observer les mitochondries au niveau cardiaque. A : Mitochondrie non irradiée (grossissement x43 000) ; B : Mitochondrie 1h après irradiation avec une membrane dense et des crêtes irrégulières ; C : Mitochondrie 2 jours après irradiation avec une rupture de la membrane externe (grossissement x 44 500). (Maeda, 1982).

Cependant, l'irradiation ne perturbe pas uniquement la structure des cellules telles que les membranes ou les organites mais interfère aussi avec la transduction du signal et la régulation de fonctions cellulaires comme la communication, la prolifération, la sénescence et la mortalité cellulaire.

B. Impact sur les fonctions cellulaires

1. Communication cellulaire

Les signaux radio-induits transitent entre deux cellules normales ou tumorales ainsi qu'entre une cellule normale vers une cellule tumorale, et ce, dans les deux sens. Ce phénomène, appelé effet bystander (RIBE, *Radiation-Induced Bystander Effect*), explique les effets radio-induits observés sur des cellules qui n'ont pas été directement irradiées (Jelonek et al., 2016). Les exosomes sont notamment des vésicules impliquées dans la communication intercellulaire et apparaissent donc comme un acteur clé dans l'effet bystander observé suite à une irradiation (Jelonek et al., 2016). Leur formation et sécrétion, régulées par la voie p53, sont augmentées en

fonction de la dose et du temps post-irradiation (Yu et al., 2006). Suite à la sécrétion de cytokines (IL-8, TGF- β , TNF- α), les exosomes produits par les cellules irradiées induisent une inflammation chez les cellules receveuses (Jelonek et al., 2016).

2. Cycle cellulaire

La division cellulaire consiste en 2 processus consécutifs : la réplication/duplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes répliqués dans les deux cellules filles. Elle se divise en deux phases : la mitose (M) correspondant à la division nucléaire et l'interphase, elle-même subdivisée en 3 phases : G₁, S et G₂. Les cellules en G₁ peuvent avant la réplication de l'ADN entrer en phase de quiescence G₀. Le cycle cellulaire est contrôlé par plusieurs mécanismes (ou checkpoints) qui permettent une division cellulaire fiable. Les dommages à l'ADN, survenant après l'exposition des cellules aux rayonnements ionisants, entraînent l'activation des voies de contrôle qui inhibent la progression des cellules à travers les phases G₁ et G₂ et induisent un retard transitoire dans la progression à travers la phase S (Iliakis et al., 2003). Ce retard de prolifération permet la mise en place des systèmes de réparation cellulaire afin d'éviter les catastrophes mitotiques et la mort des cellules (Galluzzi et al., 2011). La transition d'une phase à une autre est régulée par les CDK (*Cyclin-dependant Kinase*) et les cyclines (Figure 26). Les CDK sont des sérine/thréonine kinases exprimées à différentes phases du cycle cellulaire et dégradées par le protéasome au moment du passage vers la phase suivante.

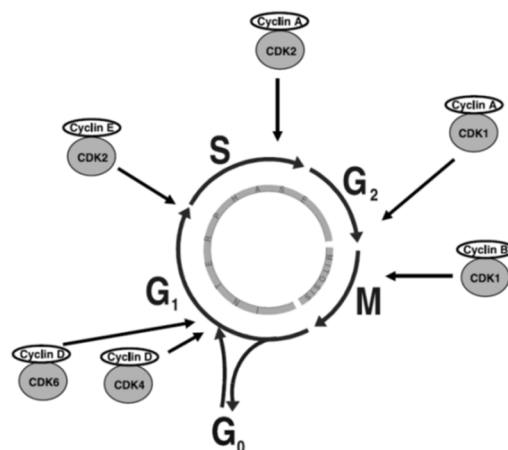


Figure 26 : Régulateurs du cycle cellulaire
CDK : *Cyclin-dependant Kinase*. (Vermeulen et al., 2003)

L'activité des CDK peut être modulée par des CKI (*CDK Inhibitor*) qui séquestrent soit les CDK seules soit les complexes CDK-cycline (Vermeulen et al., 2003). Il existe 2 familles de CKI : INK4 et Cip/Kip. Les protéines de la famille INK4 vont se fixer sur les CDK seules (CDK 4 et CDK 6), empêcher la liaison avec les cyclines en phase G₁ et ainsi bloquer leur activité.

Les protéines p15, p16, p18 et p19 font partie de cette famille. D'autre part, les protéines de la famille Cip/Kip (p21, p27 et p57) se fixent préférentiellement sur les complexes CDK-cycline et empêchent l'activité kinase. Ils agissent surtout dans la phase G1 et M. La protéine p21 est un médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la protéine p53 en réponse aux dommages à l'ADN. De plus, il a été démontré qu'un arrêt radio-induit en phase G1 de cellules humaines endothéliales est corrélé à une augmentation du facteur de transcription p53 (Baselet et al., 2017). La protéine p21 se distingue des autres CKI par sa capacité à interagir avec le PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) qui est nécessaire à la réplication et la réparation de l'ADN. Ainsi le complexe p21/CDK-Cycline/PCNA ralentit la progression dans le cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Cayrol et al., 1998).

En réponse à des dommages, la cellule peut soit les réparer soit, par exemple, activer des voies de mort cellulaire ou subir un arrêt stable de l'avancement dans le cycle cellulaire appelé sénescence.

3. Sénescence répllicative et radio-induite

Le terme sénescence s'applique aux cellules qui cessent de proliférer. La sénescence est considérée comme la cause principale du vieillissement et des pathologies liées à l'âge. Elle a initialement été caractérisée sur des cultures cellulaires *in vitro* et a été décrite plus tard *in vivo* dans plusieurs tissus (Campisi et al., 2007). Au niveau moléculaire, la sénescence résulte d'un raccourcissement des télomères lié aux cycles de division cellulaire : c'est la sénescence répllicative. Elle entraîne l'activation de la voie p53 qui est régulée négativement par une protéine ubiquitine ligase HDM2 (Figure 27). La cible de la voie p53 est la p21 qui est un facteur de transcription induisant la sénescence. p21 sert également d'intermédiaire pour un arrêt transitoire du cycle cellulaire au cours de la réparation des dommages à l'ADN par l'inhibition de l'activité kinase du complexe CDK-Cycline (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). p53 peut également stimuler l'expression de la protéine PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*) qui est pro-sénescence. La sénescence peut également être indépendante de la longueur des télomères et induite par un stress comme l'irradiation. On parle de sénescence prématurée induite par le stress (SIPS, *Stress-Induced Premature Senescence*). Au cours de la SIPS, les signaux de réponses aux dommages à l'ADN ou les oncogènes stimulent l'expression de p16 qui active la voie du rétinoblastome (via la protéine pRB, *Retinoblastoma protein*) par l'inhibition des CDK4 et CDK6 (Figure 27). Une perte de l'activité de la voie p16-pRB stimule

l'expression de p53 et p21 due à la stimulation de la protéine ARF (*alternate-reading frame protein*) par le facteur de transcription E2F (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Les cellules sénescences ont des caractéristiques phénotypiques particulières. En effet, elles acquièrent un phénotype spécifique caractérisé par une résistance aux signaux de mortalité cellulaire (particulièrement l'apoptose), un arrêt stable et définitif de la prolifération, une modification de l'expression génique, de la morphologie et un phénotype sécrétoire (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Erusalimsky, 2009). Cependant, une équipe considère que l'arrêt de la prolifération des cellules sénescences n'est pas irréversible et définitif (Reyes et al., 2018). En effet, il a été montré que certaines cellules arrêtées dans le cycle cellulaire après une irradiation sont capables de s'échapper pour repartir en prolifération. Les cellules sénescences peuvent être responsable d'une altération de la structure et de la dysfonction d'un tissu (Burton et al., 2014). Eren et al. utilisent des souris surexprimant PAI-1 qui montrent un vieillissement accéléré. Ainsi, l'inactivation de PAI-1 entraînant un retard d'induction de la sénescence cellulaire est corrélée à une augmentation de la survie *in vivo* et une préservation structurale et fonctionnelle des organes (Eren et al., 2014).

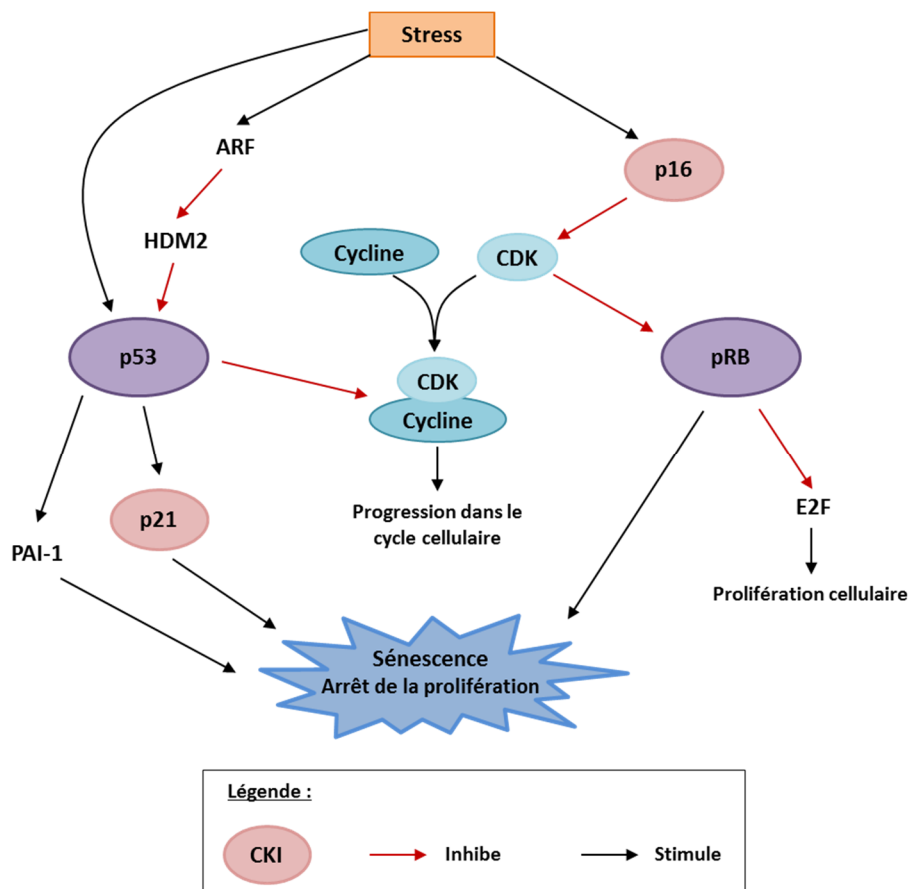


Figure 27 : Contrôle de la sénescence par les voies p53 et p16-pRB
 Inspiré de (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Burton & Krizhanovsky, 2014)

La cellule sénescence est également responsable d'une modification du microenvironnement dans lequel elle se trouve. En effet, malgré l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, les cellules sénescences restent métaboliquement actives. Les cellules sénescences acquièrent un phénotype sécrétoire appelé le SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*) (Coppe et al., 2010). Elles sécrètent des facteurs solubles comme des cytokines (IL6, IL8, CSFs...) et des facteurs de croissance (IGF, CTGF...); des protéases (MMP3, MMP10...); des protéines ou encore des composants de la matrice extracellulaire qui constituent le SMS (*Senescence Messaging Secretome*) (Coppe et al., 2010; Burton & Krizhanovsky, 2014). Enfin, les cellules sénescences ont une activité β -galactosidase augmentée (SA- β gal, *Senescence-associated β -galactosidase*). La β -galactosidase est une enzyme permettant l'hydrolyse des β -galactosides en sucre simples. La SA- β gal est un marqueur détectable par une coloration histochimique au X-gal (Figure 28) ou par cytométrie par l'intermédiaire du C₁₂FDG (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Ce marqueur est très largement et quasi systématiquement utilisé pour caractériser des cellules sénescences dans les publications (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

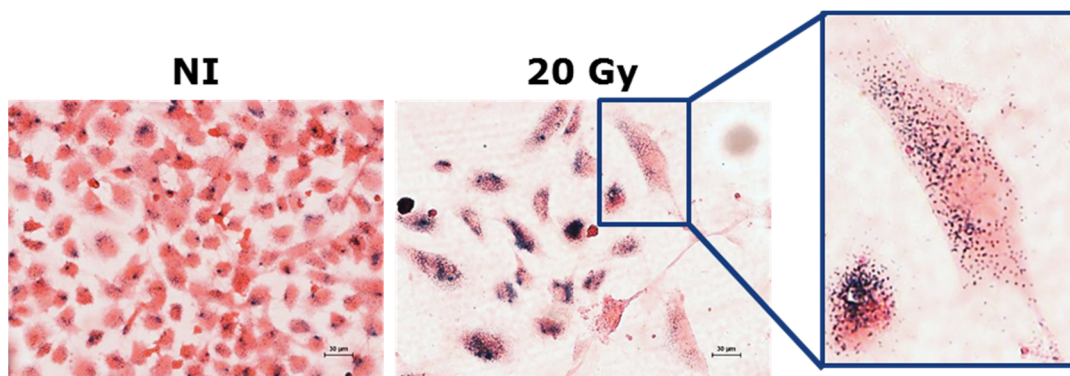


Figure 28 : Marquage au X-gal de cellules endothéliales humaines 7 jours après irradiation au LINAC

Des HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) ont été irradiées à 20 Gy (4 MV - 2,5 Gy/min) ou non (NI). Sept jours après l'irradiation, les cellules sont traitées à la Bafilomycine A1 (100 nM) et colorées au X-Gal. Le marquage bleu correspond à la coloration X-Gal qui forme des petits agrégats (zoom à droite dans l'encadré) dans le cytoplasme. La barre d'échelle représente 30 μ m. (Paget et al., 2019)

Les mécanismes de réponse au stress permettant d'amener préférentiellement la cellule vers la sénescence ou les voies de mort cellulaire sont encore flous. Ces deux voies communiquent à travers leur régulateur commun : la protéine suppresseur de tumeur p53. Le type cellulaire semble être déterminant puisque les fibroblastes et les cellules épithéliales endommagés entrent en sénescence contrairement aux lymphocytes qui ont tendance à activer l'apoptose. Plusieurs cellules sont capables d'induire ces deux réponses. La nature et l'intensité du dommage semble être des facteurs importants (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

4. Mortalité cellulaire

La mort cellulaire peut être la conséquence ultime des dommages radio-induits, soit par mort directe, soit entraînée par la non réparation des dommages. La mort cellulaire causée par l'irradiation a déjà été classée en deux classes principales, en fonction du moment de la désintégration des cellules après l'exposition à savoir la mort interphasique et la mort mitotique. La mort pendant l'interphase est définie comme une altération irréversible du métabolisme cellulaire et une dégradation des structures cellulaires. La mort mitotique survient pendant la mitose ou même plusieurs divisions après l'irradiation (Somosy, 2000). Il existe plusieurs types de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. La nature de la mort cellulaire dépend du type de cellule et du tissu irradié. La dose d'irradiation et la source de rayonnement peuvent également jouer un rôle dans la détermination du type de mort cellulaire (Olive et al., 1997).

L'apoptose est un mécanisme actif et intrinsèque sur la base de l'action concertée de protéases spécifiques (caspases) et d'endonucléases (Khodarev et al., 1998). Le processus commence dans les minutes suivant l'irradiation et dure plusieurs heures. Le rétrécissement et la fragmentation des noyaux sont les principales caractéristiques morphologiques de ce processus. De plus, une condensation de la chromatine et une dissolution des lamelles nucléaires accompagnent cette fragmentation. Les fragments de chromatine peuvent apparaître dispersés dans le cytoplasme sous la forme de micronoyaux. La cellule se brise finalement en fragments appelés corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules voisines. Des modifications de la structure et de la fonction mitochondriales se produisent également aux premiers stades de l'apoptose et peuvent précéder ou accompagner les changements nucléaires (Somosy, 2000). Les voies de signalisation impliquées dans le processus apoptotique mettent en jeu des caspases qui sont des hydrolases clivant des protéines nucléaires (lamine) ou cytosoliques (actine). L'irradiation par des rayons X induit l'apoptose par l'intermédiaire d'une augmentation de l'activation des caspases 3, 8 et 9 (Panganiban et al., 2013). L'apoptose endothéliale permet de réguler l'angiogenèse liée à la croissance tumorale mais peut également survenir pour les cellules endothéliales saines se trouvant dans le champ d'irradiation (Garcia-Barros et al., 2003; Corre et al., 2013).

D'autre part, la nécrose est un autre type de mort cellulaire pouvant être induit par l'irradiation. Elle a pour conséquence une destruction irréversible des membranes cellulaires suivie d'une altération du métabolisme cellulaire. Cette modification s'accompagne d'un gonflement mitochondrial (*swelling*) et d'une rupture lysosomale qui amène à une lyse des cellules (Somosy, 2000; Giusti et al., 2009).

La plupart des études sur les cellules cancéreuses rapportent comment le blocage ou l'induction de l'autophagie affecte leur réponse aux irradiations (Levine et al., 2008). Cependant, l'effet des rayonnements sur l'autophagie reste encore peu étudié. La régulation de l'autophagie et la tumorigénèse utilisent les mêmes voies de signalisation (Kalamida et al., 2014). En effet, plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (p53, PTEN, TSC1 et TSC2) sont impliqués dans l'inhibition de la voie TOR stimulant l'autophagie (Kalamida et al., 2014).

Fertil et Malaise ont établi un lien entre les conséquences cellulaires d'une irradiation et la réponse clinique (Fertil et al., 1981). Lorsque les cellules survivent à l'irradiation, le stress qu'elles ont subi aura également des conséquences au niveau de l'organisation et la fonctionnalité tissulaire. L'irradiation affecte les cellules tumorales en induisant des dommages à l'ADN pouvant conduire à la mort cellulaire ou la sénescence. Cependant, ces effets peuvent également être induits sur les cellules saines ce qui entraîne l'apparition de complication au niveau du tissu sain après radiothérapie.

III. Effets indésirables au niveau tissulaire

A. Généralités

Lors d'une exposition aux rayonnements ionisants, les événements post-irradiation des systèmes biologiques *in vivo* peuvent être classés comme réponses précoces, intermédiaires ou tardives (Rubio & Jalnas, 1996). Les effets précoces (aigus ou immédiats) apparaissent pendant le traitement, dans les minutes, heures ou jours après l'irradiation. Ils sont le plus souvent réversibles et temporaires (inférieurs à 6 mois) et touchent préférentiellement les tissus à prolifération rapide (peau et tractus gastro-intestinal). Par exemple, une réaction inflammatoire modérée peut être observée (par exemple au niveau intestinal) et associée à un œdème (par exemple au niveau cutané). Pour la peau, il est possible que les effets précoces se manifestent par un érythème cutané (Barnett et al., 2009). Entre 5 et 10 % des patients traités par radiothérapie développent des effets secondaires tardifs dans la zone irradiée (aussi appelés complications) plusieurs années après l'exposition. Ces effets touchent les tissus à prolifération lente (rein, cœur, système vasculaire etc) mais aussi à prolifération rapide (peau, intestin etc). Ils se caractérisent par un remodelage tissulaire, une douleur ou encore par l'apparition d'un cancer secondaire des années après le traitement sans toutefois une mise en évidence d'un lien direct avec l'irradiation (Barnett et al., 2009). Selon l'INCA, le nombre de patients traités par radiothérapie au cours de l'année 2017 s'élève à 213 722 (INCa, 2019). La majorité des

traitements par radiothérapie concerne des localisations thoraciques à au moins 32 % (Figure 29) notamment pour le traitement du cancer du sein et du poumon (INCa, 2013; INCa, 2017) ; et des localisations abdomino-pelviennes à plus de 11 % pour le traitement du cancer de la prostate, de l'appareil digestif (INCa, 2010; INCa, 2014; INCa, 2016) mais aussi pour certains cancers de l'endomètre et du col de l'utérus (INCa, 2011; INCa, 2013). Ces deux localisations (thoraciques et abdomino-pelviennes) semblent importantes en termes de nombre de patients traités au cours de l'année 2017 (INCa, 2019). La radiotoxicité aux tissus sains altère la qualité de vie des patients par l'apparition de pathologies radio-induites. Ainsi, les effets indésirables au niveau de ces deux localisations seront plus particulièrement détaillés dans les parties suivantes.

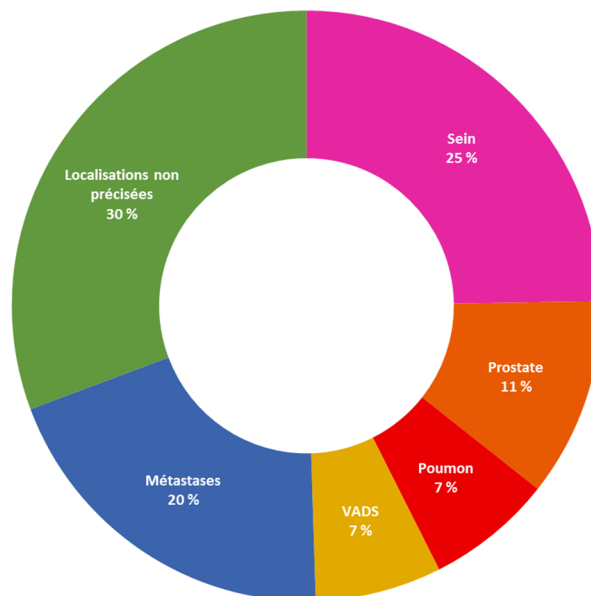


Figure 29 : Répartition du nombre de patients traités par radiothérapie en fonction de la localisation tumorale en 2017

VADS : Voies Aéro-Digestives Supérieures. (INCa, 2019)

B. Dommages radio-induits dans la zone thoracique

Les OARs dans la zone thoracique sont principalement le poumon et le cœur. Grâce à la balistique, le cœur est le plus souvent épargné lors de l'irradiation mais le poumon reste systématiquement irradié lors d'une radiothérapie thoracique.

1. Anatomie et physiologie pulmonaire

Les poumons sont les organes de la respiration indispensables aux échanges gazeux entre l'air et le sang. Ils sont également chargés de purifier l'air par élimination des particules inhalées

comme la fumée, la pollution, les bactéries et les virus ; de le réchauffer pour que sa température soit égale à celle du corps et de l'humidifier. Chez l'homme, les poumons gauche et droit sont respectivement composés de deux et trois lobes pulmonaires. Après le passage dans les voies aérodigestives supérieures (fosses nasales, nasopharynx et larynx), l'air inspiré arrive dans la trachée et les bronches souches qui aèrent le poumon au niveau du hile pulmonaire. Les bronches souches se subdivisent en bronches lobaires, sous-lobaires, segmentaires puis en bronchioles (Figure 30). Au fur et à mesure des divisions dans l'arbre bronchique, le diamètre des différents segments diminue. Les bronchioles (diamètre < 1 mm) se terminent par des sacs alvéolaires entourés par des capillaires et composés de plusieurs alvéoles pulmonaires. L'alvéole est la plus petite unité fonctionnelle dans le poumon.

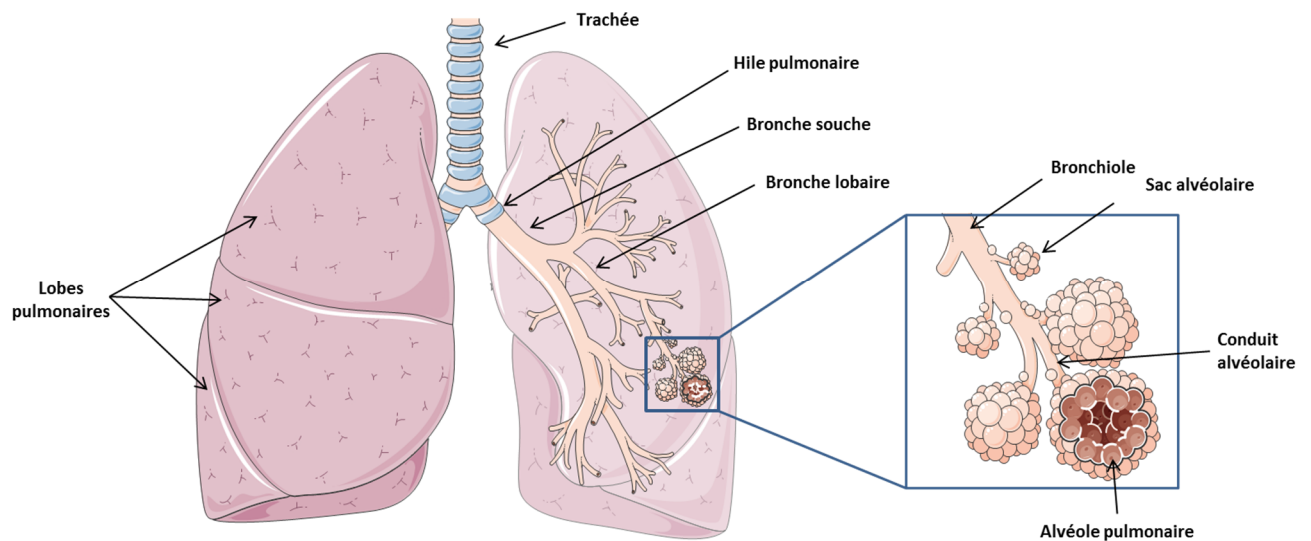


Figure 30 : Schéma de l'organisation du poumon

Inspiré de (Young et al., 2006; UPMC, 2016).

Le parenchyme respiratoire assure les échanges gazeux dans les alvéoles. Il est composé du conduit alvéolaire, des alvéoles et des capillaires sanguins. L'épithélium alvéolaire est continu et composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II (Figure 31).

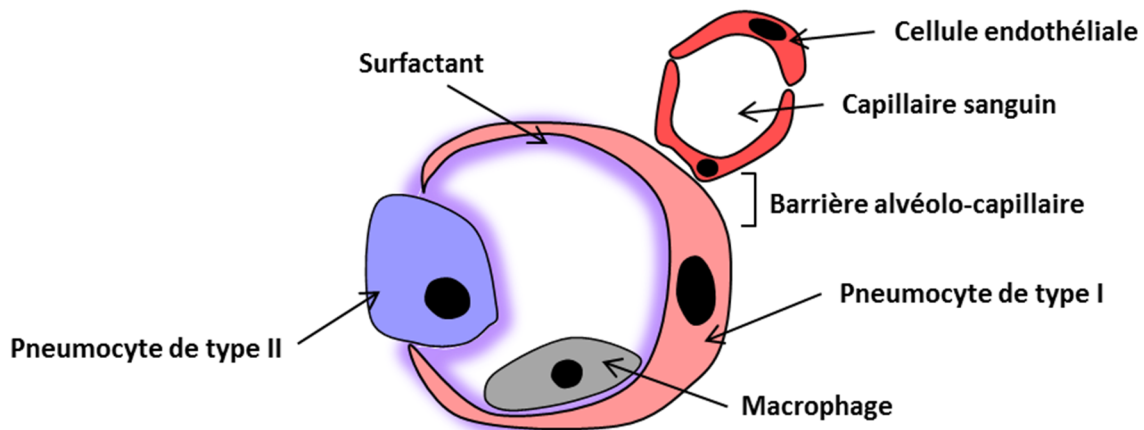


Figure 31 : Schéma d'une alvéole pulmonaire

Les pneumocytes de type I sont des cellules pavimenteuses aplaties possédant un noyau ovalaire ainsi qu'un cytoplasme fin et étendu permettant les échanges de gaz dissouts. Ces cellules représentent 40 % des cellules alvéolaires mais couvrent 90 % de la surface de l'alvéole. Les pneumocytes de type II sont des cellules pyramidales avec un noyau arrondi et un cytoplasme vacuolisé. Ils correspondent à 60 % des cellules alvéolaires mais ne recouvrent pourtant qu'une petite partie de la surface alvéolaire (10 %). Ces cellules sont responsables de la sécrétion continue de surfactant qui est un tensioactif indispensable à la fonction respiratoire. Il permet d'éviter, au moment de l'expiration, un collapsus de l'alvéole par une réduction de la tension superficielle. Un déficit en surfactant participe au syndrome de détresse respiratoire aiguë chez l'adulte. Les pneumocytes de type II gardent une capacité de division et de différenciation en pneumocytes de type I en cas de lésion alvéolaire.

L'accolement des lames basales des pneumocytes de type I et des cellules endothéliales forme la barrière alvéolo-capillaire (< 1 µm d'épaisseur). Cette zone est le lieu des échanges gazeux par diffusion passive ou active. Des macrophages résidents se trouvent dans la lumière alvéolaire afin d'éliminer les bactéries ou particules pouvant perturber la respiration.

2. Radiopathologie pulmonaire

La forte présence d'oxygène dans les poumons rend le complexe alvéolo-capillaire particulièrement radiosensible. Pour les protocoles normofractionnés, les recommandations cliniques fixent à 20 Gy la dose reçue pour un volume ne dépassant pas 35 % du poumon ($V_{20} \leq 35\%$) et une dose de 30 Gy pour un volume de 20 % ($V_{30} \leq 20\%$) (SFRO, 2007). Le risque de développer une pneumopathie radique (RILD, *Radiation-Induced Lung Disease*) dépend de la dose, du volume des poumons irradiés et du schéma de fractionnement des doses (Almeida et al., 2013). La radiopathologie pulmonaire a été décrite depuis des années grâce à des études

sur le modèle animal et peut être considérée comme un enchaînement d'événements séquentiels (Bledsoe et al., 2017). Quelques heures à plusieurs jours après l'irradiation, une réponse inflammatoire due à une infiltration leucocytaire a été mise en évidence. Cette infiltration peut être responsable de la formation d'un œdème alvéolaire et d'une congestion vasculaire. Cette phase est cliniquement invisible même si les processus pathologiques commencent dès l'irradiation. De plus, suite à l'irradiation, l'apoptose des pneumocytes de type I suivie d'une rupture des lames basales ainsi que d'une prolifération réactionnelle des pneumocytes de types II ont été mises en évidence. Cette augmentation du nombre de pneumocytes de type II conduit entre autre à une augmentation de la production de surfactant (Bledsoe et al., 2017).

Les atteintes épithéliales et endothéliales favorisent la sécrétion de facteurs de croissance (VEGF), de protéases et de cytokines pro-inflammatoires (TGF β) dans la matrice extracellulaire ce qui stimule le recrutement des cellules du système immunitaire (Cappuccini et al., 2011). La perfusion pulmonaire diminue et forme des zones hypoxiques qui favorisent l'angiogenèse. Ces dommages microscopiques sont à l'origine de l'initiation et la mise en place des dommages tissulaires radio-induits. La pneumopathie radique désigne une atteinte pulmonaire survenant après une irradiation thoracique notamment lors d'un traitement pour un cancer du sein, du poumon ou encore de l'œsophage. Ce terme regroupe les pneumopathies radiques aiguës et la fibrose pulmonaire radio-induite. Les principales caractéristiques histologiques de la pneumopathie radique sont un œdème de l'interstitium, une infiltration leucocytaire entraînant un épaississement des septas alvéolaires, une altération des capillaires, une infiltration de cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes, polynucléaires) ainsi qu'un dépôt de fibrine (Figure 32) (Stone et al., 2003; Trott et al., 2004; Bledsoe et al., 2017).

L'inflammation pulmonaire peut amener à une pneumopathie radique aiguë chez 50 à 80 % des patients traités par radiothérapie au niveau thoracique. Elle se développe entre 3 à 12 semaines après l'irradiation (Bledsoe et al., 2017). Cliniquement, les symptômes pouvant être observés sont une toux, une difficulté à respirer (dyspnée), une fièvre résistante à un traitement antibiotique ainsi que des douleurs thoraciques et pleurales (Trott et al., 2004; Bledsoe et al., 2017). Cependant, la pneumopathie radique aiguë est le plus souvent asymptomatique (Bledsoe et al., 2017).

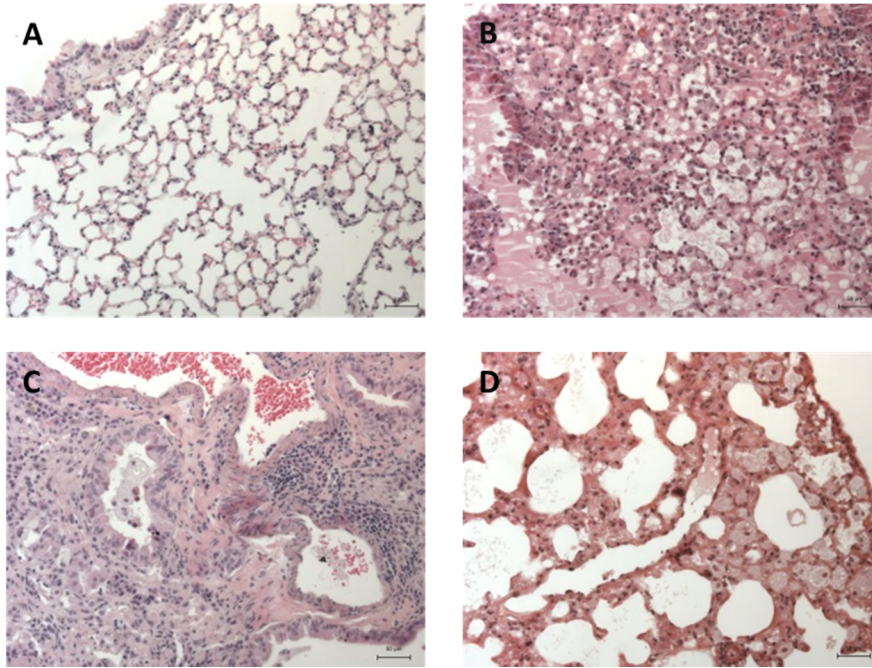


Figure 32 : Réponse radio-induite du parenchyme pulmonaire

Des coupes de poumons de souris irradiées à 90 Gy en conditions stéréotaxiques ont été colorées en HES (Hématoxyline Eosine Safran). Les poumons sont non irradiés (A). Les poumons irradiés présentent un œdème alvéolaire à 2 semaines (B), suivi d'un dépôt fibrino-leucocytaire à 8 semaines (C) et un épaissement des septas à 20 semaines post-irradiation (Lavigne et al., 2019).

De récentes études montrent que l'induction d'une sénescence radio-induite joue un rôle important dans la mise en place d'une fibrose pulmonaire radio-induite (RIPF, *Radiation-induced pulmonary fibrosis*) (Citrin et al., 2017; He et al., 2019). En effet, les cellules alvéolaires de type II (AECII, *type II alveolar cells*) répondent à l'irradiation par l'induction de la sénescence dû au stress oxydatif chronique (Citrin et al., 2013). Les cellules sénescents s'accumulent dans le tissu, ce qui induit l'installation de pathologies semblables à celles liées à l'âge et de maladies chroniques comme la pneumopathie chronique obstructive (COPD, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) (Bartling, 2013), la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF, *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*) (Shivshankar et al., 2012) ou encore l'emphysème qui se caractérise par la destruction de la paroi alvéolaire (Citrin et al., 2017). La sénescence pulmonaire apparaît alors comme importante dans le vieillissement prématuré du poumon suite à un stress comme l'irradiation.

Par ailleurs, la RIPF est une pathologie inflammatoire chronique correspondant à la cicatrisation d'un tissu lésé qui ne se régénère pas. Elle apparaît environ 6 mois après la fin de la radiothérapie et est considérée comme une pneumopathie radique tardive (Chargari et al., 2013). La fibrose pulmonaire radio-induite concerne environ 10 à 30 % des patients traités pour une tumeur thoracique (Chen et al., 2019; He et al., 2019). La RIPF inclut un ensemble hétérogène de troubles pulmonaires caractérisés par une destruction de l'architecture

pulmonaire progressive et irréversible ainsi qu'une perturbation des échanges gazeux. Cette atteinte peut impacter la qualité de vie du patient et éventuellement conduire à l'insuffisance respiratoire et jusqu'à la mort. Les rayonnements ionisants endommagent les cellules pulmonaires épithéliales et endothéliales et entraînent ainsi une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ($TNF\alpha$, IL-4, IL-6...) par les macrophages et lymphocytes recrutés au niveau du site lésé (Chen et al., 2019) (Figure 33).

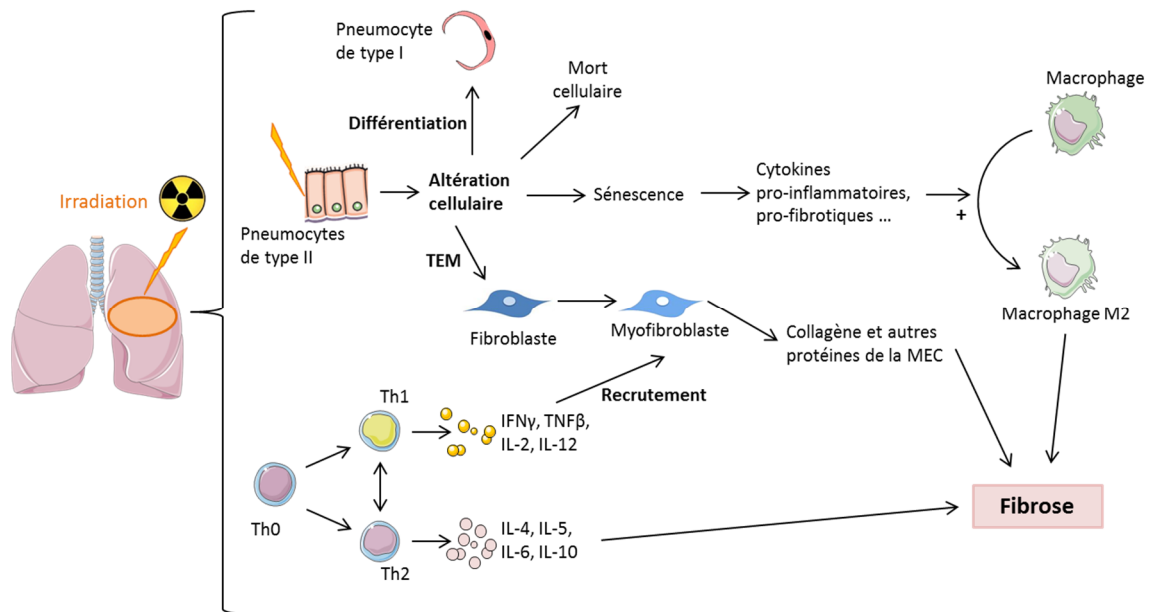


Figure 33 : Mécanismes du remodelage pulmonaire au cours de la fibrose

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse, MEC : Matrice extracellulaire, TNF : Tumor Necrosis Factor, IFN : Interféron, Th0 : Lymphocyte T naïf, Th1 ou 2 : Lymphocytes T1 ou T2, IL : Interleukine. Inspiré de (Chen et al., 2019)

Des facteurs pro-fibrosants comme le $TGF\beta 1$ sont également sécrétés par les cellules inflammatoires (Figure 33). Les fibroblastes pulmonaires sont un des types cellulaires exprimant le plus $TGF\beta 1$. Les myofibroblastes sont des cellules du tissu conjonctif qui dérivent des fibroblastes résidents ou des pneumocytes de type II. L'activation de ces cellules permet la synthèse et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Le $TGF\beta 1$ participe au recrutement et différenciation d'autres myofibroblastes ce qui amène à une production plus importante de matrice extracellulaire (Chen et al., 2019). Les cellules immunitaires sont les principales sources de métalloprotéinases (MMP) permettant de modifier la matrice extracellulaire au cours de la réparation. La modification du profil inflammatoire entraîne un déséquilibre de la dégradation de la matrice. La rigidification du tissu due à l'accumulation de matrice et les signaux pro-inflammatoire entraînent un recrutement perpétuel des myofibroblastes et cellules immunitaires créant une boucle d'activation chronique (Chen et al., 2019). Cette boucle participe au développement de pathologie inflammatoire chronique

pouvant amener à la fibrose pulmonaire. Au cours de la fibrose, une partie des pneumocytes de type II subit la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*). Durant la TEM, les cellules épithéliales perdent leur polarisation apico-basale et leur adhésion cellulaire (Figure 33) (Acheva et al., 2019; Chen et al., 2019). Les altérations radio-induites au niveau du compartiment endothélial sont abordées plus tard dans ce chapitre.

C. Dommages radio-induits dans la zone abdomino-pelvienne

Les OARs dans la zone abdomino-pelvienne sont principalement l'intestin, le colon et le rectum. Etant donné la superficie recouverte par l'épithélium de l'intestin grêle, nous nous intéressons plus particulièrement à cet organe.

1. Anatomie et physiologie intestinale

L'intestin se compose de deux compartiments : l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle est très long (4 à 6 mètres chez l'homme) et est subdivisé en 3 parties selon la position proximal à distal: le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Young et al., 2006). Le gros intestin est composé, quant à lui, par le caecum, le côlon et le rectum. Dans le contexte de la thèse, nous nous sommes intéressés aux dommages radio-induits au niveau de l'intestin grêle. Seules l'anatomie et les fonctions de cet organe seront détaillées par la suite.

L'intestin grêle a deux fonctions principales, d'une part, la digestion et l'absorption des nutriments, et d'autre part un rôle de barrière entre le milieu extérieur et le compartiment sanguin. L'intestin grêle est composé d'une muqueuse et d'une sous muqueuse présentant des replis appelés villosités composés de cellules cylindriques épithéliales : les entérocytes (Figure 34). Des microvillosités constituent la face luminale des entérocytes et sont responsables du processus d'absorption suite à la digestion intestinale. Ces replis successifs de la paroi intestinale permettent d'avoir une très importante surface d'échange pour faciliter l'absorption des nutriments (Young et al., 2006). La fonction de barrière intestinale est assurée par la production de mucus composé de peptides de défense appelés défensines qui permettent d'assurer une protection des cellules épithéliales contre les microorganismes pathogènes. De plus, le réseau lymphatique étant présent au niveau de l'intestin, le système immunitaire à travers les leucocytes circulants constitue une dernière barrière contre les pathogènes. Ainsi la

réponse immunitaire mise en place suite à une agression (y compris les rayonnements ionisants) est importante dans la réponse du tissu intestinal.

L'épithélium fonctionnel est composé de villosités et de cryptes. Les villosités sont composées de 3 types cellulaires : les entérocytes assurant l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes (ou cellules en gobelets) sécrétant le mucus et les cellules entéroendocrines produisant les hormones intestinales (Figure 34).

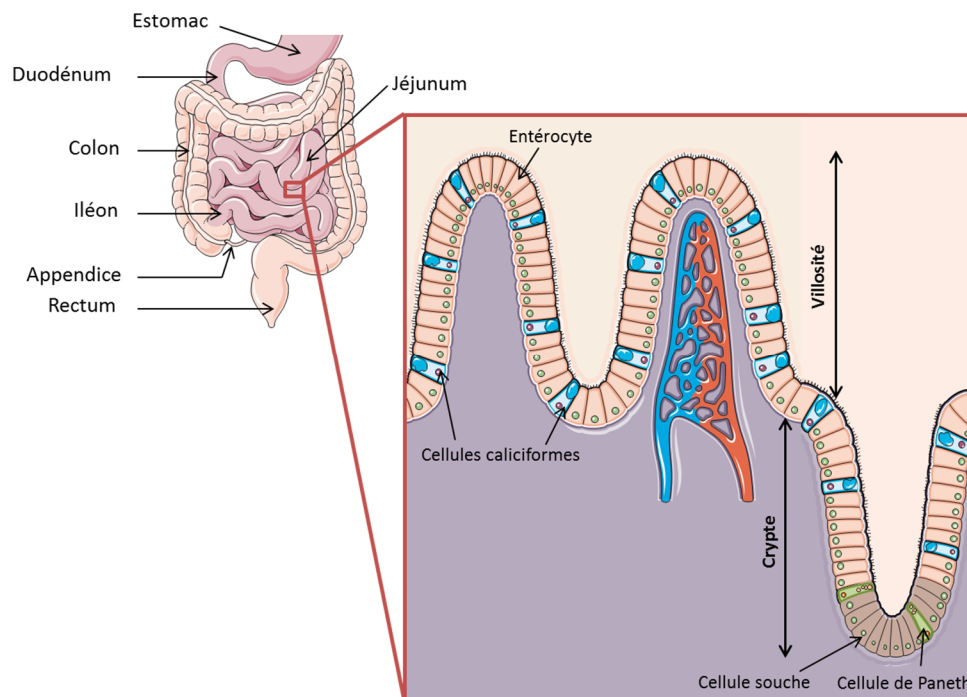


Figure 34 : Organisation fonctionnelle de l'intestin grêle chez l'homme

Les cryptes, formant quant à elles le compartiment prolifératif, englobent 3 types cellulaires : les cellules de Paneth sécrétant des peptides anti-microbiens et 2 types de cellules souches (Figure 34). Les CBC (*Crypt-Based columnar Cells*) sont au fond des cryptes et gardent leur état souche grâce à la présence des cellules de Paneth à proximité. Elles se divisent continuellement pour assurer un renouvellement constant de l'épithélium intestinal (3 à 5 jours). Les LRC+4 (*Label-Retaining Cells*) sont le deuxième type de cellules souches. Elles sont moins nombreuses et se divisent plus lentement. Le renouvellement rapide de l'intestin grêle, en plus de son organisation structurale en série, en font un organe particulièrement sensible aux fortes doses d'irradiation.

2. Physiopathologie intestinale radio-induite

En 1897, les premières lésions intestinales radio-induites ont été décrites suite à une irradiation de l'estomac (Walsh, 1897).

Au cours d'une radiothérapie normofractionnée, les recommandations cliniques conseillent une dose maximale inférieure à 50 Gy en tout point de l'organe et inférieure à 40 Gy sur un grand volume (SFRO, 2007). L'entérite radique (ou grêle radique) est par définition un processus inflammatoire se produisant au niveau de l'intestin suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Les symptômes apparaissent à partir d'une dose de 5 à 12 Gy en normo-fractionné et sont de plus en plus sévères avec une augmentation de la dose (Rupam et al., 2017). L'entérite radique peut se présenter sous une forme aiguë ou chronique. L'entérite radique aiguë se développe quelques heures ou jours après l'irradiation chez 60 à 80 % des patients traités. L'irradiation entraîne une stérilisation partielle du compartiment souche. L'inflammation radio-induite et l'absence de renouvellement épithélial entraînent une ulcération progressive de la muqueuse intestinale. Ces dysfonctions entraînent une rupture de la barrière intestinale responsable d'une altération de l'absorption. D'un point de vue clinique, elle se manifeste chez le patient par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, des diarrhées et un ténesme (tension douloureuse à l'anus ou la vessie) (Andreyev, 2007; Harb et al., 2014). L'irradiation induit une surexpression de p53 et une inhibition du facteur anti-apoptotique Bcl-2 ce qui entraîne une activation de l'apoptose épithéliale (Harb et al., 2014). La mort radio-induite des cellules souches épithéliales a été mise en évidence et correspond aux effets cytotoxiques radio-induits (Gottlieb et al., 1996; Potten, 2004; Gandara et al., 2012).

De plus, suite à l'irradiation, il a été démontré une altération du transporteur actif Na/K ATPase et une dysfonction du péristaltisme intestinal entraînant une contamination bactérienne (Harb et al., 2014). Ces phénomènes sont responsables d'une malabsorption intestinale après un traitement par radiothérapie et de l'induction d'une pathologie chronique. L'existence d'un lien entre la sévérité des lésions radiques aiguës et la mise en place des lésions tardives est aujourd'hui admise bien qu'elle ne soit pas clairement démontrée. L'entérite radique chronique (CRE, *Chronic Radiation Enteritis*) peut apparaître 2 mois à 30 ans après l'arrêt de la radiothérapie. Elle apparaît chez 4 à 20 % des patients traités (Andreyev et al., 2011). Cette pathologie est caractérisée par 2 types de lésions : un syndrome de malabsorption avec une diarrhée chronique et un syndrome de pseudo-obstruction chronique (Chater et al., 2019). A cela peut s'ajouter la formation de fistules, d'abcès, une perforation et un saignement (Harb et al., 2014). L'irradiation au niveau intestinal entraîne une activation des macrophages

résidents et des neutrophiles qui vont sécréter des ERO, des protéases : cathepsines et MMPs (*Metalloprotéinases*) qui vont conduire à la dégradation de la MEC (Figure 35). Comme abordé dans la partie sur les pathologies pulmonaires, la TEM a été montrée sur des cellules épithéliales intestinales après irradiation (Yang et al., 2017).

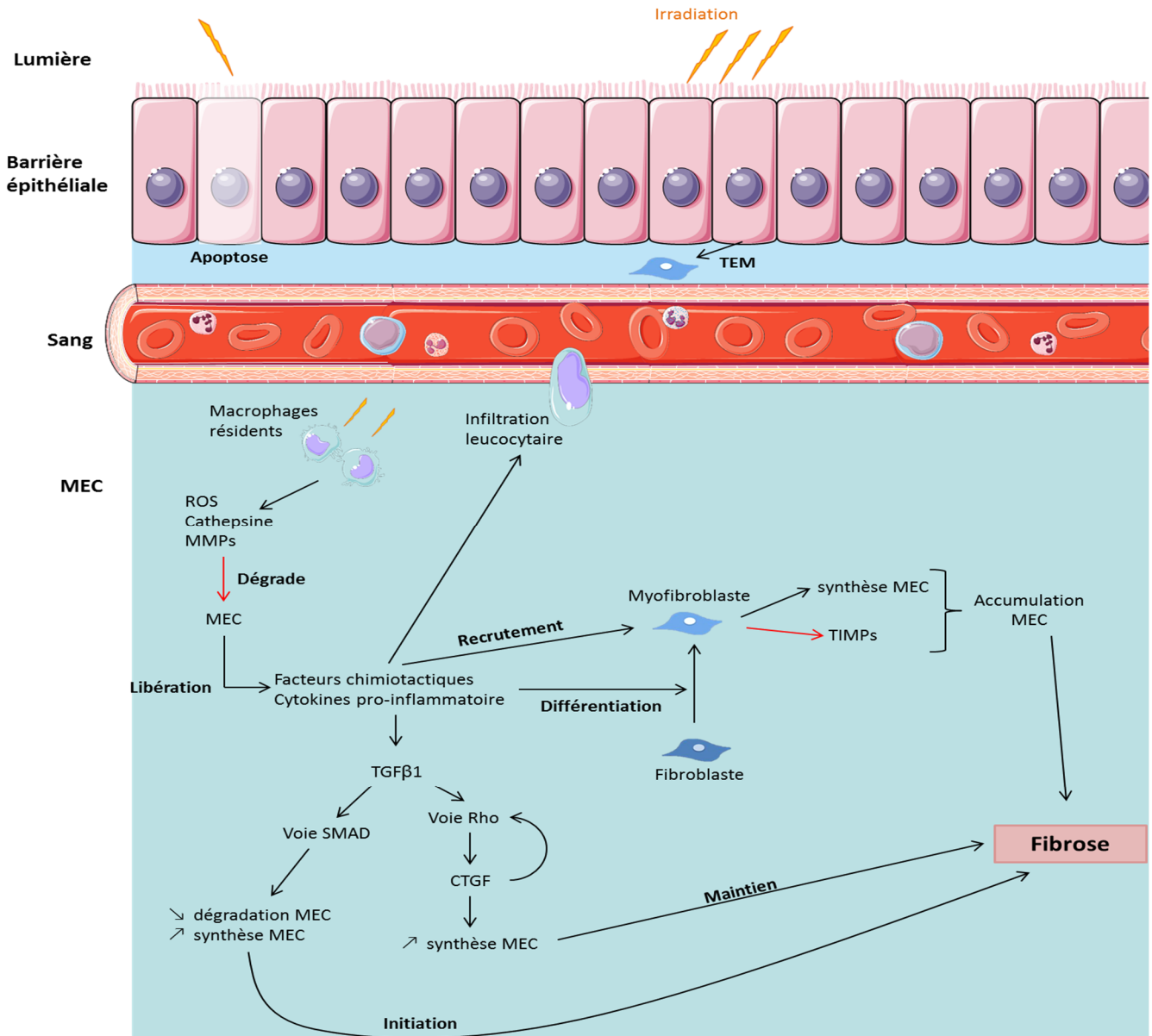


Figure 35 : Mécanismes de réponses à l’irradiation au niveau intestinal

CTGF : *Connective Tissue Growth Factor* ; MEC : *Matrice Extracellulaire* ; MMPs : *Métalloprotéinases* ; TIMPs : *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*. TEM : *Transition épithélio-mésenchymateuse*. Inspiré de (Vozenin-Brotons et al., 2004; Rieder et al., 2007; Yang et al., 2017; Lenti et al., 2019).

Cette dégradation va entraîner une libération de plusieurs facteurs comme des cytokines pro-inflammatoires (IL4, IL13 et TGFβ1) ou encore des facteurs chimiotactiques favorisant la migration des myofibroblastes et l’infiltration leucocytaire (Rieder et al., 2007). Les cellules mésenchymateuses (fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses) synthétisent des composants de la MEC afin de contrer sa dégradation par les MMPs. Les TIMPs (*Tissue*

Inhibitors of Metalloproteinases) permettent aussi de réguler l'activité des MMPs. La balance entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC est importante dans le degré des dommages de la barrière intestinale durant l'inflammation (Rieder et al., 2007). Le facteur de transcription TGFβ1 agit par l'intermédiaire d'un facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF, *Connective Tissue Growth Factor*) via une voie Rho (*Ras homologue*) dépendante impliquée dans le maintien de la fibrose (Figure 35) (Vozenin-Brotons et al., 2004).

Rubio et Jalnas montrent que l'irradiation de l'intestin grêle chez le rat entraîne des modifications histologiques et morphologiques visibles dès les premières heures suivant l'irradiation (Rubio & Jalnas, 1996). En effet, au niveau macroscopique des altérations de l'intestin irradié sont visibles ainsi que des adhésions intra-abdominales et un épaississement du mésentère (Jensen et al., 1983). Des coupes histologiques d'intestin irradié permettent de mettre en évidence des ulcérations de la muqueuse ainsi que des zones d'atypies épithéliales ou des cryptes hyperplasiques correspondant à des reprises épithéliales. A des temps plus tardifs, une fibrose intestinale est observée et se caractérise par une désorganisation de la barrière intestinale accompagnée d'un dépôt excessif de fibres de collagènes. Un épaississement de la séreuse, une sclérose vasculaire et une congestion lymphatique peuvent être également observés. Ces différentes modifications macroscopiques et histologiques permettent de caractériser les lésions après une irradiation intestinale en leur attribuant un score lésionnel (Jensen et al., 1983).

L'homéostasie intestinale dépend de l'épithélium intestinal, du système immunitaire mais également du microbiote. Récemment, des études ont montré l'influence du microbiote dans la réponse intestinale radio-induite, l'action étant médiée par des récepteurs TLR (*Toll-Like Receptors*) (Ciorba et al., 2009). Des expériences parallèles menées sur des souris germ free ont démontré le développement d'une radiorésistance (Crawford et al., 2005). Ainsi, la dysbiose, qui désigne un déséquilibre du microbiote quelle que soit la cause, serait un facteur de risque de l'entérite radique (Willett et al., 2000; Harb et al., 2014). Une étude clinique a permis de comparer le microbiote de patients ayant développé ou non une diarrhée après radiothérapie. Les patients ayant eu une diarrhée ont une altération de leur profil microbien fécal contrairement aux patients ne développant pas de complications, corroborant les résultats récents obtenus chez l'animal (Manichanh et al., 2008).

Enfin, l'intestin grêle est un organe richement irrigué afin d'assurer l'absorption des nutriments dans la circulation sanguine. Les altérations radio-induites au niveau du compartiment vasculaire sont abordées dans la partie suivante.

IV. Compartiment vasculaire et lésions radio-induites

Chez les patients traités par radiothérapie, l'atteinte vasculaire est considérée comme la cause majeure de la morbidité radio-induite à long terme (Milliat et al., 2008). L'importance du réseau microvasculaire a été mise en évidence dans la réponse radio-induite au niveau des cryptes intestinales (Maj et al., 2003). Présent dans l'organisme entier, le réseau vasculaire est potentiellement une cible quelle que soit la localisation du cancer traité par radiothérapie.

A. Structure et fonction du réseau vasculaire

Le réseau vasculaire permet de distribuer l'oxygène et les nutriments aux organes via la circulation sanguine. Les diamètres des vaisseaux varient en fonction de leur fonction. En sortant du cœur, le sang riche en dioxygène circule dans l'aorte et les artères en passant par les artérioles avant d'atteindre les capillaires permettant les échanges au niveau de l'organe. Les capillaires sont reliés aux veinules devenant des veines qui permettent de ramener le sang pauvre en dioxygène et riche en CO₂ au niveau pulmonaire. Les vaisseaux sanguins se composent de trois tuniques ayant des épaisseurs dépendantes du type de vaisseau (Figure 36). La couche la plus interne est l'intima. Elle est constituée d'une monocouche de cellules plates et polarisées (les cellules endothéliales) qui reposent sur une lame basale. L'intima est la seule couche présente dans la totalité des vaisseaux sanguins quel que soit leur diamètre. En effet, les capillaires, étant les vaisseaux qui ont le plus petit diamètre, ils sont constitués d'une unique couche de cellules endothéliales. La couche intermédiaire est la média. Elle contient des cellules musculaires lisses (CML) et les composants de la MEC. Sa structure et son épaisseur varient en fonction du vaisseau. Enfin, la couche la plus externe est l'adventice. Elle se compose principalement de fibres de collagène et de fibroblastes. Les terminaisons des nerfs permettant de contrôler la vasoconstriction ainsi que la vasodilatation des vaisseaux à l'aide des CML se situent au niveau de l'adventice.

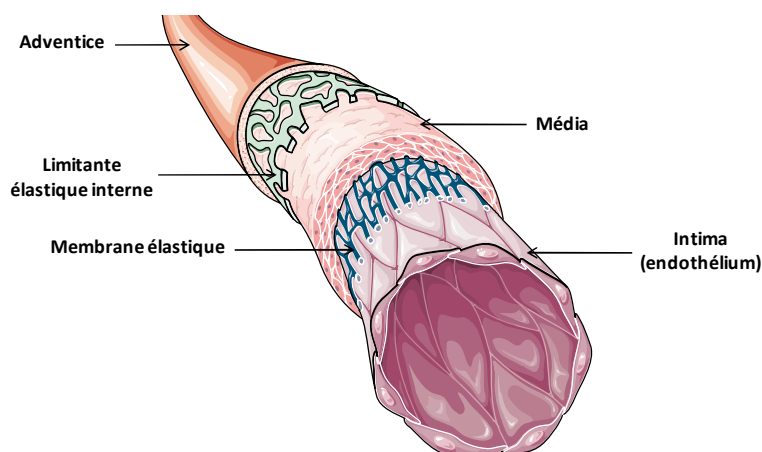


Figure 36 : Structure d'une artère

Le système vasculaire humain est très développé et permet d'irriguer chacun des organes. Au niveau thoracique, la circulation fonctionnelle est assurée par l'artère pulmonaire qui amène le sang faiblement oxygéné puis par les veines qui apportent le sang vers le cœur afin qu'il soit redistribué dans les organes. Dans le poumon, les artères et les bronches se divisent simultanément pour créer un réseau parallèle. L'échange gazeux se réalise au niveau des alvéoles à travers les capillaires. Au niveau viscéral, l'intestin grêle est vascularisé par l'artère mésentérique supérieure qui se divise en artérioles, puis capillaires, afin d'atteindre la sous-muqueuse puis la lamina propria des villosités intestinales. Cette vascularisation permet au sang de s'enrichir en nutriments au niveau intestinal.

Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons à la réponse de l'endothélium suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Nous allons donc exclusivement nous focaliser sur ce compartiment dans la fin de ce chapitre.

B. Rôle de l'endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le contrôle de la fonction vasculaire. Elles participent à l'homéostasie vasculaire mais aussi aux processus physiologiques ou pathologiques comme la thrombose, l'inflammation ou le remodelage vasculaire. Les cellules endothéliales interagissent à la fois avec les cellules circulantes et les cellules présentes dans la paroi vasculaire à savoir les cellules musculaires lisses. Elles sont mises en jeu dans plusieurs processus physiologiques : l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, le tonus vasculaire, l'hémostase et l'inflammation.

1. Angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Figure 37). Elle est retrouvée à la fois en conditions physiologiques lors du développement embryonnaire et en conditions pathologiques au cours de la croissance tumorale. Suite à la dégradation de la lame basale et de la matrice extracellulaire, la différenciation et la prolifération de progéniteurs de cellules endothéliales aboutissent à la formation d'un vaisseau primitif (Milliat et al., 2008). Le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et les angiopoïétines (Ang) sont des acteurs clés à la formation de nouveaux vaisseaux (Cross et al., 2001). Le remodelage et la maturation vasculaire sont assurés par l'éphrine B2 et l'angiotensine 1. Ce dernier joue également un rôle dans le maintien de la stabilité vasculaire (Michiels, 2003).

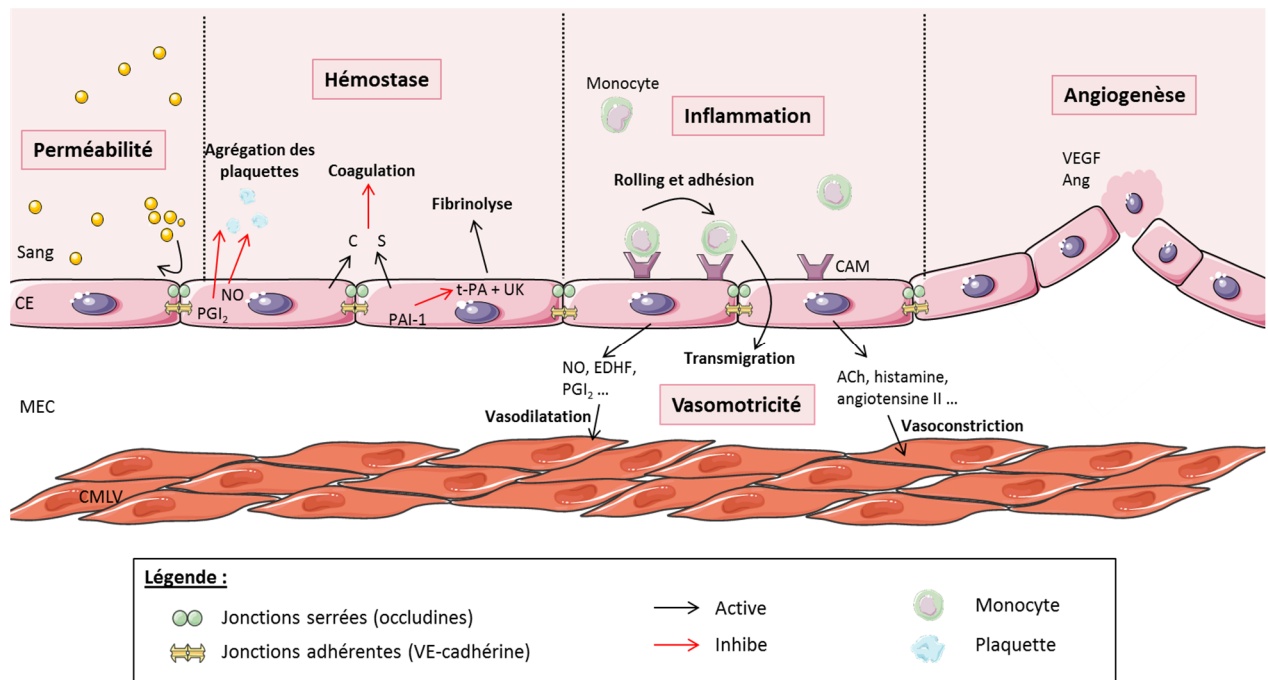


Figure 37 : Principales fonctions de l'endothélium vasculaire

CE : cellules endothéliales ; MEC : matrice extracellulaire, CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires ; PGI₂ : prostacycline ; C : protéine C ; S : protéine S ; UK : urokinase ; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1* ; t-PA : *tissue-type plasminogène activator* ; EDHF : *Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor* ; ACh : acétylcholine ; CAM : molécules d'adhésion cellulaire ; VEGF : *Vascular Endothelial Growth factor* ; Ang : angiopoïétine. Inspiré de (Michiels, 2003).

2. Perméabilité vasculaire

Les cellules endothéliales doivent assurer une étanchéité afin de contrôler le passage des molécules de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Pour assurer cette perméabilité vasculaire nécessaire à l'homéostasie tissulaire, les cellules endothéliales possèdent des

jonctions serrées et des jonctions adhérentes reliées au cytosquelette (Figure 37). Les jonctions serrées se composent de protéines transmembranaires de type claudines ou occludines tandis que les jonctions adhérentes sont formées par des cadhérines plus particulièrement les VE-cadhérines spécifiques à l'endothélium. L'altération de la perméabilité endothéliale est associée à une redistribution des différentes jonctions cellulaires (Alexander et al., 2002).

3. Tonus vasculaire

Les vaisseaux sanguins jouent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire grâce à la fonction contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) présentes dans la média. L'endothélium possède la capacité à libérer des molécules vasoactives agissant sur la vasomotricité des CMLV (Figure 37). Le monoxyde d'azote (NO) produit par la eNOS (*endothelial NO synthase*), l'EDHF (*Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor*) et la prostacycline (PGI₂) sont des vasodilatateurs. La synthèse de NO est stimulée par l'acétylcholine (ACh), l'angiotensine II, la bradykinine, l'histamine ou encore l'acide arachidonique (Michiels, 2003). Par ailleurs, les principaux vasoconstricteurs sont l'endothéline, les prostaglandines (PGF₂ et PGH₂) et l'angiotensine II (Michiels, 2003). La relaxation ou contraction des CMLV détermine le diamètre du vaisseau sanguin.

4. Hémostase

Les cellules endothéliales ont un rôle anticoagulant, anti-thrombotique et anti-aggrégant plaquettaire afin d'assurer la fluidité continue du sang dans les vaisseaux sanguins (Michiels, 2003). La sécrétion de prostacycline (PGI₂) et de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales permet d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Figure 37). De plus, les cellules endothéliales maintiennent la fluidité sanguine en synthétisant et sécrétant les protéines C et S qui assurent une inhibition de la coagulation (Figure 37). En effet, la formation du complexe protéine C/protéine S inactive les cofacteurs VIIIa et Va nécessaires à la coagulation (Esmon, 2000). Les cellules endothéliales synthétisent la thrombomoduline qui se fixe sur la protéine C afin d'augmenter son action anticoagulante (Sadler, 1997). Enfin, l'endothélium participe également à la fibrinolyse en libérant l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, *tissue-type plasminogène activator*) et l'urokinase (UK) qui transforme le plasminogène en plasmine (Wang et al., 1998). Enfin, la plasmine digère les dépôts de fibrine.

5. Inflammation

L'inflammation est une réponse protectrice localisée provoquée par des blessures ou la destruction des tissus. Cependant, lorsque l'inflammation est chronique, elle conduit à des situations pathologiques. Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion (CAM, *Cell Adhesion Molecule*) qui sont responsables du rolling et de l'adhésion des leucocytes (Figure 37). Ces deux phénomènes conduisent à la transmigration des leucocytes dans le foyer inflammatoire. Les CAM impliquées dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes sont VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule 1*) et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) (Michiels, 2003; Guipaud et al., 2018).

C. Réponse de l'endothélium à l'irradiation

La dysfonction endothéliale est décrite dans plusieurs pathologies. Elle participe au développement et à la progression de l'hypertension artérielle pulmonaire (Farrero et al., 2014), augmente le risque d'athérosclérose (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016), d'insuffisance rénale chronique (Castellon et al., 2016) et de problèmes cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde (Taylor et al., 2015). De plus, le compartiment vasculaire, et plus particulièrement l'endothélium, est largement décrit dans la littérature comme jouant un rôle important dans l'initiation, la progression et le développement des lésions radio-induites aux tissus sains (Milliat et al., 2008; Korpela et al., 2014). Il a été démontré que l'irradiation affecte la plupart des fonctions de l'endothélium (Figure 38). En effet, les radiations ionisantes induisent de multiples effets comme l'induction de l'apoptose, l'activation de l'endothélium conduisant à des processus inflammatoires ainsi que la transition endothélio-mésenchymateuse.

1. Apoptose endothéliale radio-induite

L'apoptose radioinduite a été largement décrite et observée à la fois sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. L'apoptose des cellules endothéliales est retrouvée suite à des fortes doses d'irradiation (supérieures à 10 Gy) (Langley et al., 1997). Une augmentation du nombre de cellules endothéliales apoptotiques est observée suite à une irradiation à 15 Gy en corps entier (TBI, *Total Body Irradiation*) chez des souris. A cette dose, l'apoptose des cellules endothéliales précède celle des cellules souches intestinales et est responsable du développement d'un syndrome gastro-intestinal (SGI) (Paris et al., 2001) qui entraîne la mort

des animaux quelques jours après l'exposition aux rayonnements ionisants. L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est également retrouvée au niveau pulmonaire (Santana et al., 1996). Il apparaît également que les voies impliquées dans l'induction de l'apoptose radio-induite peuvent être dépendantes ou non de p53 (Santana et al., 1996). ATM, phosphorylant p53, entraîne ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Venkatesulu et al., 2018). Néanmoins, il a été récemment démontré que des fluctuations dans le modèle oscillatoire du suppresseur de tumeur p53 déclenchent un basculement net entre p21 et CDK2, conduisant à un échappement du cycle cellulaire (Reyes et al., 2018). Concernant la voie indépendante de p53, elle dépendrait de l'action de la sphingomyélinase acide (ASMase). En effet, les cellules lymphoblastiques de patients déficients en ASMase sont protégées de l'apoptose radio-induite (Santana et al., 1996). L'ASMase hydrolyse la sphingomyéline membranaire en céramide sous l'action des rayonnements ionisants. Les céramides peuvent alors s'associer au cholestérol cellulaire et forment ainsi des complexes CRP (*Ceramide Rich Platform*) impliqués dans la transduction des signaux apoptotiques. Les souris déficientes en ASMase ont une apoptose endothéliale radio-induite très limitée et sont protégées du SGI (Garcia-Barros et al., 2003). Par ailleurs, il a été démontré qu'un traitement par des facteurs pro-angiogéniques comme VEGF permet de contrer l'activation de l'ASMase et limite la toxicité radio-induite au niveau de l'endothélium (Corre et al., 2013).

L'apoptose endothéliale est la principale cause de l'augmentation de la perméabilité radio-induite au niveau de la barrière endothéliale (Guipaud et al., 2018). Suite à une exposition en dose unique de 2 à 50 Gy, une augmentation transitoire de la perméabilité a été mise en évidence sur les premières 24 h (Krishnan et al., 1987; Park et al., 2016).

L'apoptose endothéliale radio-induite apparaît donc comme un événement clé dans l'apparition des lésions radio-induites. Le phénotype des cellules survivantes est tout aussi important quand à leur influence sur le microenvironnement suite à l'irradiation. En effet, ces cellules survivantes peuvent acquérir un phénotype dysfonctionnel et sécréter des cytokines ou encore des facteurs pro-inflammatoires.

2. Acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-coagulant

Les cellules endothéliales répondent à l'irradiation par l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire s'accompagnant d'une sécrétion de facteurs solubles (cytokines et chimiokines) qui induisent l'activation de l'endothélium (Figure 38). L'activation de l'endothélium est un

terme qui correspond à une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion membranaires suite à l'exposition aux rayonnements ionisants.

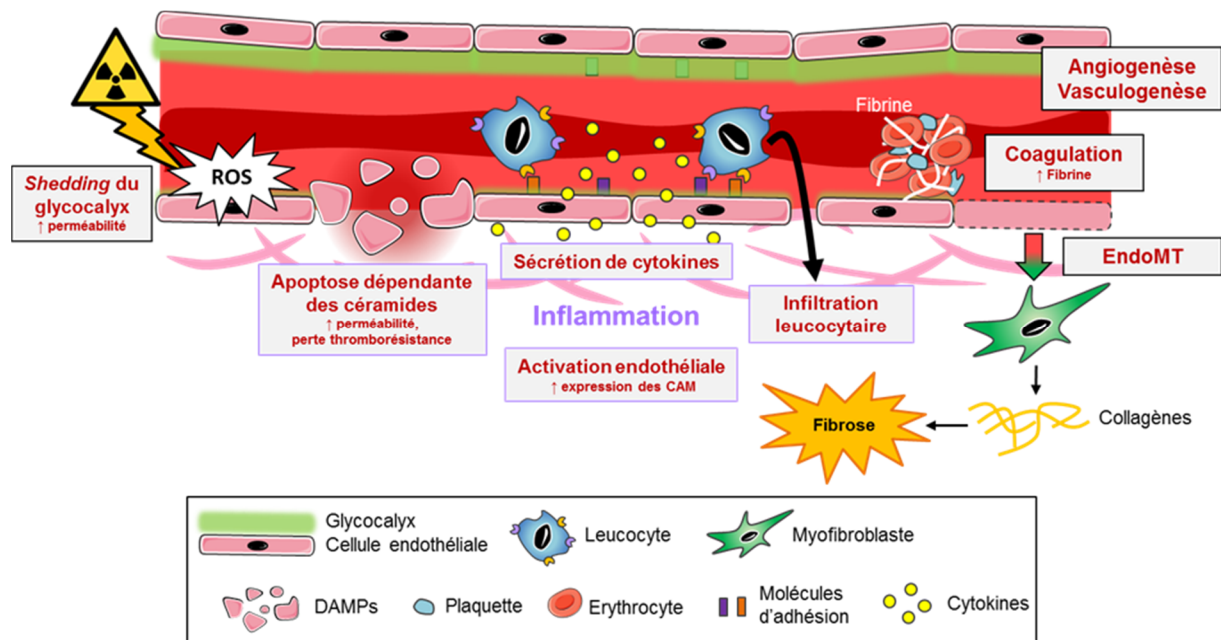


Figure 38 : Principaux effets de l'irradiation sur le compartiment endothélial
Inspiré de (Guipaud et al., 2018).

Comme nous l'avons abordé précédemment les molécules d'adhésion mises en jeu sont ICAM, PECAM et VCAM. Cette augmentation a été démontrée notamment *in vitro* suite à l'irradiation de cellules endothéliales humaines (Guipaud et al., 2018). De plus, l'augmentation de l'adhésion leucocytaire au niveau de l'endothélium a été observée *in vivo* suite à l'irradiation abdominale de souris (Molla et al., 2007). L'interaction endothélium-leucocytes est régulée par l'activation séquentielle des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales et leucocytes. L'irradiation abdominale de 10 Gy chez la souris entraîne une surexpression d'ICAM-1 24 h après l'exposition aux rayonnements ionisants. Par la suite, l'expression de VCAM-1 apparaît 14 jours post-irradiation ce qui montre sa participation au recrutement chronique. Enfin, PECAM-1 est quant à lui indispensable au processus de transmigration à travers les cellules endothéliales (Molla & Panes, 2007). Des auteurs montrent que la surexpression des molécules d'adhésion peut s'expliquer par une modification de l'expression de gènes impliqués dans la glycosylation (Jaillet et al., 2017). L'augmentation des molécules d'adhésion au niveau membranaire va favoriser l'adhésion des leucocytes et des plaquettes au niveau de la barrière endothéliale et ainsi induire une réponse inflammatoire qui peut être aiguë et/ou chronique. L'inflammation chronique participe au développement et à la progression de plusieurs pathologies comme les processus d'athérosclérose (Castellon & Bogdanova, 2016).

La réponse radio-induite des cellules endothéliales se caractérise également par l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant. L'irradiation entraîne une diminution de l'expression endothéliale de thrombomoduline-1 qui induit une augmentation de thrombine (Richter et al., 1997). Ce déséquilibre entraîne une agrégation des plaquettes qui vont former des dépôts de fibrine responsables de l'obstruction des vaisseaux irradiés (Ward et al., 1997). Des études précliniques soulignent que l'administration de la prothrombine permet une revascularisation et une régénération des tissus notamment intestinaux suite à une irradiation en corps entier chez la souris (Kantara et al., 2015; Olszewska-Pazdrak et al., 2016).

3. Transition endothélio-mésenchymateuse

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT, *Endothelial Mesenchymal Transition*) est un processus phénotypique de commutation par lequel les cellules endothéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent des marqueurs mésenchymateux comme l' α SMA (*α Smooth Muscle Actin*) (Cho et al., 2018). L'EndoMT possède des similitudes avec la TEM. Les deux processus de transition cellulaire utilisent les mêmes voies de signalisation et amènent à des cellules mésenchymateuses (Cho et al., 2018). L'EndoMT est induite par la voie de signalisation TGF β /SMAD et la transdifférentiation des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses est irréversible (Frid et al., 2002). L'EndoMT joue un rôle dans l'évolution de la rectite radique. En effet, chez des patients développant une rectite radique après leur traitement par radiothérapie, les cellules endothéliales expriment à la fois des marqueurs endothéliaux (vWF, facteur de von Willebrand) et mésenchymateux (α SMA) (Mintet et al., 2015). Des travaux antérieurs menés dans le laboratoire ont permis de mettre en évidence l'EndoMT sur un modèle préclinique murin suite à une irradiation colorectale à 27 Gy au Cobalt 60 (Mintet et al., 2015). De plus, une irradiation de 10 Gy sur des HIMECs (*Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells*) et HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) entraîne une EndoMT *in vitro* (Mintet et al., 2015; Mintet et al., 2017). Le laboratoire a également identifié un acteur clé dans ce processus : le gène HEY2 (*Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2*) (Mintet et al., 2017). L'inactivation de ce gène spécifiquement dans l'endothélium montre une diminution de la sévérité des rectites radiques chez la souris après une irradiation colorectale qui est associée à une réduction de l'EndoMT. De plus, HEY2 semble être plus exprimé dans les cellules endothéliales au niveau des vaisseaux sous muqueux du rectum chez les patients souffrant de rectite radique (Mintet et al., 2017).

L'EndoMT apparaît alors comme un processus important dans l'évolution et la mise en place de la fibrose radio-induite.

4. Sénescence endothéliale radio-induite

Les cellules peuvent également répondre à l'irradiation par la mise en place d'une sénescence prématurée. Suite à une irradiation à des doses allant de 0,5 à 10 Gy, les cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine ou issues de veine de cordon ombilical humain répondent par un arrêt dans le cycle cellulaire ou encore par l'acquisition d'un phénotype sénéscent (Oh et al., 2001; Panganiban et al., 2013; Kim et al., 2014). Si le taux de cellules sénéscentes est supérieur à la capacité de clairance du système immunitaire, les cellules sénéscentes s'accumulent dans le tissu. Celles-ci peuvent créer des dommages tissulaires et induire des pathologies à travers le SASP. En effet, les cellules sénéscentes endothéliales seraient incapables de maintenir un renouvellement cellulaire pour maintenir la réparation des dommages et l'homéostasie vasculaire (Wang et al., 2016). Par exemple, ces modifications contribuent à la diminution de la densité des capillaires et des artères cardiaques pouvant mener à l'athérosclérose. Ces effets ont été mis en évidence à la fois chez l'homme et les modèles murins (Stewart et al., 2006; Baker et al., 2009; Taunk et al., 2015). De plus, la sénescence endothéliale radio-induite serait à l'origine de pathologies rénales. En effet, Aratani *et al.* montrent la présence de cellules endothéliales et des podocytes sénescents suite à une irradiation à 18 Gy au niveau d'un rein chez le rat qui sont responsables d'une dysfonction rénale (Aratani et al., 2018). Cependant, les mécanismes induisant cette dysfonction sont encore mal connus. Par ailleurs, la sénescence endothéliale a également été mise en évidence au niveau pulmonaire suite à une irradiation au niveau du thorax de souris à une dose unique de 17,5 Gy. La sénescence participe à la progression de la fibrose radio-induite au niveau pulmonaire chez ces souris à partir de 30 semaines suivant l'irradiation (Citrin et al., 2013; Pan et al., 2017).

5. Autres conséquences de l'irradiation sur l'endothélium

En plus de l'apoptose, de l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et anticoagulant ainsi que l'induction de la transition EndoMT et de la sénescence, les rayonnements ionisants induisent d'autres effets biologiques sur les cellules endothéliales (Figure 38). En effet, l'irradiation peut entraîner une augmentation du tonus vasculaire qui est suivi d'une diminution du diamètre des vaisseaux sanguins. Ces modifications sont associées à une réduction du débit sanguin qui a été observée 3 jours après une irradiation en dose unique de 10 Gy des muscles

crémasters de hamster (Roth et al., 1999). L'angiogenèse est une étape clé de la cicatrisation suite à un traitement par radiothérapie (Figure 38). Il a été montré que l'irradiation à de faibles doses (inférieures à 10 Gy) entraîne l'activation du processus d'angiogenèse à la fois dans les tumeurs et les tissus sains (Sofia Vala et al., 2010; Vincenti et al., 2011). A de plus fortes doses (supérieures à 20 Gy) ou lors d'une irradiation accidentelle, il a été observé une diminution du facteur proangiogénique VEGF sur un modèle préclinique murin d'irradiation cutanée (Ebrahimian et al., 2009).

En conclusion, la réponse à l'irradiation a largement été décrite sur le compartiment vasculaire notamment sur l'endothélium qui joue un rôle dans la mise en place des lésions au tissu sain. Plusieurs auteurs s'intéressent alors à prédire l'apparition de ces effets radio-induits.

Chapitre 3 : Evaluation du risque en radiothérapie externe

Le risque au sens large correspond à une possibilité ou probabilité de survenue d'un danger. Le risque est un terme également utilisé pour la radioprotection des travailleurs du nucléaire. Cette notion sera développée de façon plus précise dans ce chapitre. Au cours de cette thèse, ce terme est utilisé pour décrire le risque de développer des effets secondaires à long terme chez les patients bénéficiant d'une radiothérapie au cours de leur traitement anticancéreux. Le risque de développer un cancer radio-induit (ou un cancer secondaire) n'est donc pas pris en considération.

Lors d'un traitement par radiothérapie externe, les rayonnements ionisants vont traverser les tissus sains avant d'atteindre la tumeur. Les effets secondaires suite à l'irradiation sont multiples et peuvent considérablement impacter la qualité de vie du patient. Par ailleurs, en clinique, les pratiques pour délivrer les rayonnements sont en constante évolution. En effet, les nouveaux appareils délivrent des rayonnements à de plus forts débits de dose et énergies, l'irradiation est plus localisée grâce à une balistique de plus en plus précise et enfin les protocoles de fractionnement évoluent vers un hypofractionnement important conduisant à une réduction du nombre de fractions et donc une diminution du nombre de séances pour le patient.

Ce chapitre permettra d'exposer les connaissances actuelles sur les effets biologiques suite à une irradiation aux rayons X en lien avec les pratiques de radiothérapie émergentes ainsi que les moyens mis en œuvre pour les prédire. Déterminer et évaluer les effets radio-induits permet par extrapolation de prédire les risques de complications encourus par le patient suite à un traitement par radiothérapie externe.

I. Variation du débit de dose et effets biologiques

Les nouveaux appareils de radiothérapie permettent de délivrer des rayonnements à de plus forts débits de dose. Ils sont de plus en plus utilisés en clinique en raison de leurs avantages pratiques permettant de s'affranchir, dans certains cas, des mouvements du patient pendant l'irradiation (exemple de la respiration lors d'une irradiation pulmonaire). Cependant, les connaissances sur les effets biologiques induits par l'utilisation de ces nouveaux appareils de radiothérapie sont encore limitées, la technologie avançant systématiquement les connaissances biologiques. La majorité des études s'intéressent aux effets biologiques dus à une variation du débit de dose suite à une irradiation aux rayonnements γ . Ces connaissances sont abordées de façon succincte au début de cette partie. Au cours de la thèse, nous nous intéressons exclusivement aux rayonnements X. Malgré l'insuffisance des données concernant les rayons X, un certain nombre d'équipes s'attachent à combler ce manque de connaissances en étudiant l'impact d'une variation du débit de dose sur la réponse biologique qui sera abordé à la fin de cette partie.

A. Impact du débit de dose pour différentes sources d'irradiation

1. Etudes *in vitro*

La majorité des équipes étudient l'impact du débit de dose des rayonnements ionisants sur des cellules murines ou cancéreuses humaines en s'intéressant plus particulièrement aux effets sur la survie clonogénique mais aussi à son impact sur la sécrétion de cytokines inflammatoires, sur l'apoptose ou encore sur les dommages à l'ADN. En effet, Ebrahimian *et al.* s'intéressent à l'importance du débit de dose dans l'altération fonctionnelle et du profil inflammatoire des HUVECs suite à une irradiation de 2 Gy aux débits de dose de 1,4 et 4,1 mGy/h (Ebrahimian *et al.*, 2015). Une augmentation de relargage de cytokines inflammatoires (IL-6 et MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*) dans le milieu de culture cellulaire a été observée uniquement au plus fort débit de dose. Cette modification du profil inflammatoire est corrélée à une diminution de la capacité des HUVECs à former un réseau vasculaire dans le matrigel (Ebrahimian *et al.*, 2015). Par ailleurs, des lymphocytes, isolés d'un échantillon de sang d'un donneur unique, sont irradiés à 4 Gy par des rayons γ avec 5 débits de dose différents (0,15 ; 0,29 ; 0,7 ; 1,3 et 70,2 cGy/min). La formation de micronoyaux est impactée par le débit de dose lorsque celui-ci est inférieur à 0,29 cGy/min (Boreham *et al.*, 2000). L'apoptose radio-

induite n'est, quant à elle, pas impactée par les débits de dose utilisés dans cette étude. Une diminution du débit de dose est souvent accompagnée d'une réduction de l'effet biologique radio-induit. Ce phénomène est souvent décrit sous le nom d'effet débit de dose (« Dose-rate effect »). Par exemple, Bedford *et al.* se sont intéressés à ce phénomène sur des cellules HeLa et V79 synchronisées avec de la thymidine tritiée et irradiées à respectivement 38 ou 90 rads/h. Ces débits de dose correspondent respectivement à 0,38 ou 0,9 Gy/h (Bedford *et al.*, 1973) et sont donc éloignés des débits de dose classiquement utilisés en radiothérapie conventionnelle.

Cependant, l'irradiation à 5,86 Gy/min (6 MV, FF) et 24 Gy/min (10 MV, FFF) de cellules cancéreuses humaines (de poumon SW1573, de gliome T98G ou d'astrocyte D384) ne montre pas de différences de survie quel que soit le débit de dose utilisé (Verbakel *et al.*, 2013). Par ailleurs, Lasio *et al.* ont irradié des cellules de glioblastome humain (T98G et U87-MG) ainsi que des fibroblastes de poumon de hamster chinois (V79-4) à une dose unique de 5 et 10 Gy suivant différents débits de dose : 4 ; 14 et 24 Gy/min et à des tensions de 6 MV FF, 6 MV FFF et 10 MV FFF respectivement (Lasio *et al.*, 2014). Lasio *et al.* n'observent également aucune différence significative de la fraction survivante en fonction des différentes conditions d'irradiation (Lasio *et al.*, 2014).

2. Etudes *in vivo*

Les souris Apc^{Min/+} ont été caractérisées comme étant un modèle développant des tumeurs gastro-intestinales après une exposition aiguë aux rayons X (Haines *et al.*, 2000). Ainsi, Graupner *et al.* ont décidé d'irradier ces souris en corps entier à des doses de 1,7 et 3,2 Gy au ⁶⁰Co à un faible débit de dose (2,2 mGy/h) et à la dose de 2,6 Gy aux rayons X à un fort débit de dose (1,3 Gy/min) (Graupner *et al.*, 2017). Ils ont observé une augmentation des effets génotoxiques ainsi que de la fréquence des lésions à l'ADN (cassures simple brin et site abasique) au plus fort débit de dose. De plus, ils observent une augmentation des aberrations chromosomiques d'un facteur 3 et 10 au faible et fort débit de dose respectivement (Graupner *et al.*, 2017). Par ailleurs, des souris BALB/cJ irradiées en corps entier à une dose unique de 1 Gy par des protons ayant une énergie de 100 MeV montrent une différence d'expression de cytokines au niveau de la moelle osseuse en fonction du débit de dose utilisé (5 ou 10 mGy/min) (Rithidech *et al.*, 2010). En effet, 3 h post-irradiation, les interleukines IL-6 et IL-1 β sont plus exprimées au plus fort débit de dose 3 h après l'irradiation et au plus faible débit de dose pour les temps plus tardifs (24 h et 1 mois après l'irradiation) (Rithidech *et al.*, 2010). IL-4 et IL-10

sont significativement plus exprimées par rapport aux souris non irradiées 24 h après l'irradiation au débit de 5 Gy/min contrairement à 10 Gy/min (Rithidech et al., 2010).

Les études s'intéressant à l'impact d'une variation du débit de dose sur la réponse biologique *in vitro* et *in vivo* font également varier plusieurs autres paramètres comme la filtration (Verbakel et al., 2013; Lasio et al., 2014), la source d'irradiation, la dose (Graupner et al., 2017) ou encore la tension de l'appareil (Verbakel et al., 2013). L'effet observé ne reflète pas celui dû à une variation du débit de dose seul étant donné les nombreux paramètres qui varient entre les conditions d'irradiation. Je me suis alors focalisée sur les études utilisant uniquement des rayons X et ne faisant varier que le débit de dose dans cette deuxième sous partie.

B. Impact du débit de dose pour des irradiations aux rayons X

1. Etudes *in vitro*

Les études *in vitro* comparant les effets biologiques des rayons X suite à une variation du débit de dose portent essentiellement sur des cellules cancéreuses murines ou humaines. Une partie de ces études montrent un impact du débit de dose sur la réponse biologique *in vitro*. En effet, des auteurs observent une meilleure survie de cellules d'adénocarcinome de sein humain (MCF-7) suite à une irradiation par rayons X à 5 Gy/min comparée à 50 cGy/min (Oktaria et al., 2017) (Figure 39). Un différentiel de survie est également observé pour d'autres types cellulaires comme les cellules cancéreuses de glioblastomes humains T98G et U87-MG (Lohse et al., 2011) mais avec cette fois une survie favorable pour le débit de dose le plus faible (Figure 39). Un effet cytotoxique accru a également été mis en évidence sur des cellules humaines (A549) et de hamster chinois (V79) suite à une irradiation à 2 Gy/min comparé au débit de 1 Gy/min (Terashima et al., 2017).

Cependant, d'autres études montrent un même effet biologique suite à une variation de débit de dose. Les cellules cancéreuses pulmonaires non à petites cellules (NSCLC, *Non Small Cell Lung Carcinoma*) : H460 et les cellules de carcinome du col de l'utérus : SiHa (Karan et al., 2013) présentent une survie clonogénique identique (Figure 39) quel que soit le débit de dose utilisé au moment de l'irradiation (3,61 et 10,84 Gy/min). De plus, des cellules NSCLC : NCIH460 et des cellules cancéreuses de prostate : DU145 (King et al., 2013) montrent également une survie équivalente suite à une irradiation à 3,23 Gy/min et 11,29 Gy/min (Figure 39). La survie cellulaire est équivalente pour des cellules d'un carcinome de la tête et du cou :

FaDuDD (Sorensen et al., 2011) chez l'homme suite à une variation du débit de dose (5,01 ; 9,99 et 29,91 Gy/min) (Figure 39). Un constat similaire a été observé suite à une irradiation de cellules cancéreuses de rat (9L à 0,5 et 5 Gy/min (Oktaria et al., 2017)) ainsi que pour des fibroblastes de poumons de hamster chinois (V79 à 5,01 ; 9,99 et 29,91 Gy/min (Sorensen et al., 2011) ou 1 ; 1,5 et 2 Gy/min (Karan et al., 2013)) (Figure 39).

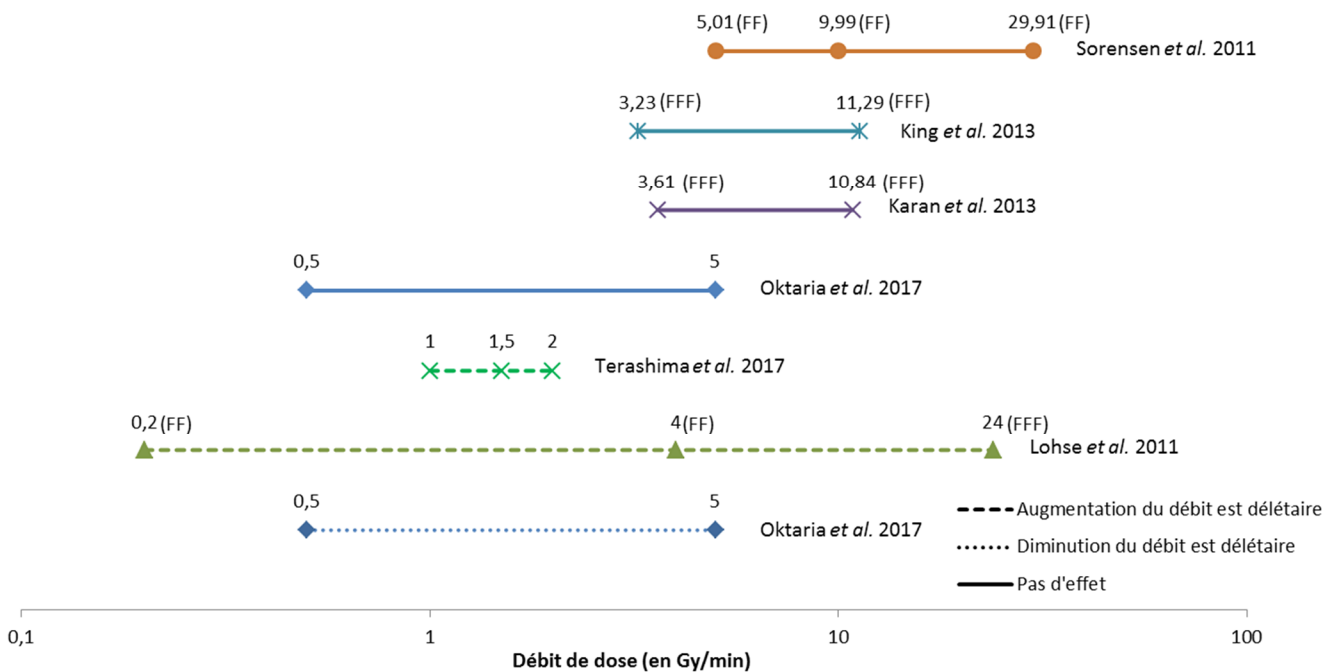


Figure 39 : Récapitulatif des études *in vitro* réalisées sur l'étude des effets biologiques dus à une variation du débit de dose pour des rayons X

FF : *Flattering Filter* (avec filtration), FFF : *Flattering Filter Free* (sans filtration). (Lohse et al., 2011; Sorensen et al., 2011; Karan et al., 2013; King et al., 2013; Oktaria et al., 2017; Terashima et al., 2017).

Nous pouvons cependant noter que la plupart de ces études se focalisent principalement sur la survie cellulaire suite à l'irradiation sans prendre en compte le phénotype et l'activité métabolique des cellules survivantes. En effet, ces critères ont été décrits comme importants dans la réponse tissulaire à l'irradiation (cf page 46, chapitre 2). De plus, pour une partie de ces études, l'augmentation du débit de dose est réalisée par le retrait du filtre égalisateur (Lohse et al., 2011; Karan et al., 2013) qui conduit à l'utilisation d'un faisceau d'irradiation non homogène (cf page 22, chapitre 1). Il est à noter que certaines études se sont également intéressées à l'impact du débit de dose sur la réponse à l'irradiation de cellules saines. En effet, Barendsen et al. ont irradiés des cellules rénales humaines saines à des débits de dose de 45,

120 et 260 rads/min correspondant respectivement à 0,045; 0,12 et 0,26 Gy/min (Barendsen et al., 1960). Barendsen et al. ont ainsi réalisé des mesures de la fraction survivante à l'aide du test de clonogénicité sans toutefois démontrer un impact du débit de dose. Dans ce manuscrit, nous avons choisis de nous intéresser plus particulièrement aux études ayant utilisées des débits de dose proche de 1 Gy/min afin de ne pas trop s'éloigner des débits de dose utilisés en clinique.

2. Etudes *in vivo*

A ma connaissance, peu d'études se sont intéressées *in vivo* à l'impact d'une variation du débit de dose pour des rayons X sur la réponse biologique. Les débits utilisés sont de l'ordre du mGy/min. Ces expositions sont très nettement inférieures à l'exposition en clinique qui est de l'ordre de 2 Gy/min. En effet, Turner *et al.*, ont étudié l'irradiation de souris C57BL/6 en corps entier (TBI, *Total Body Irradiation*) à différentes doses (0 ; 1,1 ; 2,2 et 4,45 Gy) et à deux débits de dose : 3,1 mGy/min et 1,03 Gy/min (Turner et al., 2015). Ils ont observé et démontré une augmentation des cassures double brin à l'ADN pour des doses inférieures à 4,45 Gy et un nombre de cellules lymphocytaires apoptotiques plus important suite à une irradiation au plus fort débit de dose (Turner et al., 2015).

Favaudon *et al.* s'intéressent à la réponse pulmonaire sur des souris C57BL/6J après des irradiations conventionnelles ($\leq 0,03$ Gy/sec) et FLASH (≥ 40 Gy/sec). Ils mettent ainsi en évidence l'apparition d'une fibrose pulmonaire suite à une irradiation conventionnelle qui n'est pas retrouvée avec une irradiation FLASH jusqu'à 36 semaines post-irradiation (Favaudon et al., 2014). L'irradiation FLASH permet également d'éviter l'apoptose précoce des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, une étude clinique de phase I s'intéresse au traitement de chats ayant un carcinome nasal pour déterminer la dose de tolérance maximal d'une radiothérapie FLASH (Vozenin et al., 2019). Cette étude montre un effet protecteur des irradiations FLASH sur le tissu sain et confirme ainsi l'avantage d'une irradiation FLASH sur des modèles animaux. De plus, ces deux études montrent un contrôle tumoral identique entre les irradiations FLASH et conventionnelles (Favaudon et al., 2014; Vozenin et al., 2019).

II. Connaissances sur le fractionnement de la dose

Les patients sont très rarement traités avec une dose unique d'irradiation. En effet, ils bénéficient d'une succession de fractions constituant le protocole de radiothérapie défini au

préalable par le radiothérapeute et les autres médecins spécialistes (cf page 22, chapitre 1). Plusieurs critères sont à prendre en compte lors du fractionnement de la dose thérapeutique comme le nombre de fractions, le temps entre les fractions, l'étalement du traitement, le débit de dose et l'énergie du rayonnement. Ainsi l'étude des effets biologiques des différents protocoles de fractionnement est complexe.

A. Etudes *in vitro*

Classiquement, les études *in vitro* se basent sur des irradiations ayant une dose totale équivalente pour comparer les différents protocoles de fractionnement entre eux. Notamment, l'équipe de Koyama irradie différents types de cellules humaines à une dose de 2 Gy administrée en 1, 2, 4 ou 8 fractions avec un étalement allant jusqu'à 4 jours (Koyama et al., 2018). Ils démontrent une diminution de la formation des micronoyaux (reflet des dommages à l'ADN) lorsque la dose est fractionnée (Tableau III). Terashima et al. ont étudié les critères d'étalement, de dose par fraction, de dose totale et d'intervalle de temps entre les fractions (Terashima et al., 2017). Leurs observations sur des cellules cancéreuses pulmonaires humaines (A549) et de hamster chinois (V79) là aussi à dose totale équivalente rapportent qu'une augmentation du nombre de fractions entraîne une diminution de la survie cellulaire. La dose par fraction semble jouer un rôle sur la radiosensibilité de ces cellules (Tableau III). Cependant, ils ne mettent pas en évidence une différence du nombre de cellules apoptotiques et de la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire liées au fractionnement de la dose. Par ailleurs, il a été démontré que l'irradiation fractionnée induit une augmentation de l'adhésion des leucocytes plus importante qu'une irradiation en dose unique sur des HUVECs toujours à dose totale équivalente (Cervelli et al., 2014).

Certains auteurs montrent que le fractionnement de la dose n'impacte pas la viabilité, l'apoptose, l'adhésion cellulaire et les dommages à l'ADN (focis γ -H₂Ax) suite à l'irradiation des HUVEC (Cervelli et al., 2014). L'expression des gènes TGF- β 1, IL-8, IL-1 β et FGF-2 sur des cellules humaines endothéliales d'artère ombilicale (HUAEC) ne semble pas non plus impactée par le fractionnement de la dose (Boerma et al., 2003) (Tableau III).

Dose totale	Fractionnement	Etalement	Effets	Source
2 Gy	2 x 1 Gy	1 fraction/72h	↘ du nombre de micronoyaux quand ↗ du nombre de fractions	Koyama et al. (2018)
	4 x 0,5 Gy	1 fraction/24h		
	8 x 0,25 Gy	1 fraction/12h		
2 Gy	1 x 2 Gy	1 fraction/min	- ↘ de la survie clonogénique quand ↗ nombre de fractions - Pas de différences dans le cycle cellulaire et l'apoptose	Terashima et al. (2017)
	2 x 1 Gy			
	4 x 0,5 Gy			
	8 x 0,25 Gy			
	1 x 2 Gy	1 fraction/10 sec		
	2 x 1 Gy			
	4 x 0,5 Gy			
	8 x 0,25 Gy			
	1 x 2 Gy	1 fraction/3 min		
	2 x 1 Gy			
	4 x 0,5 Gy			
	8 x 0,25 Gy			
4 Gy	16 x 0,25 Gy	1 fraction/10 sec		
8 Gy	32 x 0,25 Gy			
2 Gy	1 x 2 Gy	1 fraction/jour	Pas de différences d'expression génique (TGFβ1, IL1β, IL8, FGF2, PDGF-A,B,C)	Boerma <i>et al.</i> (2003)
4 Gy	2 x 2 Gy			
6 Gy	3 x 2 Gy			
8 Gy	4 x 2 Gy			
10 Gy	5 x 2 Gy			
0,125 Gy	1 x 0,125 Gy	1 fraction/jour	- ↗ adhésion des leucocytes quand ↗ nombre de fractions - Pas de différences sur la viabilité, l'apoptose, l'adhésion cellulaire et les dommages à l'ADN	Cervelli <i>et al.</i> (2014)
0,25 Gy	1 x 0,25 Gy			
	2 x 0,125 Gy			
0,5 Gy	1 x 0,5 Gy			
	2 x 0,25 Gy			

Tableau III : Principales études réalisées *in vitro* sur le fractionnement de la dose

↗ : augmentation, ↘ : diminution. (Boerma et al., 2003; Cervelli et al., 2014; Terashima et al., 2017; Koyama et al., 2018)

B. Etudes cliniques

Les protocoles conventionnels ou normofractionnés utilisés en clinique correspondent à l'administration quotidienne d'une dose de 2 Gy (du lundi au vendredi) sur une période allant de 5 à 8 semaines. L'évolution des protocoles de fractionnement amène à utiliser également l'hyperfractionnement et l'hypofractionnement. L'hyperfractionnement correspond à l'administration d'un nombre de fractions supérieur à celui d'un protocole normofractionné. La dose par fraction est généralement inférieure à 2 Gy et plusieurs fractions par jour peuvent être administrées au cours du traitement. Les protocoles hypofractionnés permettent, quant à eux, l'administration d'un nombre de fractions inférieur à celui des protocoles normofractionnés. Des essais cliniques de phase II et III, correspondant à ces nouveaux protocoles de fractionnement, seront abordés au cours de cette partie.

Les études cliniques de phase II permettent de s'intéresser à la tolérance des nouveaux protocoles de fractionnement. Concernant les protocoles hyperfractionnés, l'irradiation pulmonaire de patients atteints de cancer pulmonaire à petites cellules (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*) suivant des protocoles hyperfractionnés (30 x 1,5 Gy, 2 fractions/jour) comparé à des protocoles d'hypofractionnement modéré (15 x 2,8 Gy) ne montre pas de différence d'apparition d'effets indésirables après la radiothérapie (Gronberg et al., 2016) (Tableau IV).

Plusieurs études cliniques ont été réalisées au vu des nombreux avantages pratiques d'un hypofractionnement. En effet, ces nouveaux protocoles de radiothérapie permettent une diminution du nombre de séances pour le patient. Ainsi, le temps de traitement est réduit, ce qui permet d'augmenter considérablement le confort du patient (moins de déplacements vers le centre de soin). Le nombre de patients traités par jour est alors plus important tout en réduisant les coûts de traitements par patient pour le système d'assurance maladie (Supiot et al., 2015; Dupin et al., 2016). De plus, l'hypofractionnement permet de s'affranchir de la radiorésistance des tumeurs ayant un rapport α/β faible qui sont sensibles au fractionnement de la dose (Joiner et al., 2009).

Certaines études abordent les effets cliniques des irradiations suivant des protocoles d'hypofractionnement modéré, c'est-à-dire utilisant des doses par fraction comprises entre 2 et 5 Gy (Fonteyne et al., 2012; Gronberg et al., 2016). Ces protocoles ont été utilisés lors d'essais cliniques de phase II pour le traitement d'un cancer du poumon (Gronberg et al., 2016) et de la prostate (Fonteyne et al., 2012). Une faible toxicité gastro-intestinale et génito-urinaire est observée suite à l'irradiation de la prostate avec ces protocoles hypofractionnés (Fonteyne et al., 2012) et pas de différences de toxicité concernant l'essai clinique pour le traitement du cancer pulmonaire (Gronberg et al., 2016) (Tableau IV).

Type de fractionnement	Protocole de fractionnement	Nombre de patients	Toxicité	Cancer traité	Source
Hyperfractionnement	45 Gy (30 x 1,5 Gy)	157	Pas de différences d'induction d'oesophagite et de pneumopathie après RT	Poumon (SCLC)	Gronberg <i>et al.</i> (2015)
Hypofractionnement modéré	42 Gy (15 x 2,8 Gy)				
	56 Gy (16 x 3,5 Gy)	113	faible toxicité gastro-intestinale (rectum) et génito-urinaire	Prostate	Fonteyne <i>et al.</i> (2012)
Hypofractionnement sévère	32 à 34 Gy (4 x 8 à 8,5 Gy)	44			
	35 Gy (5 x 7 Gy)	112	20% dysfonction érectile*		
	36,25 Gy (5 x 7,25 Gy)	67	Toxicité urinaire et rectale	Prostate	Toledano <i>et al.</i> (2012) revue
	35 à 36,25 Gy (5 x 7 à 7,25 Gy)	41	20% dysfonction érectile* toxicité urinaire (1 patient)		
	35 à 36,25 Gy (5 x 7 à 7,25 Gy)	304	pas de toxicité		
	36,25 Gy (5 x 7,25 Gy)	32	53% dysfonction érectile*		
	40 Gy (10 x 4 Gy)	39	Peu de toxicité Bon control tumoral Bonne survie globale	Poumon (NSCLC)	Figlia <i>et al.</i> (2018)
	50 Gy (10 x 5 Gy)				
	60 Gy (10 x 6 Gy)				
	70 Gy (10 x 7 Gy)				
	60 Gy (8 x 7,5 Gy)	28	54% de réponse partielle ou complète	Métastases au poumon	Sole <i>et al.</i> (2012)
	60 Gy (3 x 20 Gy)				
36 à 60 Gy (3 à 5 x 12 Gy)					
60 Gy (8 x 7,5 Gy)	14		Métastases au foie ou rein		
36 Gy (3 x 12 Gy)					
	60 Gy (3 x 20 Gy)				

* si puissant avant RT

Tableau IV : Etudes cliniques en phase II

(Fonteyne *et al.*, 2012; Toledano *et al.*, 2012; Sole *et al.*, 2013; Gronberg *et al.*, 2016; Figlia *et al.*, 2018)

D'autres essais cliniques s'intéressent aux protocoles d'hypofractionnement important correspondant à des doses par fraction supérieures à 5 Gy. Plusieurs études se sont intéressées au traitement du cancer de la prostate (Toledano *et al.*, 2012) avec 6 protocoles de fractionnement différents (doses par fraction allant de 7 à 8,5 Gy). Les effets indésirables observés concernent l'apparition d'une dysfonction érectile et d'une toxicité urinaire et rectale chez les patients ayant reçu une dose par fraction allant de 7 à 7,25 Gy, aucune toxicité n'ayant été mise en évidence chez les patients traités avec une dose par fraction allant de 8 à 8,5 Gy (Toledano *et al.*, 2012). Des irradiations hypofractionnées ont également été menées chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC, *Non Small Cell Lung Cancer*) entraînant un bon contrôle tumoral couplé à une faible toxicité aux OARs (Figlia *et al.*, 2018) (Tableau IV). Les plus fortes doses par fraction (7,5 à 20 Gy) se retrouvent entre autres

dans les essais cliniques pour le traitement des métastases pulmonaires, hépatiques ou encore rénales (Sole et al., 2013).

Les études cliniques de phase III permettent de confirmer la tolérance de l'hypofractionnement et déterminer son efficacité par rapport aux protocoles conventionnels (ou normofractionnés). Plusieurs études cliniques de phase III concernent la prise en charge des cancers de la prostate (Toledano et al., 2012). Ainsi, une efficacité supérieure des protocoles hypofractionnés comparés aux protocoles normofractionnés a été rapportée avec notamment une toxicité souvent équivalente (Toledano et al., 2012; Dearnaley et al., 2016) (Tableau V). La diminution du nombre de fractions raccourcit la durée du protocole de 7,4 à 4 semaines. Ainsi, le traitement hypofractionné est alors recommandé étant donné un effet non inférieur du protocole hypofractionné par rapport au normofractionné allié au gain de temps de traitement (Tableau V).

De nos jours quelques centres administrent des protocoles d'hypofractionnement notamment pour le traitement du cancer du sein. L'étude rétrospective de Delaney *et al.* permet de regrouper les différentes expositions cliniques des patientes traitées pour un cancer du sein entre 2008 et 2012 dans un département (NSW) en Australie (Tableau V). L'étude recense 5880 patientes dont 3209 qui ont reçu un protocole normofractionné et 2671 un protocole hypofractionné (Delaney et al., 2016). Une des études permet de comparer un protocole normofractionné (25 x 1,8 Gy) et un protocole hypofractionné (4 x 5,75 Gy) et met en évidence un même effet biologique et un même niveau de toxicité (Baillet et al., 1990). Les 5 autres protocoles hypofractionnés allant de 2 à 3,3 Gy par fraction, utilisés dans 3 autres de ces études, montrent une toxicité identique ou moindre comparé au protocole normofractionné ainsi qu'une diminution de la fibrose mammaire (Owen et al., 2006; Whelan et al., 2010; Haviland et al., 2013).

Protocole de fractionnement	Nombre de patients	Résultats	Cancer traité	Source
64 Gy (32 x 2 Gy) 55 Gy (20 x 2,75 Gy)	217	Effet HF > NF		
80 Gy (40 x 2 Gy) 62 Gy (20 x 3,1 Gy)	1068	Effet HF > NF Même toxicité	Prostate	Toledano <i>et al.</i> (2012) revue
76 Gy (38 x 2 Gy) 70,2 Gy (26 x 2,7 Gy)	300	Même effet HF : 10% ⊕ de toxicité urinaire		
75,6 Gy (42 x 1,8 Gy) 72 Gy (30 x 2,4 Gy)	200	Même effet Même toxicité		
74 Gy (37 x 2 Gy) 60 Gy (20 x 3 Gy) 57 Gy (19 x 3 Gy)	3216	- Même toxicité à long terme - Moins 20 % de toxicité à court terme à 60 Gy (HF) qu'à 74 Gy (NF)	Prostate	Dearnaley <i>et al.</i> (2016)
45 Gy (25 x 1,8 Gy) 23 Gy (4 x 5,75 Gy)	525	Même effet et même toxicité		Baillet <i>et al.</i> (1990)
50 Gy (25 x 2 Gy) 42,5 Gy (16 x 2,7 Gy) 39 à 41,6 Gy (13 x 3 à 3,2 Gy) 40 Gy (15 x 2,7 Gy) 39 à 42,9 Gy (13 x 3 à 3,3 Gy)	5355	Pas moins toxique que NF Même effet et même toxicité Même effet mais moins toxique que NF Meilleure conservation de l'apparence du sein que NF	Sein	Whelan <i>et al.</i> (2010) Delaney <i>et al.</i> (2016) revue Haviland <i>et al.</i> (2013) Owen <i>et al.</i> (2006)

HF : Protocole hypofractionné
NF : Protocole normofractionné

Tableau V : Etudes cliniques en phase III pour le cancer de la prostate et une étude rétrospective pour le cancer du sein

(Toledano *et al.*, 2012; Dearnaley *et al.*, 2016; Delaney *et al.*, 2016)

Outre la dose par fraction, d'autres études cliniques abordent les problématiques d'étalement ou de fréquence d'administration du traitement. En effet, Glynne-Jones *et al.* montrent, chez les patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou, que l'administration d'un traitement 6 jours par semaine au lieu des protocoles classiquement utilisés (5 jours/semaine) entraîne un meilleur contrôle local de la tumeur à 5 ans (Broens *et al.*, 1998).

III. Qu'est-ce qu'un risque en radioprotection ?

Le risque est habituellement utilisé en radioprotection pour désigner l'apparition d'un effet dangereux et les conséquences sévères qui en résultent pour un travailleur du nucléaire au cours de son exercice professionnel (INRS, 2019). La prévention de ces risques est encadrée par plusieurs textes législatifs et réglementaires inscrits dans le Code de la santé publique et le Code du travail. En radiobiologie, le risque correspond à l'apparition d'effets indésirables suite à une exposition aux rayonnements ionisants dans le cadre d'un examen, d'un traitement médical ou d'un accident nucléaire. En clinique, les effets indésirables correspondent aux effets secondaires à court terme, à long terme ou encore le risque d'initiation d'un cancer radio-induit. En effet, suite à un traitement par radiothérapie, les patients peuvent développer une réponse aiguë se manifestant suite aux premières irradiations et disparaissant généralement à la fin du traitement. Ces effets précoces touchent essentiellement les tissus sains à renouvellement rapide comme l'épiderme ou les muqueuses. Les patients peuvent également développer une réponse tardive apparaissant cette fois généralement plusieurs mois après l'irradiation. Ces effets tardifs touchent principalement les tissus à renouvellement lent. Les lésions tardives peuvent être multiples. Le développement de la fibrose, d'un ulcère, d'une nécrose tissulaire, d'une atrophie ou encore des dommages vasculaires sont les effets le plus souvent retrouvés. Enfin, un cancer radio-induit peut également se développer plusieurs années après l'irradiation.

Les différents effets biologiques radio-induits mis en évidence et décrits jusqu'à ce jour peuvent être classés en effets stochastiques ou déterministes (Gambini & Granier, 2007). Les effets stochastiques (aléatoires ou probabilistes) apparaissent en général plusieurs années après l'exposition aux rayonnements ionisants mais de façon non systématique (Figure 40). Ces effets apparaissent pour des faibles ou des fortes doses d'irradiation (IRSN, 2017) et leur probabilité croît avec la dose (Figure 40).

Cependant, la gravité de ces effets est indépendante de la dose. Par exemple l'apparition d'un cancer secondaire induit par les rayonnements ionisants est un effet stochastique. D'autre part, les effets déterministes (obligatoires ou non stochastiques) correspondent aux effets apparaissant de façon certaine au-delà d'une dose seuil et leur gravité augmente avec la dose reçue (Figure 40). Ils sont retrouvés suite à une irradiation par des fortes doses et apparaissent rapidement. Ainsi, les travaux de Puck et Marcus concernant les effets radio-induits par les rayons X sur des cellules de mammifères (Puck et al., 1956) permettent d'introduire le concept de cellule cible (Gueulette, 2013). Il se base sur la création de lésions irréparables au niveau de

l'ADN conduisant à la mortalité des cellules. Ainsi, l'altération cellulaire radio-induite entraîne une perte de fonctionnalité de l'organe.

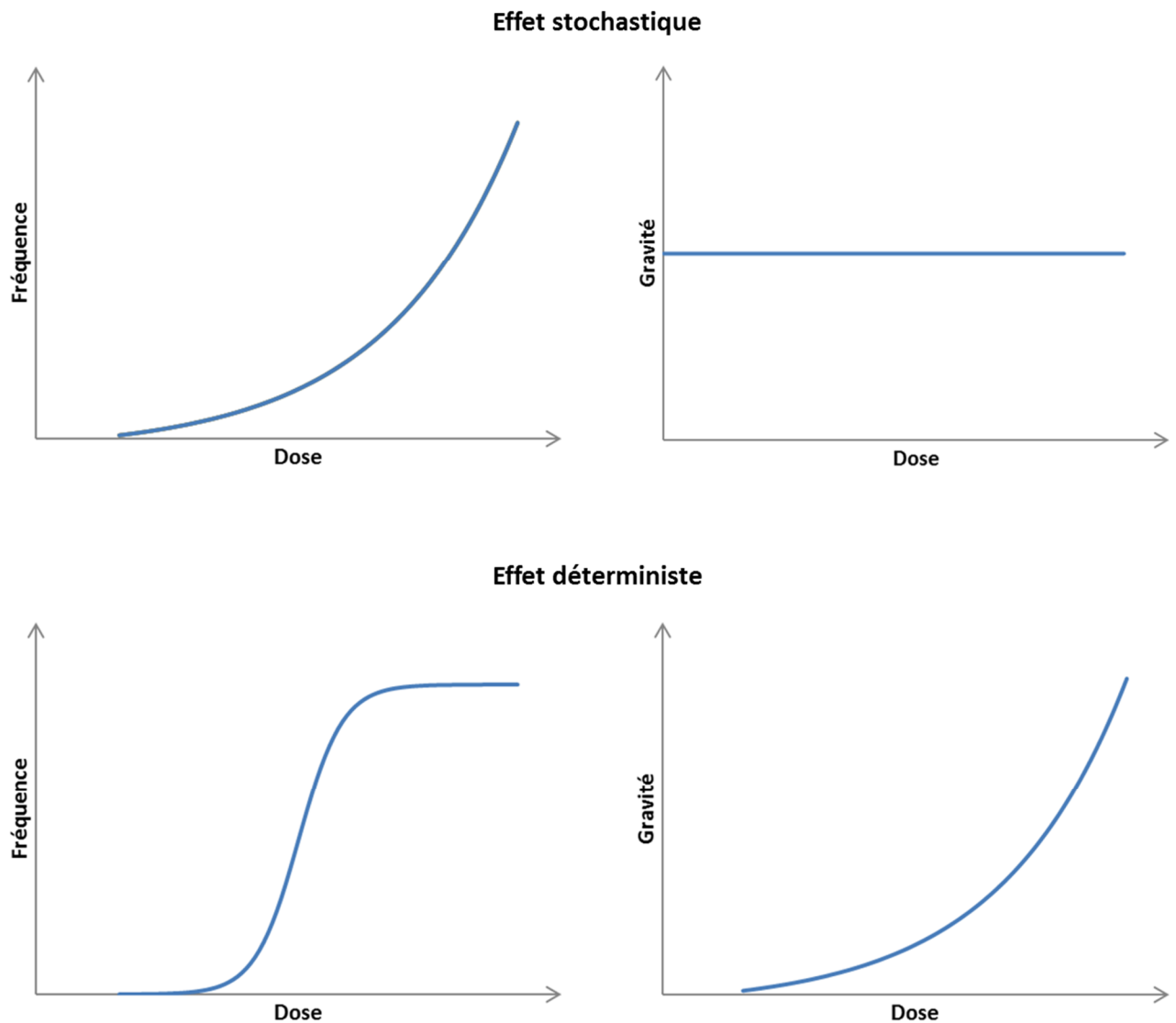


Figure 40 : Effets stochastiques et déterministes

Adapté de (Gambini & Granier, 2007).

Au cours de cette thèse, le terme « risque de complications », lié à l'exposition aux rayonnements ionisants, désigne le risque de développer un effet indésirable à long terme comme la fibrose, l'atrophie, l'ulcération et les dommages vasculaires. En effet, ces dernières sont la plupart du temps irréversibles et altèrent la qualité de vie du patient suite au traitement.

IV. Prédiction du risque de complications de nos jours

A. Modèle LQ et notion d'EBR

La sensibilité des cellules aux rayonnements ionisants est conventionnellement définie par la perte de la capacité d'une cellule irradiée à se diviser en cellules filles (Rafehi et al., 2011). Cette perte de capacité est quantifiée par le test de clonogénicité qui permet de déterminer la faculté d'une cellule à former une colonie (Franken et al., 2006), à repartir en prolifération suite à un stress, dans notre cas l'irradiation (Munshi et al., 2005; Franken et al., 2006). Ce test biologique *in vitro* permet de quantifier, à une dose donnée, le nombre de colonies formées suite à l'irradiation d'un nombre établi de cellules en conditions clonales, s'est à dire isolées (Figure 41). La survie clonogénique est généralement représentée par la survie cellulaire (échelle logarithmique) en fonction de la dose d'irradiation (échelle linéaire). La fraction survivante obéit alors à une loi exponentielle qui diminue avec la dose.

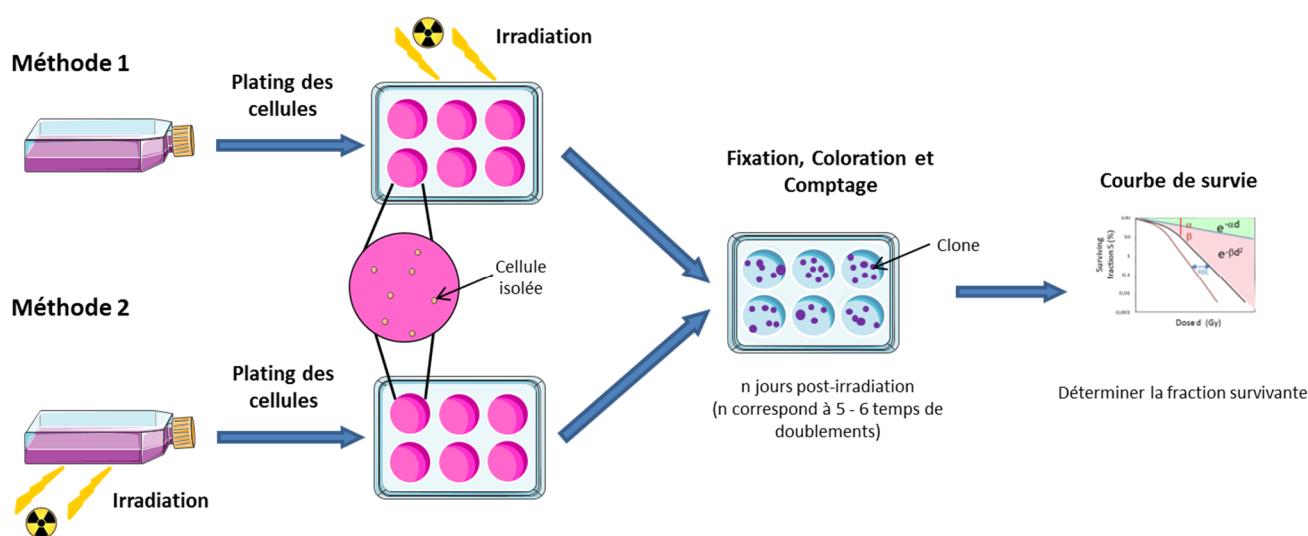


Figure 41 : Principe du test de clonogénicité

Inspirée de (Munshi et al., 2005; Franken et al., 2006; Rafehi et al., 2011)

Les courbes de survie sont ainsi modélisées par le « modèle linéaire quadratique » (Astrahan, 2008). Ce modèle comprend deux composantes. D'une part, une composante létale d'emblée correspondant au modèle linéaire qui est directement proportionnel à la dose (Figure 42). S'il est considéré que la cellule possède une structure vitale radiosensible, chaque particule ionisante traversant une cellule est susceptible d'induire un événement directement létal. La dose létale moyenne ($1/\alpha$) est donc la dose pour laquelle le nombre moyen d'évènements létaux

pour la cellule est égal à 1 (Gueulette, 2013), c'est donc la dose pour laquelle le taux de survie est de 37 % ($= \exp(-1)$).

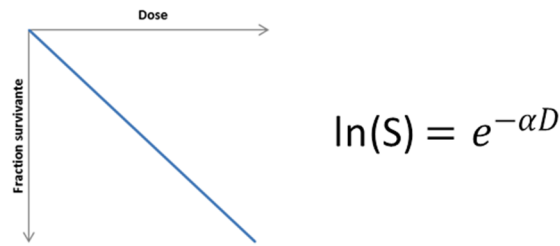


Figure 42 : Représentation du modèle linéaire
Inspiré de (Gueulette, 2013).

D'autre part, s'il est considéré que la cellule possède n structures vitales radiosensibles, il existe un modèle à 1 composante d'accumulation de lésions sublétales représenté par le modèle quadratique qui est proportionnelle au carré de la dose (Figure 43). Cette composante correspond à l'arrivée de 2 particules ionisantes sur la même cellule. En effet, la cellule est le siège de lésions sublétales dont l'accumulation conduit à la mortalité cellulaire. Il est supposé que la mort survient après au moins deux lésions sublétales. La composante β représente alors la probabilité d'apparition d'un évènement sublétal.

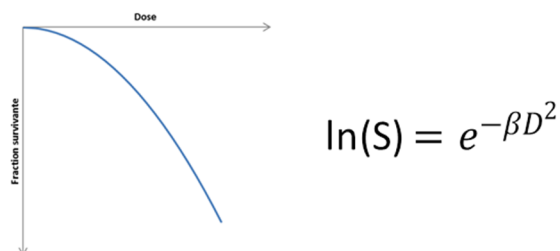


Figure 43 : Représentation du modèle quadratique
Inspiré de (Gueulette, 2013)

Le « modèle linéaire quadratique » ou modèle LQ (*Linear Quadratic*) est la combinaison de ces deux modèles simples permettant de prendre en compte les deux composantes (Figure 44). Les effets biologiques tissulaires précoces et tardifs dépendent entre autres de la létalité des cellules et peuvent être interprétés quantitativement par les courbes de survie clonogénique des cellules correspondantes. Grâce à ces dernières, il est possible de déterminer le rapport α/β correspondant à la dose pour laquelle la mortalité est due en parts égales à des dommages directement létaux (α) et à l'accumulation de dommages sublétaux (β) (Hennequin et al., 2013).

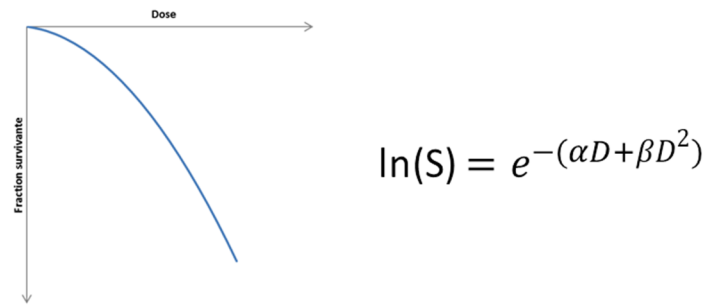


Figure 44 : Représentation du modèle LQ
 Inspiré de (Gueulette, 2013)

Le rapport α/β permet d'estimer rapidement la sensibilité au fractionnement d'un tissu (tumoral ou sain). Pour les tissus sains, il est intéressant de distinguer 3 groupes de tissus en fonction de la valeur du rapport α/β . En effet, pour les tissus à prolifération rapide comme la peau ou l'intestin, le rapport α/β est considéré comme égal à 10 Gy (Barendsen, 1982). Pour les tissus de soutien, l' α/β serait plutôt égal à 5 Gy. Enfin, pour les tissus sains à réponse lente comme pour le rein, les poumons ou le système vasculaire, le rapport α/β est généralement considéré comme égal à 3 Gy (entre 0,5 et 6 Gy) (Joiner & Van der Kogel, 2009). Contrairement au tissu sain, le tissu tumoral a un rapport α/β de l'ordre de 10-20 Gy. Il existe cependant des exceptions comme les tumeurs mammaires ($\alpha/\beta \approx 4$ Gy (Hennequin & Dubray, 2013)) et prostatiques ($\alpha/\beta < 2$ Gy (Toledano et al., 2012)). Ainsi le rapport α/β apparaît comme inversement proportionnel à la sensibilité au fractionnement. Néanmoins, la valeur du rapport α/β ne renseigne aucunement sur la radiosensibilité des cellules concernées qui est, quant à elle, déterminée par la tangente à l'origine des courbes de survie (Gueulette, 2013). En effet, deux lignées de radiosensibilités très différentes peuvent avoir un rapport α/β identique (Figure 45).

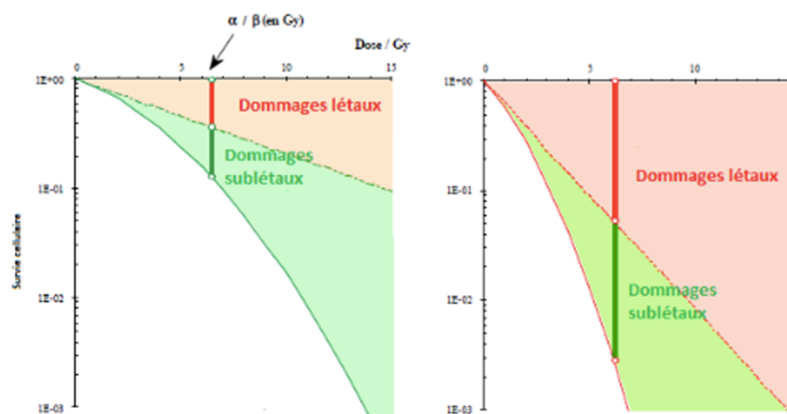


Figure 45 : Rapports α/β identiques pour deux lignées de radiosensibilités différentes
 (Gueulette, 2013)

De nos jours, le modèle LQ est presque universellement utilisé pour calculer les doses d'isoeffet pour différents protocoles de fractionnement (Brenner, 2008). Afin de comparer

2 types de rayonnement entre eux ou 2 modalités d'irradiation, les mesures d'Efficacité Biologique Relative (EBR ou RBE, *Relative Biological Effectiveness*) ont été décrites (Figure 46). L'EBR est un concept défini par le rapport de la dose d'un rayonnement de référence à la dose d'un rayonnement étudié pour un même effet observé (Herskind et al., 2017).

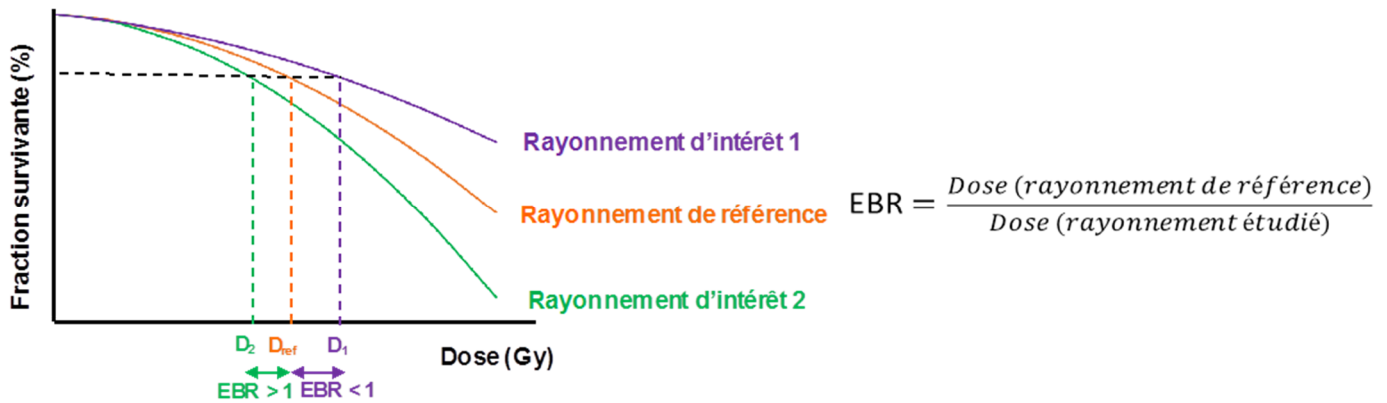


Figure 46 : Concept d'EBR et son application pour la comparaison de différents types de rayonnements

Le rayonnement d'intérêt 1 est moins efficace que le rayonnement de référence. A l'inverse, le rayonnement d'intérêt 2 est plus efficace que celui de référence.

Par exemple, lorsqu'un rayonnement d'intérêt induit le même effet biologique qu'un rayonnement de référence mais avec l'administration d'une dose plus importante, on retrouve une $EBR < 1$ ce qui signifie que le rayonnement d'intérêt est moins efficace que le rayonnement de référence (Figure 46). Cette notion d'EBR est utilisée pour prédire les effets biologiques suite à diverses situations d'exposition et peut servir, par extrapolation, à prédire un risque de complications aux tissus sains.

Historiquement, et encore aujourd'hui, l'EBR est essentiellement basée sur le test de survie clonogénique (Puck & Marcus, 1956). Cependant, il a été démontré que les résultats obtenus avec ce test de clonogénicité peuvent être fortement impactés par la méthodologie utilisée en fonction du type cellulaire étudié (Pomp et al., 1996). L'efficacité d'ensemencement (PE, *Plating Efficiency*) correspond au rapport entre le nombre de colonies formées et le nombre de cellules ensemencées avant traitement. Il a été montré que pour certains types cellulaires l'efficacité d'ensemencement dépend de la concentration cellulaire au moment de l'ensemencement (Pomp et al., 1996). De plus, la formation des clones n'est pas toujours strictement proportionnelle au nombre de cellules ensemencées (Eliason et al., 1985; Pomp et al., 1996). En effet, en fonction du type cellulaire, il a été montré que la formation des clones pouvait être soit augmentée soit diminuée lorsque la concentration des cellules ensemencées augmente (Eliason et al., 1985). La fraction survivante prend en compte le nombre de clones

formés ainsi que l'efficacité d'ensemencement. Ces paramètres influencent le calcul de la fraction survivante et peuvent donc affecter l'interprétation des résultats obtenus par le test de clonogénicité (Pomp et al., 1996).

B. Un modèle prédictif ou des modèles prédictifs ?

Certains auteurs estiment que le modèle linéaire quadratique ne serait pas adapté aux nouvelles pratiques utilisées en radiothérapie. Ils soulignent les limites du modèle pour des doses ablatives utilisées en radiochirurgie ou les fortes doses par fraction qui sont retrouvées dans le cas de l'hypofractionnement important (Kirkpatrick et al., 2008; Kirkpatrick et al., 2009). Le modèle LQ a été initialement dérivé pour s'adapter aux observations expérimentales *in vitro* des effets de la dose et du fractionnement sur la survie cellulaire, les dommages chromosomiques et les effets radio-induits aigus. Les mécanismes sous-jacents impliqués par le modèle LQ ne reflèteraient pas les dommages vasculaires produits aux fortes doses par fraction (> 10 Gy/fraction (Kirkpatrick et al., 2009)) et ignorent l'impact des sous-populations de cellules radiorésistantes (Kirkpatrick et al., 2008). Kirkpatrick *et al.* soutiennent le fait que le modèle LQ serait inapproprié pour les fortes doses par fraction et les doses ablatives utilisées en radiochirurgie (15 à 24 Gy) (Kirkpatrick et al., 2008). En effet, ce modèle n'expliquerait pas avec précision les données cliniques observées puisqu'il a été montré qu'une forte dose unique est plus efficace que la dose totale biologique efficace calculée à partir du modèle LQ pour un fractionnement conventionnel en radiothérapie (Kirkpatrick et al., 2009). Par exemple, les doses calculées pour un bon contrôle tumoral de métastases cérébrales utilisant les données *in vitro* suggèrent une dose de 25 à 35 Gy (Kirkpatrick et al., 2008). Or les doses efficaces observées en clinique sont de 15 à 20 Gy pour le traitement de la pathologie (Kirkpatrick et al., 2008). Le modèle LQ sous-estime alors la dose nécessaire au contrôle tumoral. Les incertitudes des valeurs du rapport α/β apparaissent comme influençant le calcul des doses équivalentes (Hennequin & Dubray, 2013). De plus, ce modèle a été dérivé en grande partie des observations *in vitro*, plutôt qu'*in vivo*. Seulement quelques études portent sur des irradiations corps entier pour l'étude de la survie des cryptes (Thames et al., 1981; Tucker et al., 1983). Par conséquent, le modèle LQ ne prend pas en compte l'impact du rayonnement ionisant sur les tissus sains autour de la tumeur ainsi que l'hétérogénéité cellulaire dans l'environnement tumoral (Kirkpatrick et al., 2008). Les auteurs défendant une précision du modèle LQ incluent l'utilisation d'un facteur temporel G, décrit par Lea-Catcheside *et al.*, prenant en compte le temps total du traitement (Kirkpatrick et al., 2009) (Équation 1).

$$G = (2/D^2) \int_{-\infty}^{\infty} R(t)dt \int_{-\infty}^t e^{-\lambda(t-t')} R(t')dt'$$

Équation 1 : Facteur G

R(t) distribution temporelle de la dose ; λ facteur de réparation d'un dommage au temps t et d'un autre au temps t' ; D dose totale du traitement (Kirkpatrick et al., 2009).

Par ailleurs, à des fortes doses par fraction, une erreur de réparation peut persister entraînant une relation linéaire entre l'effet et la dose. L'ensemble des mécanismes peuvent alors être modélisés par une relation dose réponse « linéaire quadratique linéaire » ou modèle LQL (*Linear Quadratic Linear*) comme l'ont souligné plusieurs auteurs (Astrahan, 2008; Kirkpatrick et al., 2009). Par exemple, un modèle LQ₃-L₆ décrit une courbe suivant un modèle LQ avec un rapport $\alpha/\beta = 3$ Gy qui se finit par une portion linéaire pour des doses supérieures à 6 Gy (Astrahan, 2008). Bien que de nombreuses modifications aient été proposées au modèle LQ pour refléter la cinétique de réparation, les taux de repeuplement, les effets de volume et l'impact de la chimiothérapie concomitante, tous ces modèles supposent toujours implicitement que les mécanismes sous-jacents sont les dommages et la réparation de l'ADN (Kirkpatrick et al., 2008).

De plus, il a été décrit par Fertil *et al.* ainsi que Deschavanne *et al.*, l'importance des conditions de culture sur la fraction survivante de 446 et 694 différents types de cellules humaines respectivement (Deschavanne et al., 1996; Fertil et al., 1999). En effet, le milieu de culture, la méthode choisie pour le test de clonogénicité et la présence ou non d'un gel lors de la culture affectent la radiosensibilité intrinsèque des cellules. Ces observations montrent alors une incertitude des paramètres α , β et du rapport α/β qui sont déterminés par le test de survie clonogénique. Les modèles TCP et NTCP, dérivant du modèle LQ, sont alors impactés par ces incertitudes (Wang, 2010).

En clinique, les modèles NTCP (*Normal Tissue Complication Probability*) et TCP (*Tumor Control Probability*) sont utilisés respectivement pour prédire la probabilité de complications au tissu sain et la probabilité de contrôle tumoral (Kulik et al., 2002; Joiner & Van der Kogel, 2009). Ces modèles peuvent servir à évaluer la qualité d'un plan de traitement. Le modèle TCP permet de prédire le taux de survie des cellules cancéreuses. Pour ce modèle plusieurs hypothèses ont été admises : une tumeur est contrôlée localement si toutes ses cellules sont éradiquées, une tumeur est composée d'un nombre de cellules clonogènes fixé. Le modèle TCP peut également prendre en compte la prolifération des cellules tumorales en fonction du temps de traitement (Équation 2).

$$TCP = \exp(-N_0 \exp(-\alpha D + \ln(2) T_t / T_D))$$

Équation 2 : Modèle TCP

N_0 : nombre de cellules initiales ; D : dose totale ; $\exp(-\alpha D)$: probabilité de survie ; T_t : temps de traitement ; T_D : temps de doublement. (Kulik et al., 2002).

Le modèle TCP se base sur la formule de Poisson qui permet de déterminer le nombre moyen de cellules survivantes à la fin du traitement correspondant à $N_0 \exp(-\alpha D + \ln(2) T_t / T_D)$ (Equation 2). Plusieurs équations prenant en compte un dépôt de dose non uniforme sur le tissu ou encore une variabilité de radiosensibilité entre les patients dérivent du modèle de TCP (Gonzalez et al., 2008). Certains modèles intègrent également au modèle de TCP, la valeur de la fraction survivante à 2 Gy du test de clonogénicité (Buffa et al., 2001).

Le NTCP permet, quant à lui, de prédire l'impact de la distribution de la dose sur les tissus sains autour de la tumeur (Kulik et al., 2002; Joiner & Van der Kogel, 2009). Plusieurs modèles prédictifs de la réponse des tissus sains ont été proposés dans la littérature (Yorke, 2001; Kong et al., 2007). Le plus utilisé est le modèle de Lyman (Équation 3) qui permet de prendre en compte la probabilité de complication au tissu sain en fonction de la dose absorbée, du volume irradié, du fractionnement de la dose et de la distribution de la dose (Lyman, 1985).

$$NTCP(D) = 1/\sqrt{(2\pi)} \int_0^{(D - TD50(v))/(mTD50(v))} \exp(-t^2/2) dt$$

Équation 3 : Modèle NTCP de Lyman

D : dose au volume cible; v : volume irradié ; m : pente de la courbe dose-réponse ; $TD50$: dose induisant 50 % de complications avec un dépôt de dose uniforme au volume de référence. (Yorke, 2001).

Dans ce modèle, le facteur $TD50$ correspond à la dose qui entraîne 50 % de complications au tissu sain s'il est considéré que le dépôt de la dose est uniforme sur un volume de référence (Yorke, 2001). Le volume de référence correspond au volume total de l'organe irradié qui est généralement obtenu grâce à l'imagerie CT.

C. Notion de BED

Les protocoles en radiothérapie varient en fonction de plusieurs facteurs notamment du type de tumeur, de son stade, de sa localisation et parfois de la volonté du patient. Il apparait nécessaire d'avoir des mesures permettant de « normaliser » l'efficacité des différentes approches en radiothérapie. Les oncologues radiothérapeutes disposent actuellement de modèles radiobiologiques (modèle LQ issu de la courbe de survie) et de rapports α/β leur

permettant de calculer les doses biologiques équivalentes quand la dose par fraction est modifiée (SFRO, 2007). Le terme de « dose biologique effective » ou BED (*Biologically Effective Dose*) a été introduit et dérive du modèle LQ (Équation 4). Les calculs de BED prennent en compte la dose par fraction d , le nombre total de fractions n et le rapport α/β (Équation 4) (Fowler, 2010). Les calculs de BED sont utilisés en radiobiologie pour comparer les effets biologiques de différents protocoles de fractionnement.

$$\text{BED} = nd \left[1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right]$$

Équation 4 : Concept de BED
(Fowler, 2010)

Cependant, le modèle LQ et donc indirectement la BED sont décrits comme limités puisqu'ils ne prennent pas en compte de facteur temporel comme le temps global du traitement (Barendsen, 1982; Dale, 1985; Fowler, 2010). En effet, Dale *et al.* mais aussi Fowler expliquent que la repopulation par les cellules tumorales est un paramètre important à prendre en compte (Dale, 1985; Fowler, 2010). Fowler propose ainsi une autre formule de BED prenant en compte, en plus du nombre de fraction, de la dose par fraction et du rapport α/β , le nombre total de jours de traitement T , le temps nécessaire à la repopulation tumorale T_k et le temps de doublement des cellules T_p) (Equation 5) (Fowler, 2010).

$$\text{BED} = nd \left[1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right] - \log_e 2 \frac{(T - T_k)}{\alpha T_p}$$

Équation 5 : Formule de BED selon Fowler.
(Fowler, 2010)

V. Modèles d'études *in vivo* en radiobiologie

Plusieurs modèles animaux sont utilisés en radiobiologie pour étudier les effets des rayonnements ionisants. Les irradiations peuvent être soit localisées au niveau d'un organe, d'une sous structure ou alors sur un champ plus large comme les irradiations en thorax entier et pouvant aller jusqu'à une irradiation corps entier. Cette partie du manuscrit de thèse se focalise sur les différents modèles animaux utilisés pour mettre en évidence les effets biologiques radio-induits de manière fiable. En général, les études utilisent des mâles afin de s'affranchir des possibles effets du cycle œstrogénique sur la réponse radio-induite. De plus,

des paramètres tels que l'âge des animaux, la qualité du rayonnement, le débit de dose, l'homogénéité de la dose, le statut sanitaire des animaux et les soins (administration d'antibiotiques à large spectre et transfusion sanguine par exemple) sont considérés comme des points clés à prendre en compte (Williams et al., 2010; Booth et al., 2012).

A. Irradiation en corps entier

Les irradiations en corps entier (TBI, *Total Body Irradiation* ou WBL, *Whole Body Irradiation*) sur des modèles murins comme la souris ou le rat ont montré leur efficacité et robustesse pour évaluer un effet global de l'irradiation sur plusieurs systèmes biologiques (Figure 47).

En effet, le système immunitaire, le système gastro-intestinal ou encore le système hématopoïétique sont sensibles aux irradiations TBI (Williams et al., 2010; Booth et al., 2012). Il a été établi chez la souris C57BL/6J qu'un syndrome hématopoïétique apparaît pour des doses supérieures à 8 et 9 Gy et un syndrome gastro-intestinal à partir de 13 Gy (Paris et al., 2001; Williams et al., 2010). Ces deux syndromes sont létaux pour l'animal, à l'exception des animaux recevant une greffe de moelle avant le développement du SGI qui peuvent survivre (Paris et al., 2001).



Figure 47 : Photos de l'irradiation en TBI chez la souris C57BL/6J à l'aide d'un accélérateur linéaire médical (LINAC)

Photos d'irradiations réalisées au LINAC à l'IRSN.

Les irradiations en corps entier reflètent les expositions humaines dans le cas d'un accident dans l'industrie nucléaire comme Tchernobyl en 1986 ou Fukushima en 2011. La souris a été jugée l'espèce la plus appropriée pour l'étude des effets radio-induits en raison de l'étendue des connaissances et études actuelles. Cependant, il est conseillé d'utiliser plusieurs souches de souris comme C57BL/6, C3H/HeN, B6D2F1/J et BALB/c (Williams et al., 2010). En effet, il existe une variation de la réponse biologique en fonction de la souche de souris irradiée. Il a été montré que la dose létale à 50% ($LD_{50/30}$, qui correspond à l'induction d'une mortalité chez

50% des animaux à 30 jours) varie entre 6,5 et 9 Gy chez les souris BALB/c qui sont les plus radiosensibles et les souris C57BL/6 qui sont les plus radiorésistantes. Pour l'étude des effets sur le système hématopoïétique il est également possible et approprié d'utiliser des modèles canins et primates non humains notamment pour réaliser des analyses hématologiques. Concernant le système gastro-intestinal, les modèles d'étude dépendent du processus pathologique étudié. Néanmoins, ce dernier reste particulièrement adapté pour l'étude de l'absorption intestinale, la sécrétion intestinale, la translocation bactérienne ou encore la diminution du nombre d'entérocytes au niveau de la barrière intestinale (Williams et al., 2010).

B. Irradiation de la zone abdominale

Les traitements par radiothérapie pour les cancers de la zone abdomino-pelvienne entraînent des dommages précoces comme la diarrhée chez 20 à 75 % des patients traités. Les dommages chroniques tardifs au niveau intestinal se retrouvent chez 5 à 20 % des patients traités par radiothérapie (Tagkalidis et al., 2001). L'irradiation de l'intestin grêle entraîne des modifications morphologiques et histologiques visibles dès les premières heures qui suivent l'irradiation (Rubio & Jalnas, 1996). Il existe des corrélations physiopathologiques entre la toxicité intestinale radio-induite (Coia et al., 1995; Kavanagh et al., 2010) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) (Sairenji et al., 2017). L'irradiation abdominale totale apparaît comme une technique rapide, simple et adaptable à plusieurs modèles animaux mais limitée en termes de survie animale. Il est donc plus judicieux d'utiliser des irradiations localisées de l'intestin qui permettent une survie plus importante chez l'animal afin de rendre possible l'apparition des effets radio-induits tardifs. A ce jour, il existe deux méthodes d'irradiation : la scrotalisation et l'anse intestinale extériorisée. La scrotalisation est pratiquée uniquement chez des rats mâles et consiste à fixer une anse intestinale dans le scrotum après castration des animaux. Cette technique a été introduite par l'équipe d'Hauer-Jensen et réalisée sur des rats Sprague-Dawley (Hauer-Jensen et al., 1988). Elle permet de réaliser des irradiations fractionnées afin de se rapprocher le plus possible des protocoles utilisés en pratique clinique. L'irradiation au niveau de l'anse intestinale extériorisée est une technique connue (Figure 48) et les effets biologiques et histologiques radio-induits ont largement été décrits dans la littérature (Rubio & Jalnas, 1996; Toullec et al., 2018).

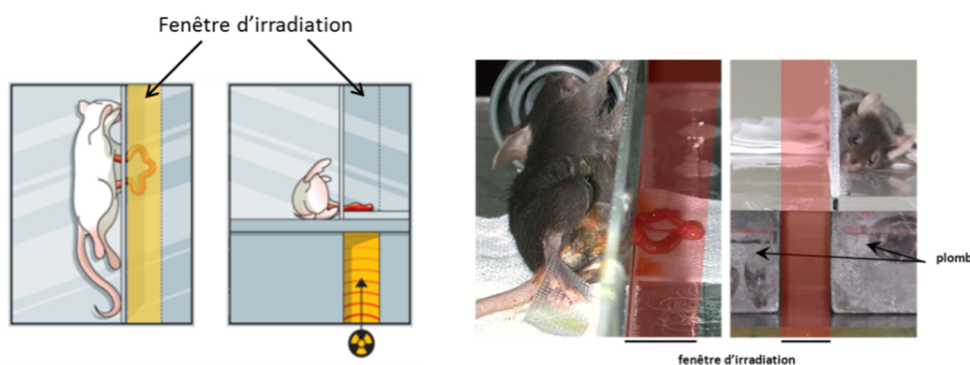


Figure 48 : Illustrations pour les irradiations abdominales au niveau de l'anse intestinale extériorisée chez la souris C57BL/6J

Photos d'irradiations réalisées au LINAC à l'IRSN.

Cette technique consiste à réaliser une incision au niveau de l'abdomen de l'animal afin d'extérioriser une anse intestinale. Cette dernière est par la suite irradiée tout en protégeant le reste de l'animal à l'aide de blocs de plomb (Figure 48). Par la suite, l'anse intestinale est replacée dans l'abdomen de l'animal et les plans musculaires et cutanés sont suturés. Des doses de 19 Gy et 21 Gy, respectivement chez la souris et le rat, sont nécessaires et suffisantes pour induire l'apparition des lésions chroniques radio-induites tout en gardant un taux de mortalité acceptable. En effet, après l'irradiation, 40 % des souris survivent au-delà de 10 jours (Milliat et al., 2008) et les rats survivent au-delà de 30 jours (Rubio & Jalnas, 1996). Il a été montré une survie jusqu'à environ 6 mois pour des rats irradiés à des doses de 18 à 29,6 Gy avec la technique de scrotalisation intestinale (Francois et al., 2003). Cependant, cette méthode d'irradiation est limitée pour les irradiations fractionnées en raison de l'acte chirurgical. Avec cette méthode d'irradiation, Rubio & Jalnas mettent en évidence une nécrose cellulaire, une diminution du nombre et de la longueur des cryptes, une ulcération, une congestion des capillaires ou encore une fibrose au niveau de l'épithélium intestinal après l'exposition (Rubio & Jalnas, 1996).

Au cours de la thèse, nous avons choisi l'irradiation à une dose unique au niveau de l'anse intestinale extériorisée sur des souris C57BL/6J pour l'étude des dommages radio-induits (Figure 48). Les effets d'une irradiation localisée de l'intestin grêle sont largement décrits et bien connus dans la littérature (Rubio & Jalnas, 1996; Milliat et al., 2008). Au niveau histologique, les souris irradiées avec cette technique développent des dommages tissulaires à partir d'une semaine après l'irradiation et la fibrose s'observe à six semaines. La lésion radique se développe donc sur un temps court et raisonnable pour un projet de thèse. De plus, cette technique a l'avantage d'être utilisée et maîtrisée au laboratoire depuis quelques années. Elle a

notamment été utilisée au cours d'un précédent projet de thèse afin de mettre en évidence le rôle de la protéine PAI-1 dans le développement de l'entérite radique (Rannou et al., 2015).

C. Irradiation de la zone thoracique

La fonction pulmonaire est altérée lorsqu'un grand volume est irradié. Il s'agit d'un organe à risque qui limite la dose reçue chez les patients recevant une irradiation corps entier en vue d'une transplantation de moelle osseuse par exemple (Steinberg et al., 1993; Gocheva, 2004). Cette sensibilité est également retrouvée lors des accidents nucléaires et radiologiques comme pour Chernobyl où les premières victimes sont décédées entre autres suite à une pneumopathie radique (UNSCEAR, 2000). Par ailleurs, les traitements par radiothérapie pour les cancers de la zone thoracique entraînent l'irradiation inévitable d'une partie ou de la totalité du poumon. En raison de la sensibilité du poumon aux rayonnements ionisants, il est nécessaire de mettre en place des méthodes d'irradiation sur les modèles animaux permettant les études des lésions tissulaires radio-induites en lien avec les nouveaux protocoles de radiothérapie. Les modèles animaux recommandés pour l'étude des lésions pulmonaires radio-induites sont principalement la souris et le rat, plus particulièrement les souris C57BL/6J et C3H/HeN. Cependant, les modèles primates non humains ou secondairement les chiens sont décrits comme étant également de bons modèles mais sont beaucoup plus contraignants à utiliser (Williams et al., 2010). En effet, ces modèles soulèvent d'importants problèmes éthiques (supérieurs à ceux rencontrés dans le cadre de l'utilisation expérimentale des autres espèces animales), étant donné la proximité de ces animaux avec l'homme (d'un point de vue phylogénétique pour les primates non humains et social pour les chiens). Les études mettent en évidence une inflammation, une pneumopathie radique, une fibrose, une modification d'expression génique d'interleukines et de cytokines pro-inflammatoires au niveau des poumons après l'irradiation (Franko et al., 1991; Lehnert et al., 1991; Chiang et al., 2005).

Ainsi, trois principales méthodes d'irradiation ont été décrites : l'irradiation du thorax entier, de l'hémithorax et l'irradiation stéréotaxique. L'irradiation du thorax entier est une technique utilisée fréquemment sur des souris C57BL/6J ou C3H/HeN (Chiang et al., 2005). Cette technique consiste à anesthésier les animaux qui sont ensuite déposés au-dessus de plaques de plomb permettant de protéger le reste du corps des rayonnements (Figure 49).

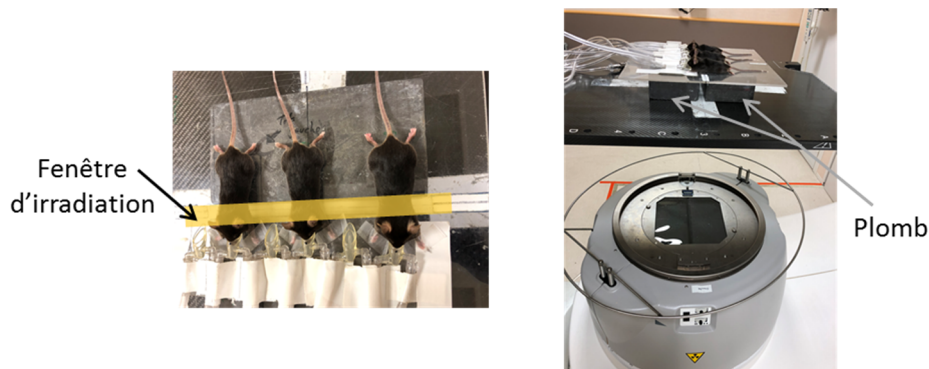


Figure 49 : Photos de l'irradiation en thorax entier chez la souris C57BL/6J à l'aide d'un accélérateur linéaire médical (LINAC)

Photos d'irradiations réalisées au LINAC pendant le projet de thèse à l'IRSN.

La zone d'irradiation où est positionné le thorax de l'animal correspond à une bande de largeur constante (1,5 cm pour les souris) (Chiang et al., 2005). Chez les souris C57BL/6J, Chiang *et al.* montrent la mise en place d'une fibrose 6 mois après une irradiation en thorax entier pour des doses supérieures à 6 Gy avec une intensité proportionnelle à la dose (Chiang et al., 2005). Pour les souris irradiées à 20 Gy, la fibrose commence à se mettre en place à partir du 4^{ème} mois suivant l'irradiation (Chiang et al., 2005).

L'irradiation de l'hémithorax consiste à irradier l'un des deux poumons. Chez les souris CBA et C57Bl/Cbi, Down *et al.* montrent que cette technique d'irradiation permet le développement d'une pneumopathie radique à 6 mois en évitant la létalité et l'épanchement pleural classiquement observés lors d'une irradiation en thorax entier (Down et al., 1986). De plus, ils montrent une augmentation de la fréquence respiratoire chez les souris CBA au-delà de 4 semaines. Pour les souris C57Bl, l'augmentation de la fréquence respiratoire est retardée par rapport aux souris CBA sans changement de la fonction pulmonaire jusqu'à 28 semaines suivant l'irradiation (Down et al., 1986). Par ailleurs, Eldh *et al.* irradient des souris C57BL/6J et montrent qu'une dose de 12,5 Gy induit une pneumopathie radique mais qu'une irradiation de 22,5 Gy est nécessaire pour l'induction d'une fibrose pulmonaire après 7 mois (Eldh et al., 2012).

Enfin, l'irradiation stéréotaxique à l'aide de plateformes d'irradiation dédié au petit animal comme le SARRP (*Small Animal Radiation Research Platform*) permet d'irradier des tout petits volumes semblables aux traitements réalisés par stéréotaxie retrouvés en clinique (Figure 50). Cette technique a été utilisée au cours de plusieurs thèses menées au laboratoire qui s'intéressent à caractériser les lésions pulmonaires radio-induites après une irradiation stéréotaxique (Bertho et al.; Soysouvanh et al.; Lavigne et al., 2017). Toutes ces méthodes d'irradiation rendent possible les irradiations fractionnées.

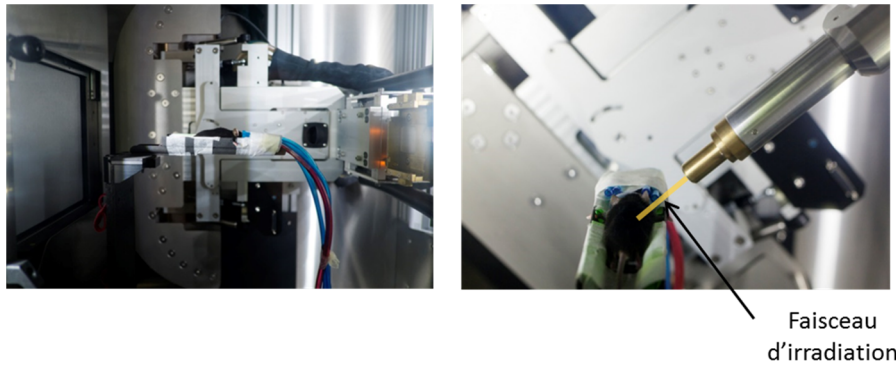


Figure 50 : Photos de l'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris C57BL/6J à l'aide du SARRP

Photos d'irradiations réalisées au SARRP à l'IRSN.

Au cours de la thèse, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'irradiation en thorax entier sur des souris C57BL/6J. En effet, dans le but d'utiliser des rayonnements proches de ceux utilisés en clinique, nous avons décidé d'utiliser des rayonnements de haute énergie (MV) délivrés par le LINAC contrairement au SARRP (kV). Le LINAC de l'IRSN n'est pas associé à un scanner et un système de planification de plan de traitement. Ainsi, il ne permet pas un guidage par l'imagerie 3D pour le repositionnement des animaux. De plus, le LINAC ne possède pas de collimateur permettant de réaliser des irradiations très localisées. De nos jours, l'irradiation en thorax entier a été utilisée dans plusieurs études et les lésions radiques sont connues et largement décrites (Franko et al., 1991; Chiang et al., 2005). En effet, il existe un recul plus important au niveau des études réalisées avec ce modèle d'irradiation comparé à l'irradiation stéréotaxique sur le petit animal. Par ailleurs, la lésion radique se développe sur un temps long mais reste raisonnable pour un projet de thèse.

Problématique & Objectifs

Les rayonnements ionisants sont utilisés de façon courante en clinique pour le diagnostic ou le traitement de nombreuses pathologies. La prédiction du risque associé à l'utilisation des rayonnements ionisants dans le domaine médical est donc essentielle pour la radioprotection des patients mais aussi des professionnels de santé. Au cours des dernières décennies, les techniques de radiothérapie ont connu des avancées majeures avec pour but une meilleure administration de la dose à la tumeur par des techniques de plus en plus complexes et de haute précision. De plus, l'évolution des appareils permet de délivrer des rayonnements à de plus fortes énergies ainsi qu'à des débits de dose plus élevés (pouvant aller jusqu'à 20 Gy/min). Des progrès technologiques concernent également les modalités de délivrance de la dose prenant ainsi en compte les variations anatomiques du patient au cours de l'irradiation et du traitement. Parallèlement à l'amélioration de la balistique, les évolutions techniques s'accompagnent d'une modification dans le fractionnement de la dose allant vers une diminution du nombre de séances pour le patient (hypofractionnement). Cependant, les connaissances des effets biologiques liées aux nouvelles pratiques en clinique restent à ce jour très limitées.

A ce jour, les évaluations de risque en radioprotection reposent sur des mesures d'Efficacité Biologique Relative (EBR). L'extrapolation de ces mesures permet de prédire un risque de complications suite à un traitement par radiothérapie. Elles sont principalement basées sur le test de survie clonogénique qui permet de déterminer le retour en prolifération des cellules et donc indirectement de mesurer la survie cellulaire. Selon plusieurs études, la mort radio-induite n'est pas la seule responsable des lésions tissulaires et ce test ne pourrait suffire à lui seul pour prédire le devenir de tissus sains exposés aux rayonnements. En effet, différents mécanismes ont été mis en évidence dans le développement des lésions radio-induites allant d'une nécrose tissulaire à l'installation d'une inflammation chronique ou une perte de fonction de l'organe. Les complications suite à une radiothérapie étant multiples, l'unique prise en compte d'un retour en prolifération cellulaire semble insuffisante pour une réelle prédiction du risque.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer des mesures d'EBR multiparamétriques permettant de prédire de manière plus réaliste les effets biologiques liés aux nouvelles pratiques de radiothérapie utilisées en clinique.

Dans un premier axe, l'impact d'une variation du débit de dose en lien avec les nouveaux appareils de radiothérapie sur les effets biologiques, à la fois *in vitro* (HUVECs et HMVEC-L) et *in vivo* (irradiation de l'anse intestinale extériorisée chez des souris C57BL/6), sont étudiés. Un deuxième axe de cette thèse permet quant à lui de s'intéresser à l'impact des protocoles de fractionnement sur la réponse biologique à la fois *in vitro* (HUVECs) et *in vivo* (irradiations en

thorax entier de souris C57BL/6). Nous nous intéressons également à l'impact du débit de dose suite à une irradiation avec différents protocoles de fractionnement *in vitro* (HUVECs).

Résultats

Axe 1 : Impact du débit de dose sur la réponse biologique

Article 1: Variation of 4 MV X-rays dose rate strongly impacts biological response both *in vitro* and *in vivo*.

Une partie des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse a été soumise pour publication au mois de novembre 2019 dans la revue Scientific Reports (article en 1^{er} auteur). Le manuscrit de l'article suit cette courte introduction et présente les résultats de l'étude.

Objectifs :

Les mesures d'Efficacité Biologique Relative (EBR) permettent de prédire les effets biologiques d'un rayonnement d'intérêt par rapport à un rayonnement de référence. Elles sont principalement basées sur le test de survie clonogénique qui, selon plusieurs études, ne peut suffire à lui seul pour prédire le devenir de tissus sains exposés aux rayonnements. Les techniques de radiothérapie les plus récentes utilisent des débits de dose de plus en plus élevés sans que les effets radio-biologiques soient bien connus. Il apparaît donc nécessaire de développer des mesures d'EBR multiparamétriques permettant de mieux prédire les effets biologiques des protocoles de radiothérapie émergents.

Résultats :

Des irradiations *in vitro* montrent un impact du débit de dose sur la morphologie des HUVECs. La survie clonogénique ($EBR \approx 0,8$) et la viabilité cellulaire ($EBR < 1$) sont supérieures au débit de dose le plus faible. De plus, l'activité β -galactosidase (reflet de la sénescence radio-induite) est inférieure ($EBR = 0,5$) au plus faible débit de dose. La proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et l'expression de 44 gènes impliqués dans les processus de sénescence sont également impactées par le débit de dose. Des irradiations *in vivo* en dose unique sur des souris au niveau de l'anse intestinale extériorisée (19 Gy) montrent une perte de poids significativement plus importante suite à une irradiation au plus fort débit de dose. De plus, 7 jours après l'irradiation et la chirurgie, l'épithélium apparaît plus endommagé au plus fort débit de dose. En effet, la caténine p120, qui est un marqueur de l'homéostasie intestinale chez la souris, est moins présente suite à une irradiation au plus fort débit de dose. La quantité de cellules cuboïdes, reflétant le dommage épithélial, est quant à elle identique quel que soit le débit de dose utilisé au moment de l'irradiation. Aucune différence n'est mise en évidence 6 semaines après l'irradiation.

Conclusion :

Les modèles radiobiologiques classiques basés sur la survie clonogénique de cellules tumorales ou de fibroblastes définissent une EBR à 1 en irradiation photon quel que soit le débit de dose utilisé. Cependant, nos données *in vitro* sur des HUVECs montrent un effet plus délétère au débit de dose le plus élevé. De plus, le débit de dose a un impact sur l'intégrité de la barrière épithéliale et le poids des animaux après l'irradiation.

Variation of 4 MV X-ray dose rate strongly impacts biological response both *in vitro* and *in vivo*

M Ben Kacem^a, MA Benadjaoud^b, M Dos Santos^c, F Soysouvanh^a, V Buard^a, G Tarlet^a, B Le Guen^d, A François^a, O Guipaud^a and F Milliat^a and V Paget^{a,*}

^a*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of MEDical Radiobiology (LRMed), Fontenay-aux-Roses, 92260, France*

^b*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Fontenay-aux-Roses, France*

^c*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental exposures (LRAcc), Fontenay-aux-Roses, France*

^d *Electricité de France, Cap Ampère, Saint-Denis, France*

*Corresponding author contact: IRSN/PSE-SANTE/SERAMED/LRMed
31, avenue de la Division Leclerc
Building 05, Floor 01, Room C110
92260 Fontenay-aux-Roses
E-mail: vincent.paget@irsn.fr
Phone: +33 (0) 1 58.35.93.28

Statistical analysis author contact: IRSN/PSE-SANTE/SERAMED
31, avenue de la Division Leclerc
Building 05, Floor 01, Room A119B
92260 Fontenay-aux-Roses
E-mail: mohamedamine.benadjaoud@irsn.fr
Phone: +33 (0) 1 58.35.75.51

ABSTRACT

Based on classic clonogenic assay, it is accepted by the scientific community that, whatever the energy or the dose rate, the relative biological effectiveness of X-rays is equal to 1. However, although X-ray beams are widely used in diagnosis, interventional medicine and radiotherapy, comparisons of their dose rates are scarce. We therefore assessed *in vitro* the effects of high-energy X-rays at two dose rates (0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹) using normal endothelial cells (HUVECs) by using clonogenic assay, measuring viability/mortality, studying the cell cycle and cellular senescence by flow cytometry and by performing gene analysis on custom arrays. In order to consolidate these data, we performed localized irradiation of exteriorized small intestine at 0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹. Interestingly, *in vivo* validation has shown a significantly higher loss of weight at the higher dose when irradiating to 19 Gy a small fragment of exteriorized small intestine of C57Bl6J mice. Nevertheless, no significant differences were observed in lesioned scores between the two dose rates, while bordering epithelium staining indicated twofold greater severe damage at 2.5 Gy.min⁻¹ compared to 0.63 Gy.min⁻¹ at one week post-irradiation. Taken together, these experiments systematically show more adverse effects of high energy X-rays at 2.5 Gy.min⁻¹, while the relative biological effectiveness of photons is around 1, whatever the quality of the X-ray beam. These results strongly suggest that multiparametric analysis should be considered in support of clonogenic assay.

INTRODUCTION

Relative biological effectiveness (RBE) is the ratio of the dose of one kind of ionizing radiation relative to another to produce the same biological effect. Several studies have focused on dose rate effects, but they were mainly performed at low dose rates and by using ^{137}Cs [1, 2] or ^{60}Co [3, 4] sources. A few studies have directly compared the *in vitro* effects of different dose rates of X-rays on cancer cells, but not on normal human cells [5-9]. Moreover, there is a consensus that the RBE of X-rays (photons; energy from 0.1 to 3 MeV) is equal to 1, whatever the energy or dose rate of the beam [10]. Nevertheless, modern radiotherapy uses medical devices able to deliver doses up to $20\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, assuming that the RBE of the X-ray beam remains equal to 1 whatever the energy and/or dose rate.

To verify this, and build a proof of concept both *in vitro* and *in vivo*, we set as our reference a beam of high energy X-rays (4 MV) at $0.63\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ on a Linear Accelerator (LINAC) Elekta Synergy Platform. Our beam of interest was set at $2.5\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ (4-fold), in order to stay at strictly the same energy (4 MV), and at the same time, to be close to beams classically used in conventional radiotherapy (dose rate around $2\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$).

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were irradiated *in vitro* in clonal conditions (clonogenic assay) and at confluence for all other assays (viability/mortality, cell cycle, senescence and gene analysis on custom arrays). The overall results clearly indicate that the higher dose rate ($2.5\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) of high energy X-rays significantly induced more adverse effects in HUVECs than a 4-fold lower dose rate ($0.63\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$). Furthermore, *in vivo* experiments also showed that an increase in dose rate induced a significantly greater loss of weight when irradiating at 19 Gy a small fragment of exteriorized small intestine of C57Bl6J mice. Moreover, bordering epithelium staining of the lesion showed that severe injury was significantly greater at $2.5\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ than at $0.63\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. Our findings clearly show that the RBE of X-rays (energy from 0.1 to 3 MeV) is not equal to 1 when changing the dose rate, both *in vitro* and *in vivo*.

RESULTS

Clonogenic assay and cell viability

Cell survival curves show a classic dose-dependent decrease of the survival fraction for both irradiations (Fig. 1.A). Furthermore, the statistical analysis method used shows a significant difference between the two kinds of irradiation throughout the 1 to 4 Gy dose range, and RBE values were statistically significantly different from 1 between the two dose rates for $SF \leq 0.55$ (Supplementary Table S1). These results were corroborated by cell viability counting using the trypan blue method (Fig. 1.B), showing higher cell viability after irradiation at $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ compared to $2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. A statistical representation of $(0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1})/(2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1})$ cell viability ratios and associated statistical results is shown in Fig. 1.C, showing that, whatever the time or dose, cell viability was significantly higher at $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ compared to $2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ irradiation, excepted for a time/dose range visualized by a “white hole” on the surface where no significant difference was found.

Cell cycle

Modeling of cell cycle proportions (G1, S and G2) according to the dose and time were modeled for each dose rate (Fig. 2.A). Then, when considering the cell cycle ratio $[0.63/2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}]$ (Fig. 2.B) for each phase (G1 (left), S (middle) and G2 (right)), statistically significant differences are represented by colored surfaces, the color indicating the corresponding value of the ratio (Fig. 2.B). This approach allowed us to determine ranges of doses and/or scale of time, where dose rate significantly impacts the cell cycle.

Senescence

Using the $C_{12}\text{FDG}$ fluorescent substrate and flow cytometry assays, our experiments demonstrate that the number of senescent cells and the size of the cells increase with dose for both dose rates (Fig. 3.A and B and Supplementary Fig. S2). Nevertheless, our results systematically show, for each dose from 2.2 to 20 Gy, a significant difference between 0.63 and $2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ irradiations at 4 MV (Fig. 3.B, right panel).

Senescence-associated gene expression clustering

An example of gene expression unsupervised hierarchic clustering was established based on data obtained from RT-qPCR gene expression measurements of 44 senescence-associated genes using a customized Taqman Low-Density Assay (TLDA) (Supplementary Fig. S4). For each end-point (Day 3, 7 and 21), clusters were defined by tendencies of delta fold change

according to the dose. At day 3 post-irradiation, five clusters of expression were obtained considering the 13 statistically differentially expressed genes according to the dose rate (Fig. 4.A). At day 7 post-irradiation, 27 genes were significantly differentially expressed (Fig. 4.B). At day 21 post-irradiation, significant differentially expressions according to the dose rate were found for 31 genes hosted on 5 different clusters (Fig. 4.C).

***In vivo* weight follow-up**

Weight follow-up from T₀ to 6 weeks after irradiation shows a greater loss of weight for the 2.5 Gy.min⁻¹ irradiation compared to the 0.63 Gy.min⁻¹ (Fig. 5). Moreover, while statistically significant loss of weight was found from 0.5 to 6 weeks after irradiation for the 2.5 Gy.min⁻¹ (Fig. 5.B, left panel), the loss of weight was only statistically significant from 0.5 to 3 weeks for the 0.63 Gy.min⁻¹ irradiation compared to the control mice (Fig. 5.B, middle panel). Finally, when comparing results for both dose rates (0.63 versus 2.5 Gy.min⁻¹), statistically significantly greater weight was found for the lowest dose rate from 0.5 to 6 weeks post-irradiation (Fig. 5.B, right panel).

***In vivo* radiation injury scoring**

Lesion scoring was performed according to [11] on sections stained with HES (Fig. 6.A.), taking into account 8 parameters included in the Radiation Injury Score (RIS). Samples showing intestinal adherences were removed from the group to avoid misinterpretation of the data. Using this scoring, we found no statistically significant difference in the injury score between the two dose rates for the two end-points (1 and 6 weeks post-irradiation) (Fig. 6.B.). We investigated more precisely mucosal damage by measuring the percentage of total lesions affecting healthy bordering epithelium (well-oriented/elongated columnar cells with basal nucleus) (Fig. 6.C, left panel, zoom in control condition) and those indicating atypical epithelium (cuboidal epithelial cells with centered nucleus) (Fig. 6.C, right panels, zoom in both irradiated conditions). Using these parameters, irradiation at 2.5 Gy.min⁻¹ induced a significantly higher percentage of severe damage to the bordering epithelium compared to 0.63 Gy.min⁻¹ (Fig. 6.D, upper panel) at 1 week post-irradiation. On the other hand, no statistically significant difference (even very close to a $p < 0.05$) was observed between the two beams concerning the percentage of cuboidal epithelium (Fig. 6 D., bottom panel).

DISCUSSION

Our study focused *in vitro* on cellular outcome up to 21 days after 4 MV X-ray irradiation, using two dose rates (0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹), and covering a wide range of doses (0, 2, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy). HUVECs were chosen as a biological model due to their capability to form clones in dishes [12] and because vascular injury is among the most common effects of radiotherapy of normal tissues and tumors [13, 14]. Furthermore, radiotherapy is known to induce vascular permeability, characterized by an increase of albumin leakage after single-dose irradiation from 2 to 30 Gy or more, thus fully justifying the biological relevance of our range of doses [15, 16]. Finally, this study uses human primary cells, while the literature data concerns several human cancer cells [6, 17-20], Chinese hamster cells [6, 18, 19, 21] and rat cells [17].

Our statistical analysis of the clonogenic assay, which is considered as the gold standard in assessment of RBE [22, 23], shows that the two modalities of irradiation have an RBE (0.63/2.5) significantly different from 1 for an SF \leq 0.55 and that peaks at 1.29 (Fig. 1.A and Supplementary Table S1). In order to validate these findings, we extended the work to other biological output measurements by cell viability counting as a function of dose and time. We calculated a relative dose effect showing significantly greater cell death at the higher dose rate, thus corroborating our results in clonal conditions. As several published studies focused on dose rate effects are essentially based on the clonogenic assay [6, 20, 21] or DNA damage [1-4], we decided to investigate further the phenotype of surviving cells in both conditions. Thus, we evaluated and modeled the impact of the dose rate on the cell cycle between the two beams, ensuring beforehand that HUVECs were at around 70-80 % in G1 phase (Supplementary Fig. S2) before irradiation, as it is well known that cell cycle phase can strongly affect the results after irradiation [24]. Furthermore, previous studies on cancer cell lines found no significant differences in cell cycle phases when dose rate was changed [18]. Interestingly, statistical analysis of our results on human normal endothelial cells revealed significant differences between the two dose rates, such as fewer cells in phase S at 0.63 Gy.min⁻¹ compared to 2.5 Gy.min⁻¹. As the ratio of this proportion is below 1, this could indicate i) more proliferation at 2.5 Gy.min⁻¹ than at 0.63 Gy.min⁻¹, or ii) the opposite, cell cycle blockage in S phase significantly higher at 2.5 Gy.min⁻¹ than at 0.63 Gy.min⁻¹ (Fig. 2). In point of fact, radiation-induced senescence is now well described and is characterized by increases in cell size and β -galactosidase activity [25]. Interestingly, senescent cells are blocked in the cell cycle [26], but remain metabolically active. Furthermore, once engaged in the senescence process, cells fail to initiate DNA replication [26, 27]. To verify radiation-induced senescence *in vitro* in HUVECs, we performed staining with C₁₂FDG instead of the widely used biomarker X-GAL [28, 29].

C₁₂FDG was chosen so as to use flow cytometry, which is very sensitive for a very large number of events depicting a representative response of the whole cell monolayer [28]. As reported by Debacq-Chainiaux et al. [28], we also used bafilomycin A1 pre-treatment in our experiments, so as to be more specific to β -galactosidase activity linked with stress-induced senescence. Interestingly, we found significantly more senescent cells at 2.5 Gy.min⁻¹ compared to 0.63 Gy.min⁻¹ for doses above 2.2 Gy (Fig. 3), thus corroborating the significantly higher proportion of cells in S phase at 2.5 Gy.min⁻¹ compared to 0.63 Gy.min⁻¹. The differential profile of radiation-induced senescence in connection with the dose rate was also confirmed by custom TLDA of 44 genes reported to be involved in the senescence process and the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [25, 26, 30]. Basic analysis by gene clustering (“heat map”) a dose rate effect for the 10 and 20 Gy conditions at day 21 post-irradiation (Supplementary Fig. S4). When analyzing gene deregulation in more detail, our statistical analysis sorted 13, 27 and 31 genes statistically differentially expressed according to the dose rate, at days 3, 7 and 21 post-irradiation, respectively (Fig. 4.A, B. and C., respectively). From a general standpoint, this increase of deregulated genes over time clearly indicates a dose rate effect. Moreover, if we focus more precisely on key genes of the SASP, such as IL8 and MMP10, we show that their fold changes were statistically significantly greater at day 7 for the dose rate at 2.5 Gy.min⁻¹ compared to 0.63 Gy.min⁻¹ (Fig. 4.B), thus fully corroborating the higher level of senescent cells detected by flow cytometry when increasing the dose rate.

Finally, in order to verify our *in vitro* data, we performed *in vivo* experiments. To do so, we focused on a mouse model of radiation-induced enteropathy [31, 32]. Weight loss of animals following irradiation is an important parameter in evaluating the severity of radiation-induced damage [33-36]. Modeling of weight measurements established a significant difference between the two dose rates from 0.5 to 6 weeks after irradiation, this loss of weight being systematically greater for the higher dose rate. Unfortunately, injury score [11] measured on histological tissue sections did not show significant differences between the two dose rates, at 1 or 6 weeks after irradiation. Nevertheless, as this injury score integrates several parameters [37, 38], p120 catenin staining was performed to further investigate and characterize the lesion as previously done in our laboratory [38]. Interestingly, we found, one week post-irradiation, that severe damage on the bordering epithelium at 2.5 Gy.min⁻¹ (Fig. 6) was twice that at 0.63 Gy.min⁻¹. At the same time, one week post-irradiation corresponds to the climax of the decrease for 0.63 Gy.min⁻¹, this climax being reached 2 weeks post-irradiation for 2.5 Gy.min⁻¹ and marked by a significantly greater loss of weight compared to 0.63 Gy.min⁻¹ (Fig. 5). All together, these two criteria (weight and bordering epithelium) fully corroborate and validate *in*

vivo that an increase in dose rate induces more deleterious effects when using a mouse model of radiation-induced enteropathy.

Modern radiotherapy can use modifications of the energy electron beam, such as flattening filter free (FFF) to raise dose rates to around 20-24 Gy.min⁻¹. Even though *in vitro* studies have reported a comparable cell survival between high dose rate FFF and conventional dose rate irradiation [8, 21], some authors have reported differences between FFF mode and a standard flattening beam, suggesting that the dose per pulse might be a crucial factor influencing cell survival [20]. Interestingly, we have recently demonstrated *in vitro* by using multiparametric radiological assays that a variation of X-ray energy strongly impacts RBE [39]. The present study shows, both *in vitro* on human normal cells and *in vivo* in mice, that the proof of concept that the RBE of high-energy X-rays depends on the dose rate of the beam. This clearly raises the question as to whether or not, in radiotherapy, the biological effects of X-rays for normal tissues and/or tumors are the same, whatever the energy and/or the dose rate of the beam, especially when increasing the dose rate. Such an approach could also be useful in comparing the RBE with dose rate modifications (in connection or not with energy modification), as conventional radiobiological models also set the RBE at 1. Finally, the multiparametric assays performed in our study provide an answer in the comparison of two beams in the case of high doses (i.e. doses for which a clonogenic assay cannot be performed).

METHODS AND MATERIALS

Irradiation on LINAC

Irradiation with high-energy X-rays was performed using an Elekta Synergy Platform (Elekta S.A.S. France, Boulogne, France) delivering 4 MV X-rays. Irradiations were performed under similar conditions: plate, cell culture medium for both dose rates (0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹) in air kerma free in air. The uncertainty in the dose rate measurement was about 7% for LINAC irradiations at $k = 2$.

Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, C2519A) from Lonza were cultured in EGM-2 MV culture medium (Lonza) according to the manufacturer's instructions and placed in an incubator at 37°C with 5% CO₂ and 95% humidity. For all the experiments, HUVECs at passage 2 were seeded at 3x10³ cells/cm² and routinely cultured for 5 days to reach confluent monolayers. HUVECs were then detached and seeded (3x10³ cells/cm², passage 3), and cultured for 5 days to reach confluent monolayers for all experiments (excluding the clonogenic assay where specific conditions are detailed in the corresponding section).

Clonogenic Assay

Cells were irradiated on LINAC (0 (control), 0.5, 1, 2, 3 and 4 Gy) by following a protocol already described in the literature [12, 39].

Viability/Mortality (trypan blue)

At each end-point, supernatant was collected, and cells were trypsinized and added to the respective supernatant. Each sample was centrifuged for 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS. Cells were manually counted under the microscope by using trypan blue (145-0013, Bio-Rad Laboratories S.A.) and 10-chambered slides with a hemocytometer-type grid (87144, KOVA™ Glasstic™ Slide 10 with Grids).

Cell cycle analysis

Cells were irradiated at 2, 4, 5, 6, 10 or 20 Gy or not irradiated (control). At T₀, day 3, day 7 and day 21, cells were trypsinized. Each sample was centrifuged for 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS + /+. The resuspended cells were then fixed via the dropwise addition of 3 mL of 70% ethanol and the tubes were placed at - 20°C at least

overnight. At the end of the complete cycle, all samples were centrifuged to eliminate ethanol. Each pellet was rinsed twice with 5 mL of [PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) + 5% of FBS]. Then the pellets were resuspended with 500 µL/tube of a mix containing [PBS (+MgCl₂ +CaCl₂) + 5% of FBS + propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, ref P4170) (at 25 µg/mL final) + RNase A (50 µg/mL final)]. Finally, the tubes were placed at 4°C overnight to stain the DNA. The next day, acquisition of the data was performed on a BD FACS CantoII using Diva. The first analysis was done using size/granulometry parameters. This first step allowed us to determine the gate (gate 1) where cells were recorded. Upon these gated events, the PI (Sigma Aldrich) signal was collected on the PE channel (Filter 585/42 nm) after air-cooled 488 nm solid state laser excitation (20 mW). As second analysis step the PE signal was plotted as PE-W versus PE-A in a dot plot graph, to discriminate doublets (eg, a G1 doublet from a G2/M single) or cellular aggregates [40] and to record at least 5x10⁴ single events per replica (gate 2) upon which cell cycle analysis was performed using “Cell Cycle Tool” available on FlowJo 7.6.5 software.

Senescence (C₁₂FDG)

Cells were irradiated at 2, 4, 5, 6, 10 or 20 Gy or not irradiated (control). Seven days after irradiation, senescence experiments were performed by following Debacq-Chainiaux et al. (15) using 1-hour pre-treatment with bafilomycin A1 (100 nM final), followed by addition of C₁₂FDG (33 µM final) for 2 hours. Supernatant was removed, monolayers were rinsed twice with PBS 1X (without Ca²⁺ and Mg²⁺), cells were trypsinized and centrifuged for 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS before acquisition on a FACS Canto II. To increase the robustness of the results, a cell viability reporter was added to each sample: To-Pro-3 (35) before the acquisition of the data on a FACS Canto II (3-laser, 4-2-2 configuration) using FACS Diva software, 3 independent experiments were performed for each condition. Data analysis was performed post-acquisition using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC). A first analysis was done on size (FSC: forward scatter)/granulometry (SSC: side scatter) parameters, to collect cells (gate G1) and to remove fragmented cells and debris. Triton 0.06X final was instantly used as positive control (Supplementary Fig. S2.A) to ensure good detection of dead cells. This first step allowed us to assess cell viability (on the APC channel (filters λ_{em}: 660/20 nm) after 633 nm HeNe solid state (17 mW output) laser excitation) and to determine the gate (G2) where at least 5 x 10⁴ living cells per replica were recorded (Supplementary Fig. S2.A, right panel). Then, upon this gated event (G2) the C₁₂FDG signal was collected on the FITC channel (filters λ_{em}: 530/30 nm) after air-cooled 488 nm solid state (20 mW output) laser excitation. DMSO (vector of C₁₂FDG) was used as negative control to

ensure good detection of C₁₂FDG in controls (Supplementary Fig. S2.B), but also for irradiated conditions (Supplementary Fig. S2.D). Strictly the same acquisition parameters were applied to each condition containing C₁₂FDG (Supplementary Fig. S2.C, E and F for control, 2 Gy and 10 Gy, respectively) and bi-parametric analysis of cell size (FSC)/C₁₂FDG (FITC) was performed (Supplementary Fig. S2.G).

RT-qPCR (custom TLDA)

Seven, 14 or 21 days after irradiation (at 0, 2, 4, 5, 6, 10 or 20 Gy), HUVECs were harvested with 600 µL per sample of mirVana miRNA Isolation Kit lysis buffer (ThermoFisher Scientific, AM1560). Total RNA was quantified on a ND-100 NanoDrop and samples were stored at -80°C. Total RNA was diluted to 50 ng/µL (final concentration) and 500 ng was used to perform RT-PCR. cDNAs were loaded on customized TLDA. The PCR protocol was as follows: a preparation step (50°C for two minutes followed by 10 min at 94.5°C), then 40 cycles including denaturation (97°C, 3 min), hybridization of primers and elongation (60°C, 1 min). The Taqman Low Density Assay (TLDA) list of genes was previously described in the literature [39]. Analysis of data was performed using ExpressionSuite software (ThermoFisher Scientific), while representation and statistical analysis of the data were performed using DataAssist software (ThermoFisher Scientific).

***In vivo* experiments**

Animal experiments were performed in strict compliance with French and European guidelines and regulations on protection of animals used for scientific purposes (EC Directive 2010/63/EU and French Decree No. 2013–118). They were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the IRSN, registered under number 81 and authorized by the French Ministry of Research under the reference APAFIS#16159-2018071812598405 v2 (internal project number P18-05).

Male C57BL/6JRj mice were from Janvier Labs (Saint Berthevin, France) and were 10 weeks of age upon arrival. Animals were housed in the IRSN animal facilities authorized by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on rodents. After two weeks of acclimation, mice were anesthetized with isoflurane and, after abdominal laparotomy, a 3 cm-long intestinal segment (10 cm from the ileocecal valve) was exteriorized and exposed to a single dose of 19 Gy of high energy X-rays using the Elekta Synergy Platform (0.63 or 2.5 Gy.min⁻¹). Sham-irradiation (Sham-IR) was performed by maintaining the intestinal segment exteriorized without radiation exposure. After radiation exposure or sham-irradiation, the

exposed segment was returned to the abdominal cavity and peritoneum/abdominal muscles and skin were separately closed using with interrupted sutures.

Tissue harvesting, histology, and immunohistology

At different times after radiation exposure, tissues were removed, fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES).

Radiation Injury Score (RIS)

All the details regarding RIS variables and grades of radiation injury are widely described in the literature [37, 38].

p120 Catenin staining

p120-Catenin/F-actin co-immunostaining was performed as follows: cells were rinsed, fixed, permeabilized and primary rabbit monoclonal anti-p120 catenin antibody (Abcam, ab92514) (1/100 final) was added and incubated for 1 h at room temperature. Corresponding secondary antibody (Alexa Fluor 568-conjugated antibody, ThermoFisher Scientific, ref A11036) (1/250 final) was added for 1 h at room temperature. After rinsing, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (ThermoFisher Scientific, D1306) staining was performed for 10 min at room temperature at 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). After rinsing, slides were mounted in Vectashield mounting medium without DAPI (Eurobio/Abcys).

Statistical Analysis

Clonogenic assay

The number of scored colonies $y_i(d)$ at each dose d and plate i , was modeled as a Bernoulli trial [41]:

$$y_i(d) \sim \mathfrak{B}(N_i(d), S(d))$$

where $N_i(d)$ is the number of seeded cells and $S(d) = \text{PE} \times \exp(-\alpha d - \beta d^2)$ the “success” probability for a cell to grow into a colony. Here PE , α and β are the model parameters, with PE representing the plating efficiency, i.e. the surviving fraction of unirradiated cells.

The survival fractions after LINAC irradiations were compared through a binomial likelihood ratio test (LRT) and inferences were made using a permutation method [42].

Cell viability

Let n_{ij} designate the number of viable cells remaining t_i days after radiation exposure to d_j Gy and n_{i0} the number of viable cells in the control sample at the same time point. We modeled the log ratio $LR_{ij} = \log\left(\frac{n_{ij}}{n_{i0}}\right)$ as a bivariate function on time t_i and dose d_j through the regression:

$$LR_{ij} = \beta_{2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(t_i, d_j) + \chi_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1}} \times \beta_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1} \text{ vs } 2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(t_i, d_j) + \varepsilon_{ij}$$

where $\beta_{2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}$ and $\beta_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1} \text{ vs } 2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}$ represent two bivariate penalized B-spline functions, $\chi_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1}}$ a dummy variable indicating cell irradiation under 0.63 Gy.min^{-1} dose rates and ε_{ij} error terms.

Thus, by considering the 0.63 Gy.min^{-1} dose rate irradiation as reference, the comparison in time and dose between the viable cells for the two dose rates is driven by the function

$\beta_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1} \text{ vs } 2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}$:

$$\frac{\text{Cell Viability } 0.63 \text{ Gy.min}^{-1}}{\text{Cell Viability } 2.5 \text{ Gy.min}^{-1}} = \exp\left(\beta_{0.63 \text{ Gy.min}^{-1} \text{ vs } 2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(t, d)\right)$$

Computations for this study were carried out using MATLAB Software, version 8.2.0.701 (Mathworks R2013b) and the REFUND package of R software.

Cell cycle

The dose rate dependence of the modeling of cell cycle distribution was studied using a compositional data analysis approach. The vectors listing the proportions of cells in the G1, S and G2 phases of the cell cycle are by definition constrained, since their parts sum to one and this perfect multicollinearity renders invalid the usual statistical approaches for unconstrained variables.

Aitchison geometry [43] provides an adequate treatment of these compositional data by considering ratios of their parts. In the present study, each cycle phase distribution vector $[x_{G_1}, x_S, x_{G_2}]$ was converted into an unconstrained two-component vector $[Alr_1, Alr_2]$ through an additive log-ratio transformation (Alr)

$$Alr_1 = \log\left(\frac{x_S}{x_{G_1}}\right) \text{ and } Alr_2 = \log\left(\frac{x_{G_2}}{x_{G_1}}\right)$$

These Alr coordinates were then modeled as a bivariate process in dose and time according to their dose-rate exposure:

$$Alr_k(\delta_i, t_j) = a_k(\delta_i, t_j) + R_{ij} \times b_k(\delta_i, t_j) + \varepsilon_{ij} \quad \text{with } k=1,2$$

where a_k and b_k are smooth bivariate functions on doses δ_i ($1 \leq i \leq n$) and times t_j ($1 \leq j \leq m$). R_{ij} and ε_{ij} are dose rate indicator variables (zero for 2.5 Gy.min⁻¹ and one for 0.63 Gy.min⁻¹) and error terms, respectively.

The significant difference of the G1, S and G2 phase distributions between the two dose rates was assessed according to the presence or not of one in the pointwise confidence intervals of the ratios:

$$\frac{p_{G_1}^{0.63 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)}{p_{G_1}^{2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)}, \frac{p_S^{0.63 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)}{p_S^{2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)} \text{ and } \frac{p_{G_2}^{0.63 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)}{p_{G_2}^{2.5 \text{ Gy.min}^{-1}}(\delta_i, t_j)}$$

Where the letter p designates the fitted probability to be in a given phase cycle computed as:

$$p_{G_1}(\delta_i, t_j) = \frac{1}{1 + \exp(Alr_1(\delta_i, t_j)) + \exp(Alr_2(\delta_i, t_j))}$$

$$p_S(\delta_i, t_j) = \frac{Alr_1(\delta_i, t_j)}{1 + \exp(Alr_1(\delta_i, t_j)) + \exp(Alr_2(\delta_i, t_j))}$$

$$p_{G_2}(\delta_i, t_j) = \frac{Alr_2(\delta_i, t_j)}{1 + \exp(Alr_1(\delta_i, t_j)) + \exp(Alr_2(\delta_i, t_j))}$$

Flow cytometry data analysis

For each radiation dose, the associated 2D scatter points (formed by the forward scatter (FSC) and β -galactosidase staining intensities [FITC]) were summarized by a two-component vector consisting of log-mean intensities in each dimension.

Thus, the dose and dose-rate profile variations of this central tendency was modeled as a flexible spline function in dose:

$$\Delta C_i^{FSC \text{ or } FITC} = \alpha^{FSC \text{ or } FITC}(\delta_i) + R_i \times \beta^{FSC \text{ or } FITC}(\delta_i) + \varepsilon_i$$

Where $\Delta C_i^{FSC \text{ or } FITC}$ represents the difference between the exposed (to the dose δ_i) and the non-exposed mean intensities of FSS or FITC data, $\alpha^{FSC \text{ or } FITC}$ and $\beta^{FSC \text{ or } FITC}$ smooth spline functions, R_i a dummy variable indicating the type of dose rate (0.63 Gy.min⁻¹ or 2.5 Gy.min⁻¹) and ε is an error sampled from the zero expectation distribution.

Thus, the function $\beta^{FSC \text{ or } FITC}(\delta_i)$ summarizes the rate-dose modulation of the center of the 2D flow cytometry scatterplots.

All the smoothing spline estimations and inferences were performed using the REFUND Package of R software [44].

Gene expression

The measured HUVEC transcriptional profiles for each gene at each time point (after 3, 7 and 21 days) can be viewed as a noisy discretization of a continuous dose-dependent process, denoted by f :

$$-\Delta C_{T_i} = \alpha(\delta_i) + R_i \times \beta(\delta_i) + \varepsilon_i$$

Where $-\Delta C_{T_i}$ represents the opposite of the measured ΔC_T at the i^{th} dose δ_i ($1 \leq i \leq n$), R_i is a dummy variable indicating the type of dose rate ($0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ or $2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$), α and β are smooth functions and ε is an error sampled from the zero expectation distribution. Thus, the function $\beta(\delta)$ can be viewed as a log-fold change (LFC) of a gene expression profile between the two dose rates for a given dose $\beta(\delta)$.

These LFC profiles, reduced to their significant parts, were then clustered using a two-stage clustering method: after a dimension reduction step using functional principal component analysis (FPCA) [45, 46], clustering on the scores was done using a hierarchical complete-linkage algorithm.

Acknowledgements

The authors would like to thank Y. Ristic for his help with irradiation on the Elekta Synergy Platform. This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and is included in the IRSN program ROSIRIS. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

M.B.K., M.D.S., F.S., V.B., G.T. and V.P.: Acquisition, analyses and interpretation of data. M.A.B.: statistical analyses, help writing the manuscript. B.L.G, A.F. and O.G.: Critical review of the manuscript. V.P.: Writing the manuscript. V.P. and F.M.: Conception, design and supervising the project.

Competing Interests

The authors have read the journal's policy and have no competing interests. B.L.G. is employee at Electricité de France, Cap Ampère, Saint-Denis, France. This work was supported by

Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection). This does not alter the authors' adherence to all the Scientific Reports policies on sharing data and materials.

REFERENCES

1. Brewen, J.G. and H.E. Luippold, *Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro dose rate studies*. *Mutat Res*, 1971. **12**(3): p. 305-14.
2. Vaurijoux, A., et al., *Automatic Dicentric Scoring a Real Option to Be Used in Biological Dosimetry*. *Radiation emergency medicine*, 2015. **4**(1): p. 16-21.
3. Fabry, L., *Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by low doses of ⁶⁰Co gamma rays delivered at high and low dose rates*. *Acta Radiol Oncol*, 1986. **25**(2): p. 143-6.
4. Scott, D., et al., *Radiation-induced chromosome damage in human peripheral blood lymphocytes in vitro. II. RBE and dose-rate studies with ⁶⁰Co gamma- and X-rays*. *Mutat Res*, 1970. **9**(2): p. 225-37.
5. Brehwens, K., et al., *A new device to expose cells to changing dose rates of ionising radiation*. *Radiat Prot Dosimetry*, 2012. **148**(3): p. 366-71.
6. Lasio, G., et al., *Effect of varying dose-per-pulse and average dose rate in X-ray beam irradiation on cultured cell survival*. *Radiat Environ Biophys*, 2014. **53**(4): p. 671-6.
7. Sarojini, S., et al., *A combination of high dose rate (10X FFF/2400 MU/min/10 MV X-rays) and total low dose (0.5 Gy) induces a higher rate of apoptosis in melanoma cells in vitro and superior preservation of normal melanocytes*. *Melanoma Res*, 2015. **25**(5): p. 376-89.
8. Verbakel, W.F., et al., *Comparable cell survival between high dose rate flattening filter free and conventional dose rate irradiation*. *Acta Oncol*, 2013. **52**(3): p. 652-7.
9. Brehwens, K., et al., *Cytogenetic damage in cells exposed to ionizing radiation under conditions of a changing dose rate*. *Radiat Res*, 2010. **173**(3): p. 283-9.
10. Valentin, J., *Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (w_R):ICRP Publication 92: Approved by the Commission in January 2003*. *Ann ICRP*, 2003. **33**(4): p. 1-121.
11. Jensen, M.H., et al., *Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine*. *Acta Radiol Oncol*, 1983. **22**(4): p. 299-303.
12. Dos Santos, M., et al., *Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response*. *Int J Radiat Biol*, 2018: p. 1-29.
13. Korpela, E. and S.K. Liu, *Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage*. *Radiat Oncol*, 2014. **9**: p. 266.
14. Guipaud, O., et al., *The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy*. *Br J Radiol*, 2018: p. 20170762.
15. Krishnan, E.C., et al., *Dose-dependent radiation effect on microvasculature and repair*. *J Natl Cancer Inst*, 1987. **79**(6): p. 1321-5.
16. Park, K.R., et al., *Mast Cells Contribute to Radiation-Induced Vascular Hyperpermeability*. *Radiat Res*, 2016. **185**(2): p. 182-9.
17. Oktaria, S., et al., *In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses*. *Appl Radiat Isot*, 2017. **128**: p. 114-119.
18. Terashima, S., et al., *Impact of time interval and dose rate on cell survival following low-dose fractionated exposures*. *J Radiat Res*, 2017. **58**(6): p. 782-790.
19. Karan, T., et al., *SU-E-T-01: Applications of 6MV FFF Photon Beams in Optimizing Radiobiological Response for Respiratory-Gated Liver SBRT*. *Med Phys*, 2012. **39**(6Part9): p. 3702.
20. Lohse, I., et al., *Effect of high dose per pulse flattening filter-free beams on cancer cell survival*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 226-32.
21. Sorensen, B.S., et al., *Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 223-5.
22. Puck, T.T. and P.I. Marcus, *Action of x-rays on mammalian cells*. *J Exp Med*, 1956. **103**(5): p. 653-66.
23. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.

24. Mori, R., et al., *Estimation of the radiation-induced DNA double-strand breaks number by considering cell cycle and absorbed dose per cell nucleus*. J Radiat Res, 2018. **59**(3): p. 253-260.
25. Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria, *Hallmarks of Cellular Senescence*. Trends Cell Biol, 2018. **28**(6): p. 436-453.
26. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
27. Di Leonardo, A., et al., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2540-51.
28. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
29. Itahana, K., J. Campisi, and G.P. Dimri, *Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay*. Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 21-31.
30. Burton, D.G. and V. Krizhanovsky, *Physiological and pathological consequences of cellular senescence*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(22): p. 4373-86.
31. Abderrahmani, R., et al., *Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **74**(3): p. 942-8.
32. Abderrahmani, R., et al., *PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35740.
33. Koch, A., et al., *Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161079.
34. Nunamaker, E.A., et al., *Endpoint refinement for total body irradiation of C57BL/6 mice*. Comp Med, 2013. **63**(1): p. 22-8.
35. Vriesendorp, H.M., et al., *Survival after total body irradiation: effects of irradiation of exteriorized small intestine*. Radiother Oncol, 1992. **23**(3): p. 160-9.
36. Rannou, E., et al., *In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15738.
37. Blirando, K., et al., *Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 640-51.
38. Mintet, E., et al., *Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4933.
39. Paget, V., et al., *Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness: comparison between 220 kV and 4 MV*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14328.
40. Nunez, R., *DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry*. Curr Issues Mol Biol, 2001. **3**(3): p. 67-70.
41. Shuryak, I., Y. Sun, and A.S. Balajee, *Advantages of Binomial Likelihood Maximization for Analyzing and Modeling Cell Survival Curves*. Radiat Res, 2016. **185**(3): p. 246-56.
42. Good, P.I., *Permutation, Parametric, and Bootstrap Tests of Hypotheses*. 3 ed2005: Springer New York. 316.
43. Aitchison, J., *The Statistical Analysis of Compositional Data*. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological), 1982. **44**(2): p. 139-160.
44. Development Core Team, R., *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vol. 1. 2011.
45. Ramsay, J.O. and B.W. Silverman, *Functional data analysis*1997: Springer.
46. Karhunen, K., *Über lineare Methoden in der Wahrscheinlichkeitsrechnung*, 1947, [Kirjapaino oy. sana]: Helsinki.

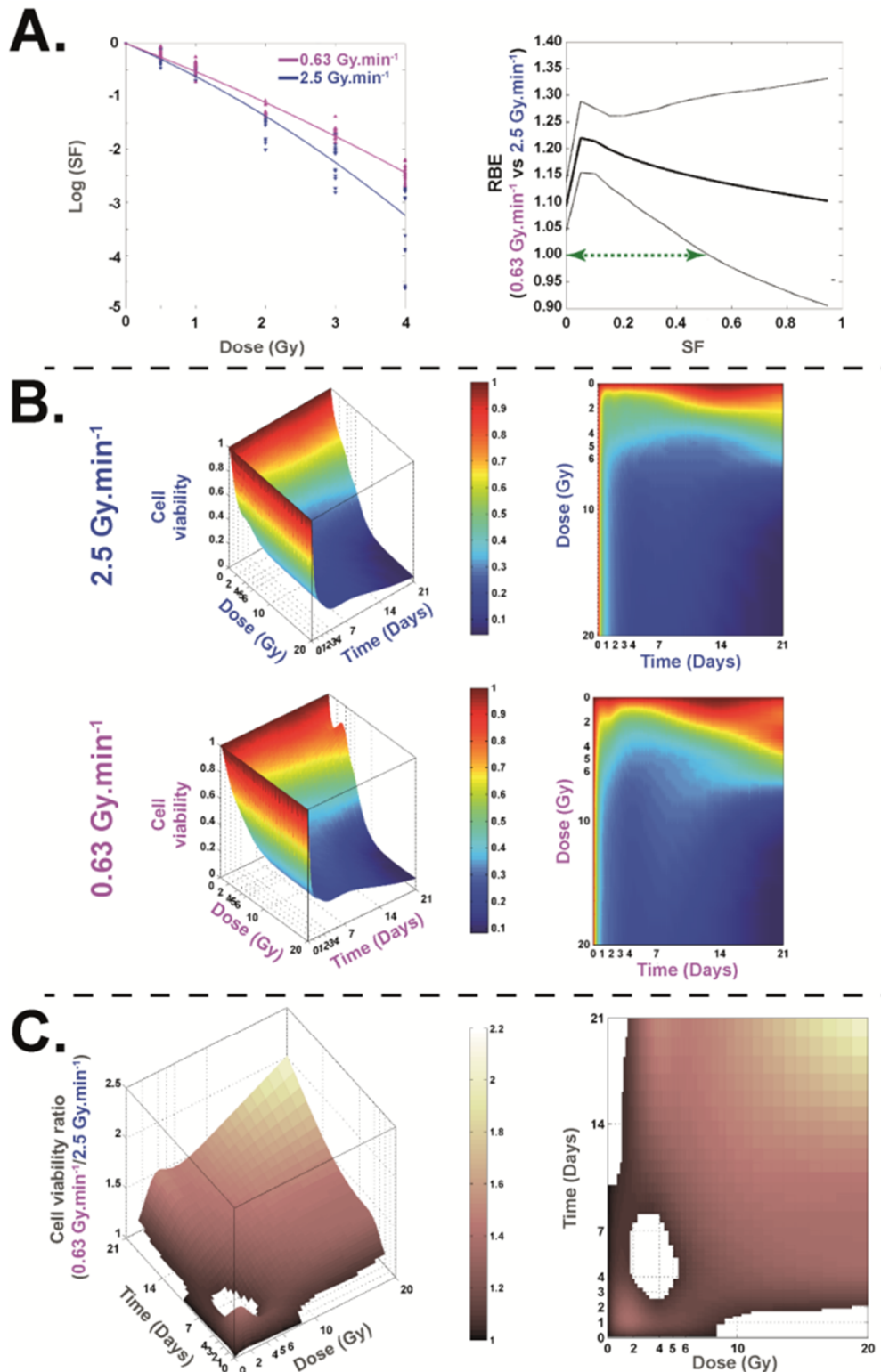
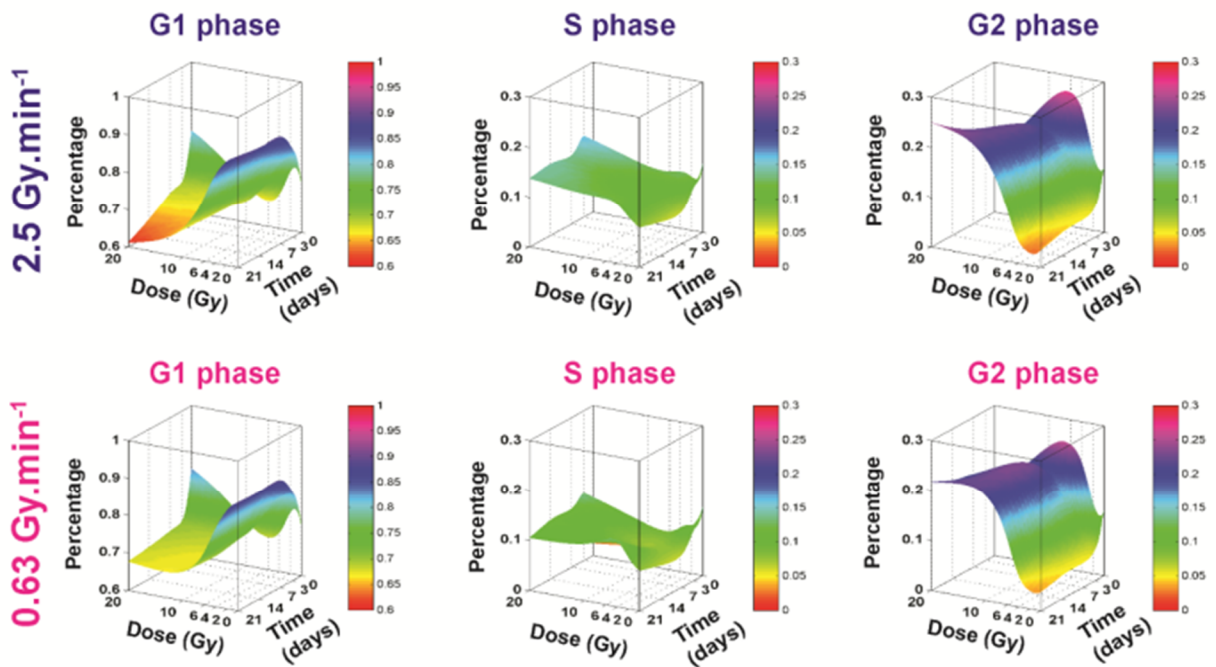


Figure 1. Clonogenic assay and cell survival at 0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹. (A) Left panel: Survival fraction (SF) of HUVECs irradiated at 0.63 Gy.min⁻¹ (pink curve) and 4 MV (blue curve). Right panel: the associated RBE curve is defined as a ratio of doses for a given SF (thick black line) and its associated bootstrap confidence intervals (two fine black lines). The green arrow represents the range of SF wherein the value of RBE is significantly different from 1. (B) Representations of 3D and 2D curves of cell survival measures with trypan blue counting method for 0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹. (C) Representations of 3D and 2D curves of cell viability ratio [0.63/2.5 Gy.min⁻¹].

A.



B.

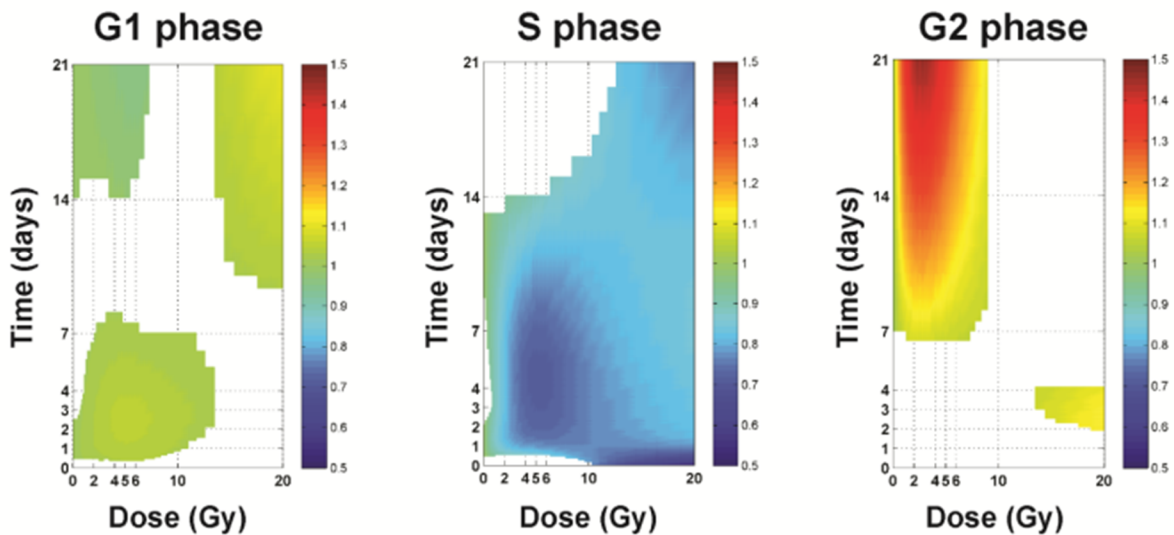


Figure 2. Cell cycle proportions at 0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹. (A) Modeling of cell cycle proportions (G1, S and G2) according to the dose and time (surfaces represent the mean of at least three independent experiments). (B) Representations of 2D curves of the cell cycle ratio [0.63/2.5 Gy.min⁻¹] for the phase (G1 (left), S (middle) and G2 (right)). Colored surfaces represent statistically significant differences between the two dose rates. Colors indicate the value of the ratio.

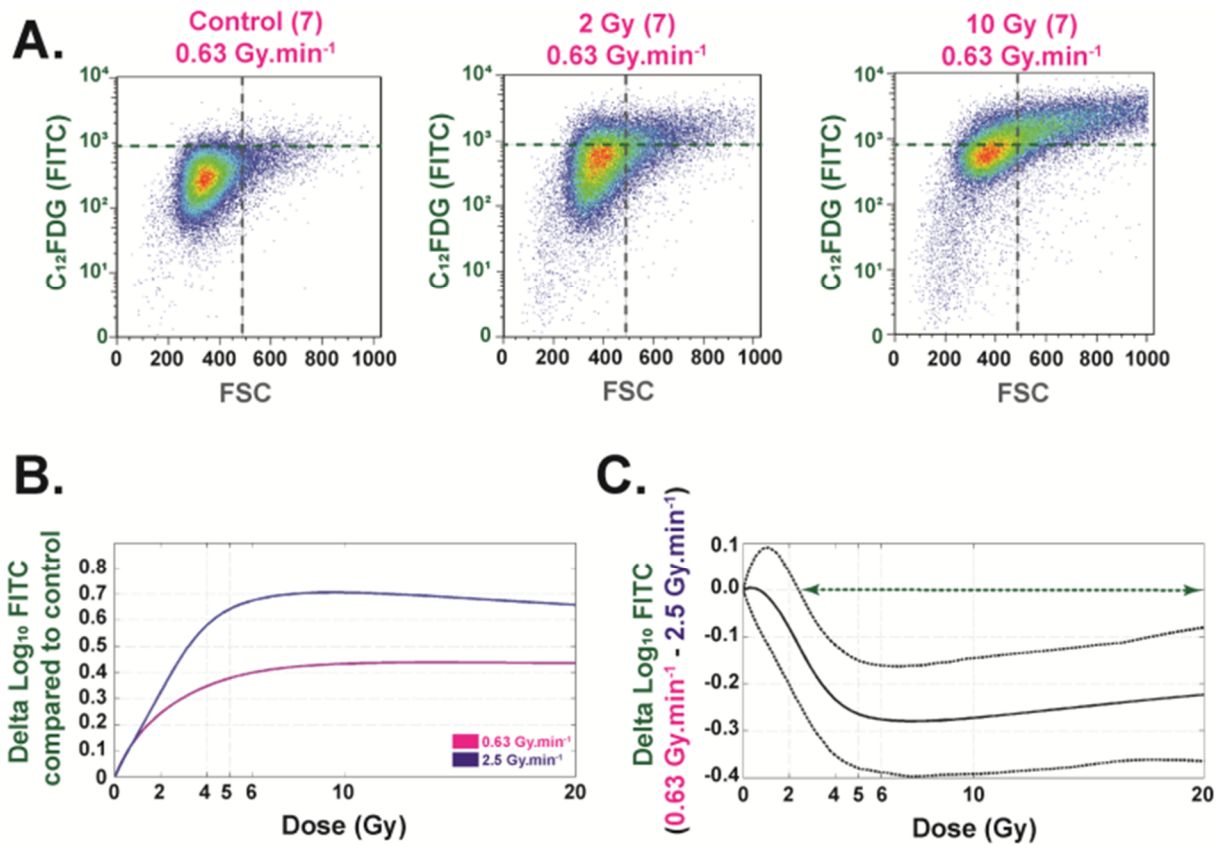


Figure 3. Senescence ($C_{12}FDG$) (Flow Cytometry) analysis . A) Example of flow cytometry measurements obtained at D7 for control, 2 and 10 Gy irradiations at 4 MV and $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. Each bi-parametric representation (Size (FSC)/ $C_{12}FDG$ (FITC)) represents one independent experiment for at least 5×10^4 living cells. (B) Each curve (purple and blue for 0.63 and $2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively) represents the delta of Log_{10} FITC compared to control conditions. Each curve represents the mean of three independent experiments based on at least 5×10^4 living cells for each experiment. (C) The curve represents the delta log_{10} FITC ($0.63\text{-}2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) as a function of the dose. The green arrow represents the range of dose where this delta is significant between the two dose rates (from 2.2 to 20 Gy).

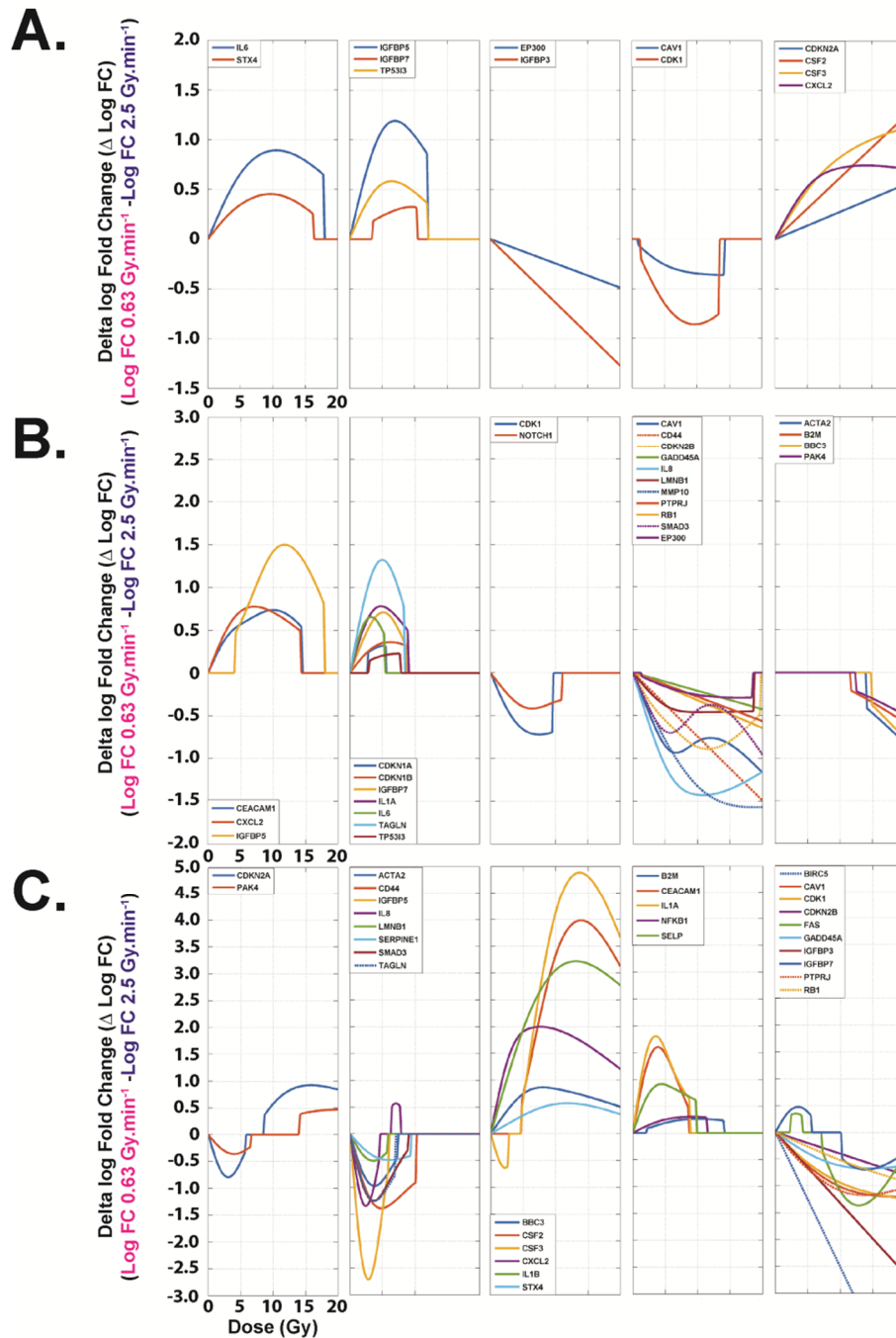


Figure 4. RT-qPCR gene expression clustering. (A) Gene clusters at D3 post-irradiation, each curve representing the delta of fold changes for one gene ($0.63 - 2.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$). Genes were grouped in five clusters according to their expression tendencies as a function of the dose. Only the significantly differentially expressed genes in the delta fold change (13 among the 44 measured) are represented. (B) Gene clusters at D7 post-irradiation. Genes were grouped in five clusters according to their expression tendencies as a function of the dose. Only the significantly differentially expressed genes in the Delta fold change (27 among the 44 measured) are represented. (C) Gene clusters at D21 post-irradiation. Genes were grouped in five clusters according to their expression tendencies as a function of the dose. Only the significantly differentially expressed genes in the delta fold change (31 among the 44 measured) are represented.

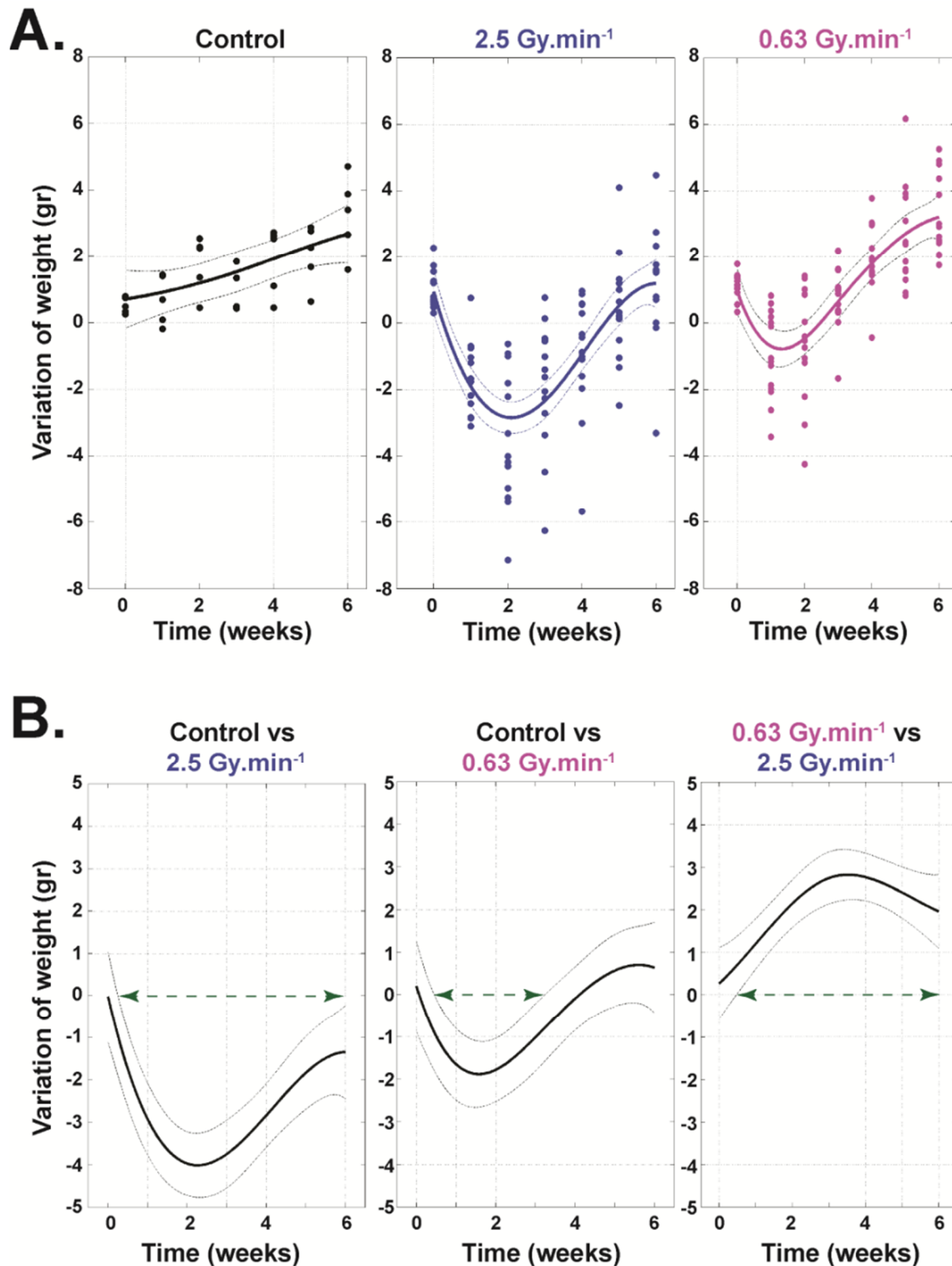


Figure 5. Weight follow-up of animals. (A) Follow-up of the animals' weights from 0 to 6 weeks after irradiation, with sham-irradiated controls (left panel, n = 5 animals), after 19 Gy irradiation at 2.5 Gy.min⁻¹ (middle panel, n = 12 animals), and after 19 Gy irradiation at 0.63 Gy.min⁻¹ (right panel, n = 12 animals). (B) Statistical representation of the loss of weight, control versus 2.5 Gy.min⁻¹ irradiation (left panel), control versus 0.63 Gy.min⁻¹ irradiation (middle panel) and 0.63 versus 2.5 Gy.min⁻¹ irradiation (right panel). For each panel, the green arrow represents the range of doses for which there is a statistically significant difference between the two considered conditions.

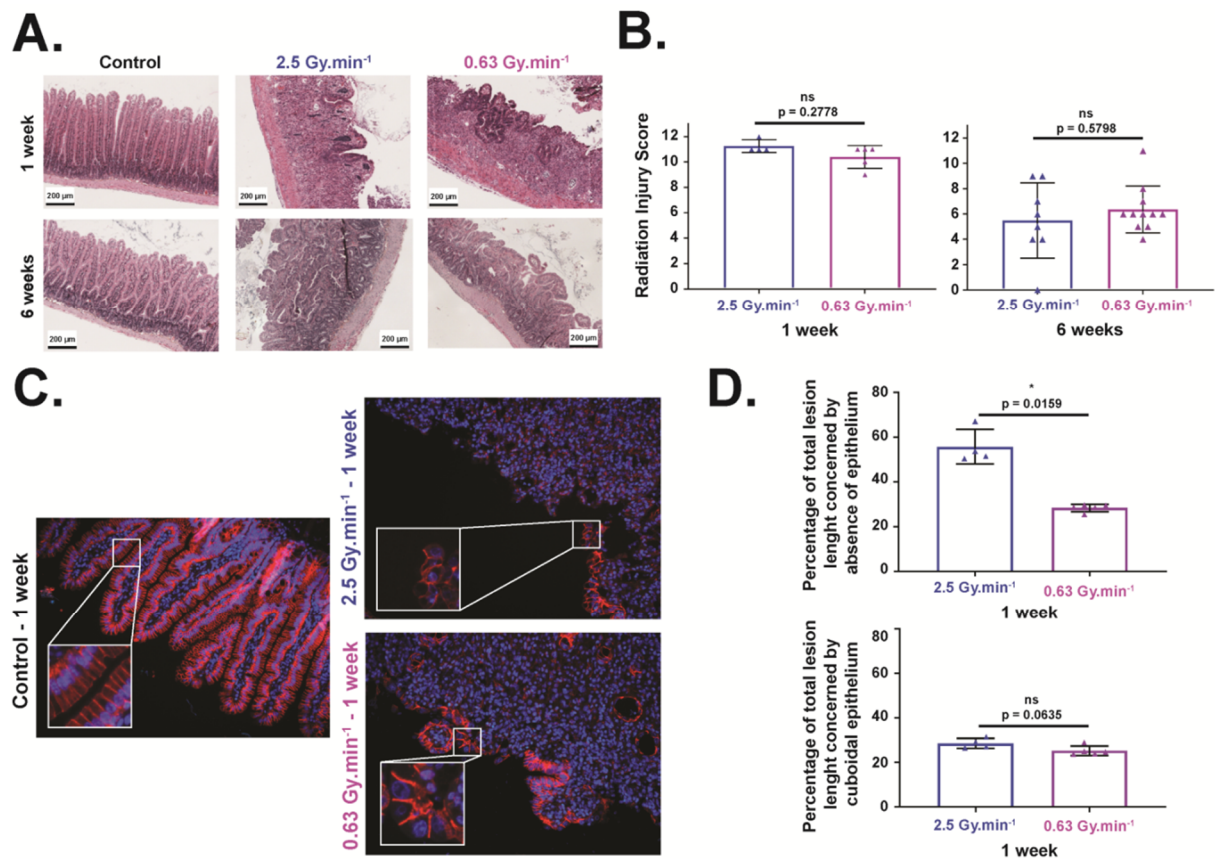
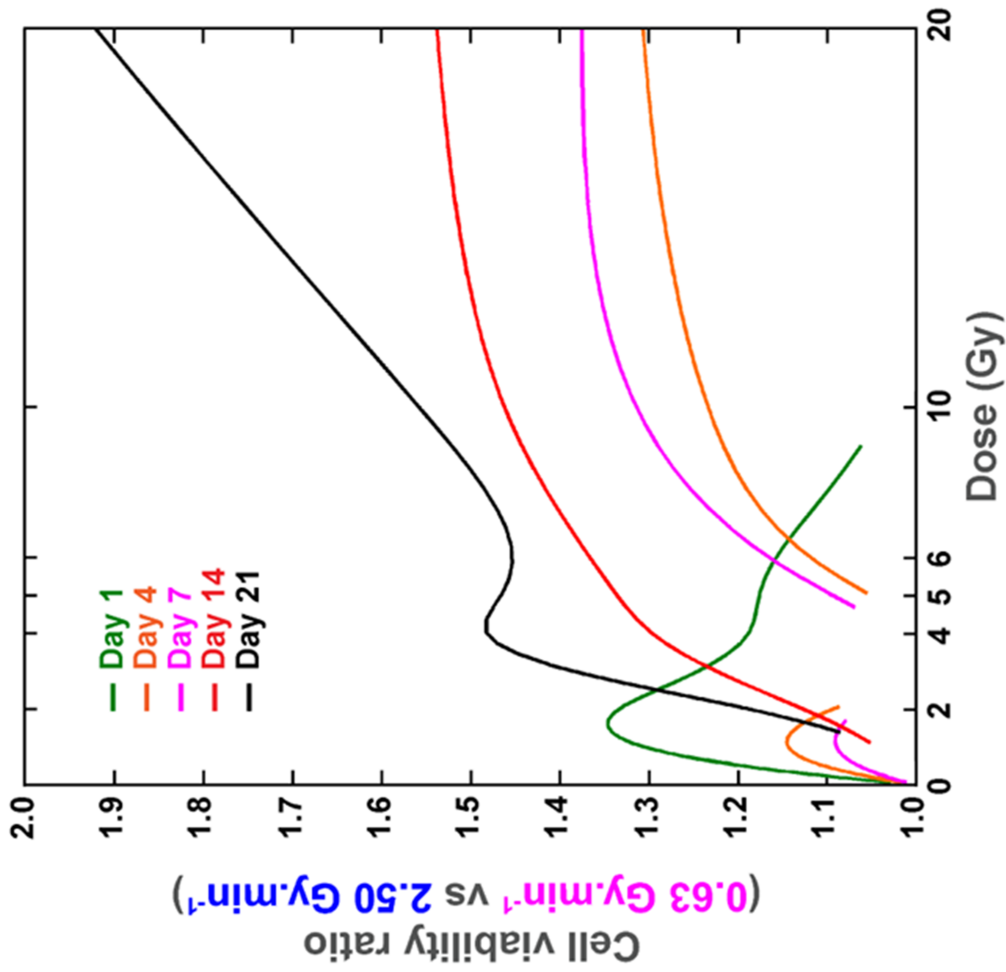


Figure 6. Histological analysis and lesion scorings after 19 Gy localized intestinal radiation exposure (A) Representative microscopic alterations obtained in 0.63 and 2.5 Gy.min⁻¹ mice 1 and 6 weeks after irradiation. Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron. Scale bar = 200 μm. (B) A semi-quantitative radiation injury score was assigned to irradiated tissues from both beams 1 and 6 weeks after irradiation (n = 6 animals per group for 1 week end-point, n = 12 animals per group for 6 week end-point, adherences were removed from the figure). (C) Examples of p120 catenin staining performed at 1 week on small intestine section of non-irradiated mice (left panel), and mice irradiated at 2.5 Gy.min⁻¹ (right upper panel) and 0.63 Gy.min⁻¹ (right bottom panel) (original magnification x200). (D) Percentages of bordering epithelium with severe damage (upper panel) and cuboidal cells (bottom panel) (*, p < 0.05).

SF	0.63 Gy.min ⁻¹ vs 2.5 Gy.min ⁻¹	95% CI*
0.01	1.11	[1.06;1.16]
0.02	1.14	[1.09;1.19]
0.05	1.21	[1.15;1.27]
0.10	1.21	[1.16;1.27]
0.15	1.20	[1.14;1.27]
0.20	1.19	[1.12;1.27]
0.25	1.18	[1.10;1.27]
0.30	1.17	[1.08;1.27]
0.35	1.16	[1.06;1.28]
0.40	1.16	[1.05;1.28]
0.45	1.15	[1.03;1.28]
0.50	1.15	[1.02;1.29]
0.55	1.14	[1.00;1.29]
0.60	1.14	[0.99;1.29] [#]
0.65	1.13	[0.98;1.30] [#]
0.70	1.13	[0.97;1.30] [#]
0.75	1.12	[0.96;1.30] [#]
0.80	1.12	[0.95;1.30] [#]
0.85	1.11	[0.94;1.31] [#]
0.90	1.11	[0.93;1.31] [#]

Supplementary Table S1: Clonogenic assay RBE values (Ratio of doses for a given SF). * 95% CI = 95% confidence interval. # Not statistically significant (CI including 1).

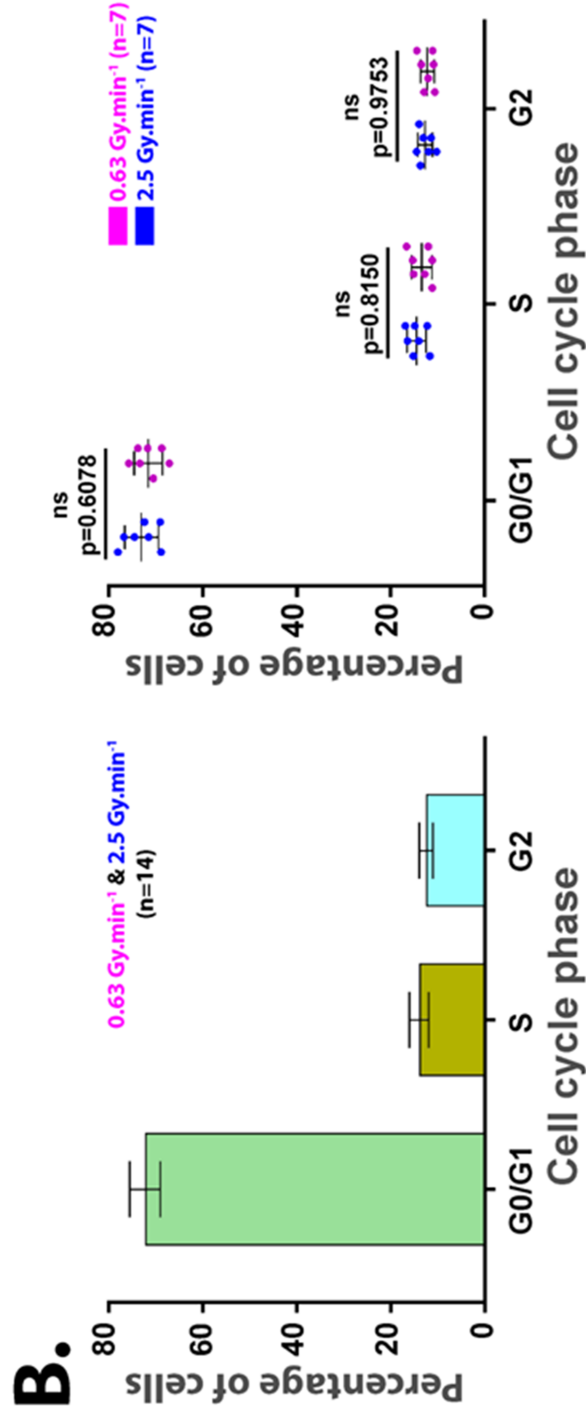
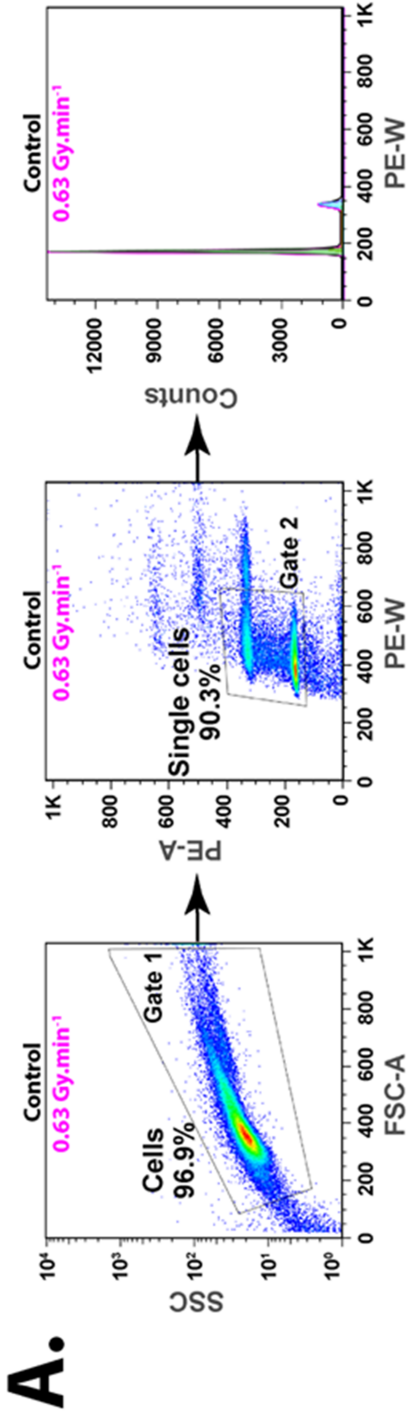
A.



B.

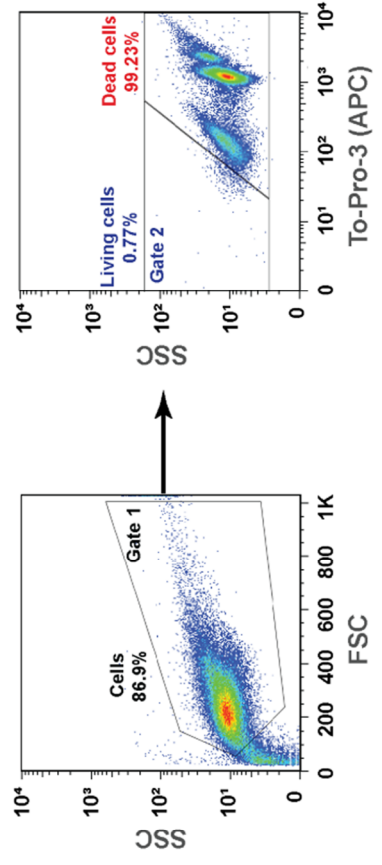
Dose (Gy)	Time (Days)	RBE	95% CI*
2.00	1.00	1.34	[1.23;1.46]
2.00	2.00	1.31	[1.21;1.42]
2.00	3.00	1.22	[1.13;1.31]
2.00	4.00	1.11	[1.03;1.19]
2.00	7.00	1.07	[1.00;1.15]
2.00	14.00	1.11	[1.06;1.18]
2.00	21.00	1.16	[1.09;1.24]
4.00	1.00	1.20	[1.12;1.29]
4.00	2.00	1.13	[1.06;1.20]
4.00	3.00	1.05	[0.99;1.12]*
4.00	4.00	0.97	[0.92;1.03]*
4.00	7.00	1.01	[0.96;1.06]*
4.00	14.00	1.28	[1.22;1.35]
4.00	21.00	1.47	[1.39;1.56]
5.00	1.00	1.18	[1.11;1.26]
5.00	2.00	1.14	[1.08;1.20]
5.00	3.00	1.09	[1.03;1.14]
5.00	4.00	1.03	[0.97;1.08]*
5.00	7.00	1.07	[1.02;1.12]
5.00	14.00	1.33	[1.26;1.39]
5.00	21.00	1.47	[1.40;1.55]
6.00	1.00	1.16	[1.10;1.23]
6.00	2.00	1.16	[1.10;1.23]
6.00	3.00	1.15	[1.09;1.21]
6.00	4.00	1.11	[1.05;1.17]
6.00	7.00	1.16	[1.10;1.21]
6.00	14.00	1.36	[1.30;1.42]
6.00	21.00	1.45	[1.38;1.54]
10.00	1.00	1.05	[0.99;1.11]*
10.00	2.00	1.12	[1.05;1.19]
10.00	3.00	1.18	[1.11;1.25]
10.00	4.00	1.23	[1.16;1.30]
10.00	7.00	1.31	[1.24;1.38]
10.00	14.00	1.46	[1.39;1.52]
10.00	21.00	1.54	[1.45;1.65]
20.00	1.00	0.96	[0.87;1.05]*
20.00	2.00	1.08	[1.00;1.18]
20.00	3.00	1.18	[1.09;1.27]
20.00	4.00	1.31	[1.21;1.41]
20.00	7.00	1.38	[1.28;1.48]
20.00	14.00	1.54	[1.44;1.65]
20.00	21.00	1.92	[1.77;2.09]

Supplementary Figure S1. “RBE” based on cell viability (ratios for a given dose and time). (A) “RBE” representation at day 1 (green curve), day 4 (orange curve), day 7 (purple curve), day 14 (red curve) and day 21 (black curve) as a function of dose (Gy) (B) Numerical values of RBE extracted from experimental data. *95% CI = 95% confidence interval. # Not statistically significant (CI includes 1).

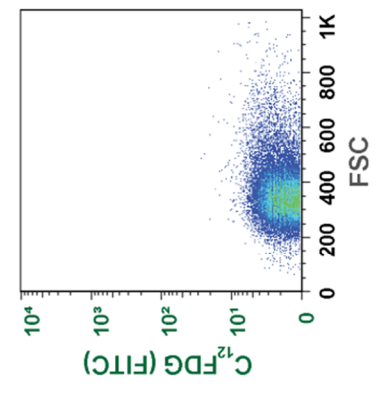
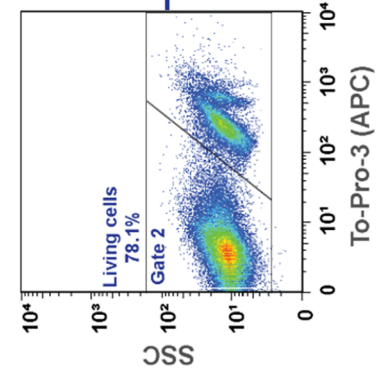
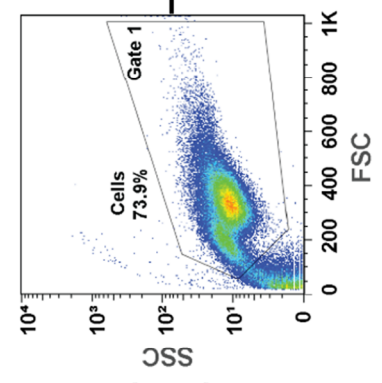


Supplementary Figure S2. Cell cycle analysis performed on controls just before irradiation. (A) Example of one representative cell cycle analysis performed using the FlowJo cell cycle tool on single cells (set up to remove debris first, then by using size (APC-W)/intensity (APC-A) bi-parametric analysis to remove doublets) (B) Mean of cell cycle proportions for controls at T0 (n=14 in total, left panel); n=7 for 0.63 Gy.min⁻¹ irradiation (purple plots) plus n=7 for 2.5 Gy.min⁻¹ (blue plots) (right panel); 5x10⁴ cells were analyzed per n.

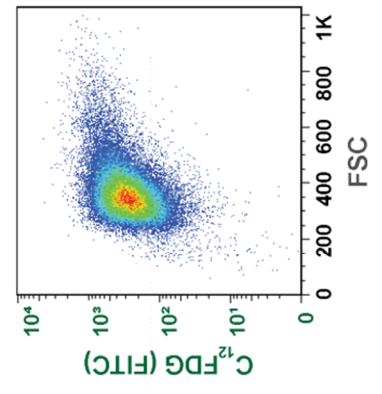
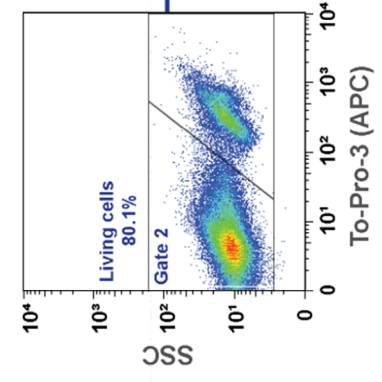
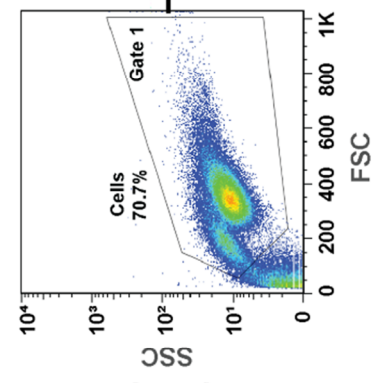
A. Triton 0.06X



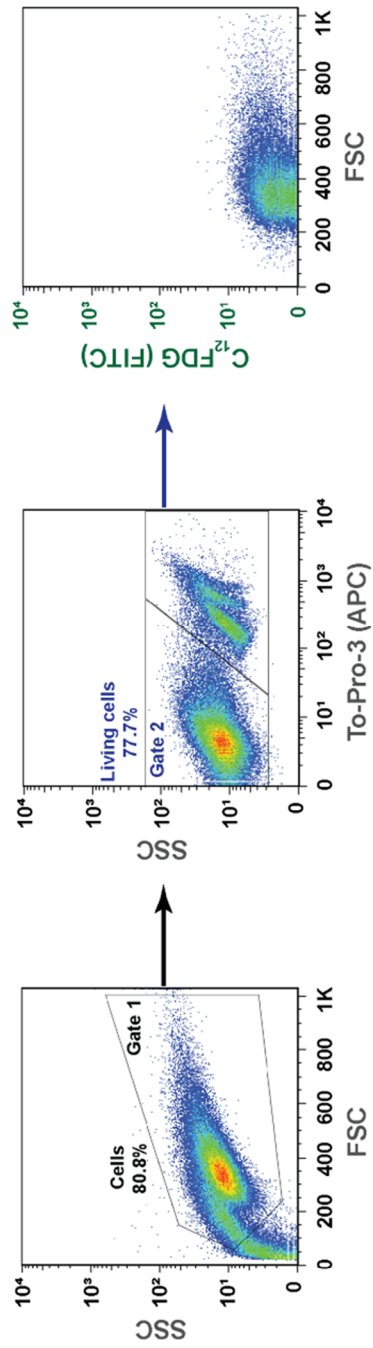
B. Control DMSO (D7)



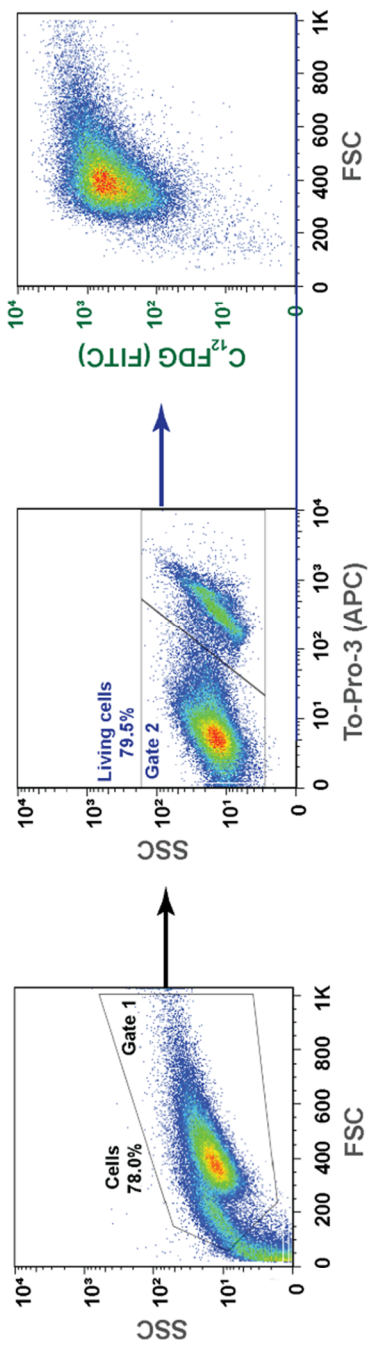
C. Control C12FDG (D7)



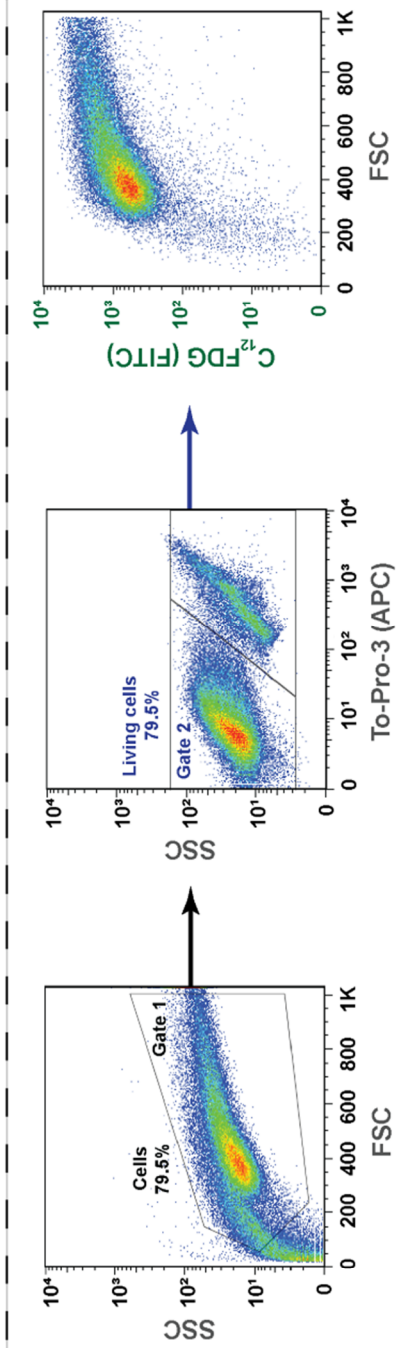
D.
 2 Gy
 DMSO
 (D7)

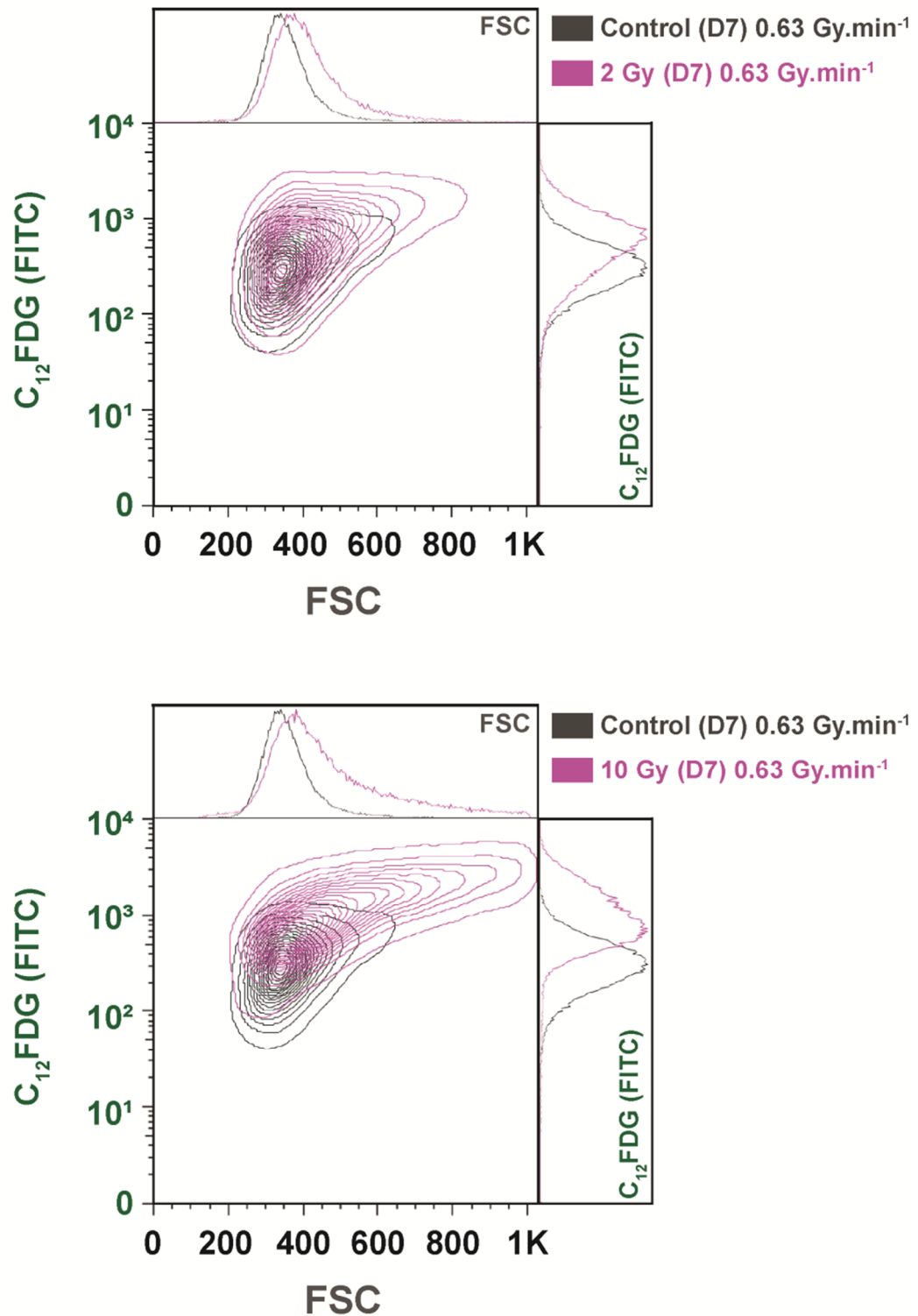


E.
 2 Gy
 C¹²FDG
 (D7)

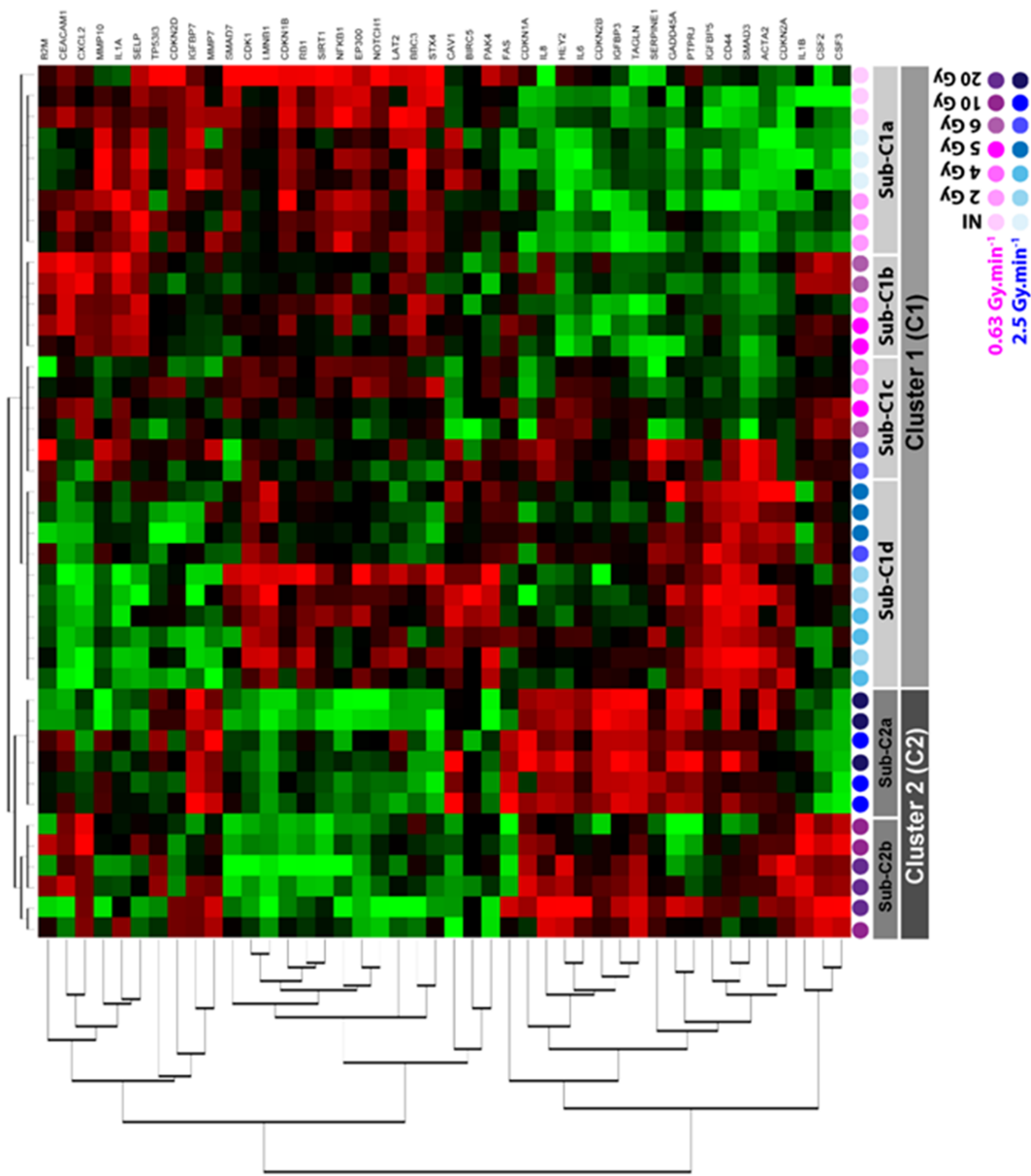


F.
 10 Gy
 C¹²FDG
 (D7)



G.

Supplementary Figure S3. Example of analysis set-up for $C_{12}FDG$ experiments for $0.63 Gy.min^{-1}$ irradiation. (A) First analysis on size (FSC: forward scatter)/granulometry (SSC: side scatter) parameters, to collect cells (gate G1) and to remove fragmented cells and debris. Triton 0.06X final was used as positive control to ensure good detection of living cells (Gate 2) and dead cells. (B) DMSO (vehicle of $C_{12}FDG$) used as negative control to ensure good detection of $C_{12}FDG$ in controls (C) Detection of $C_{12}FDG$ in controls. (D) DMSO used as negative control to ensure good detection of $C_{12}FDG$ in 2 Gy. (E) Detection of $C_{12}FDG$ in 2 Gy. (F) Detection of $C_{12}FDG$ in 10 Gy. (G) Bi-parametric (size/FITC) overlay of control versus 2 Gy irradiation (upper panel) and control vs 10 Gy irradiation (bottom panel).



Supplementary Figure S4. RT-qPCR TLDA custom array at D21. Assay heat map illustrating differentially expressed genes among 44 genes measured at day 21 post-irradiation. For one gene considered, red dots represent overexpression and green dots represent downregulation. Corrected p-values using the Benjamini-Hochberg method, $p < 0.05$. ($n = 4$ independent experiments per condition). Purple rounds correspond to 0.63 Gy.min⁻¹ irradiation and blue rounds to 2.5 Gy.min⁻¹ irradiation, the color gradient indicating the dose.

Données complémentaires : *In vitro*, sur les HMVEC-L, l'impact du débit de dose sur les effets biologiques est moins important.

Nous avons voulu vérifier, *in vitro*, sur un deuxième type de cellules primaires endothéliales humaines : les HMVEC-L, l'impact du débit de dose sur les effets biologiques.

Objectifs :

Dans la précédente étude, il a été montré que le débit de dose impacte la réponse radio-induite des HUVECs. Le test de survie clonogénique n'est réalisable que lorsque les cellules ont la capacité à former des clones ce qui n'est pas le cas des HMVEC-L. Ainsi dans ce cas de figure, il devient impératif de développer de nouvelles mesures d'EBR pour évaluer l'efficacité biologique d'un rayonnement ionisant par rapport à l'autre.

Matériel & Méthodes :

Les conditions de culture et de réalisation des différents tests avec les HMVEC-L sont identiques aux HUVECs. Seule la densité d'ensemencement de départ est différente (6700 cellules/cm² contre 3000 cellules/cm² pour les HUVECs). Les cellules ont été irradiées avec la même gamme de dose : 0, 2, 4, 5, 6, 10 et 20 Gy et les mesures biologiques de viabilité et cycle cellulaire ont été réalisées à T0, 1, 2, 3, 4 et 7 jours après l'irradiation. L'activité β -galactosidase a été mesurée uniquement à 7 jours post-irradiation.

Résultats :

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire relative diminue en fonction de la dose et du temps pour les deux débits de dose utilisés (Figure 1.A). Afin de comparer la viabilité relative entre les deux débits de dose, une analyse mathématique nous permet d'observer l'évolution du rapport de viabilité relative [0,63/2,5 Gy/min] en fonction du temps et de la dose (Figure 1.B). La surface colorée sur la représentation du rapport de viabilité relative [0,63/2,5 Gy/min] correspond à une différence significative entre les deux débits de dose (Figure 1.B). Jusqu'à 2 jours après l'irradiation, la viabilité relative est significativement supérieure au débit à 0,63 Gy/min par rapport à 2,5 Gy/min quel que soit la dose (Figure 1.B). De 2 à 7 jours post-irradiation, pour des doses inférieures à 2 Gy et supérieures à 10 Gy, il n'y a pas de différences significatives de la viabilité relative entre les deux débits de dose (Figure 1.B). L'analyse statistique de ces données a permis de mettre en évidence la valeur du pseudo-EBR (rapport d'effet à une dose et

un temps identiques). Ainsi, à 1 jour post-irradiation, ces valeurs d'« EBR » sont supérieures à 1 quel que soit la dose (Figure 2.B). Cette « EBR » est égal à 1 pour des doses inférieures à 2 Gy et supérieures à 10 Gy au-delà de 2 jours après l'irradiation (Figure 2).

Cycle cellulaire

Pour les cellules non irradiées, la proportion de cellules en phase G1 augmente et diminue en phase S et G2 en fonction du temps (Figure 3.A). Quel que soit le débit de dose utilisé, la proportion de cellules en phase G1 diminue alors qu'elle augmente en phases S et G2 lorsque la dose augmente (Figure 3.A). La modélisation du rapport de la proportion des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire permet de mettre en évidence les différences significatives entre les deux débits de dose (surfaces colorées, Figure 3.B). Globalement, il y a significativement plus de cellules en phase G1 et moins en phase S et G2 pour le débit de dose le plus faible. Cependant, la proportion des cellules en phase S n'est pas significativement différente entre les deux débits de dose de 5 à 7 jours après l'irradiation (Figure 3.B).

Sénescence

Une analyse par cytométrie en flux permet de mesurer l'activité β -galactosidase à l'aide du C12FDG en fonction de la taille des cellules, de la dose et du débit de dose utilisé (Figure 4.A). L'irradiation entraîne un déplacement du nuage de points, caractérisé à la fois par l'activité β -galactosidase mais aussi par la taille des cellules. La modélisation mathématique du déplacement du centre du nuage de points par rapport au témoin non irradié a été réalisée pour les deux débits de dose (Figure 4.B). Ainsi, l'activité β -galactosidase est augmentée en fonction de la dose à 0,63 et 2,5 Gy/min (Figure 4.B). Cette augmentation est caractérisée par une activité β -galactosidase qui atteint un plateau pour des doses supérieures à 6 Gy. Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour l'activité β -galactosidase en fonction du débit de dose utilisé (Figure 4.B).

Conclusion :

Les irradiations *in vitro* montrent un impact du débit de dose sur la viabilité cellulaire avec une survie cellulaire qui est significativement plus importante au débit de dose le plus faible ($EBR < 1$) pour certaines gammes de doses et de temps. La proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est également impactée de manière significative par le débit de dose ($EBR \neq 1$). En revanche, l'activité β -galactosidase (reflet de la sénescence radio-induite) n'est quant à elle pas impactée par la variation de débit de dose ($EBR = 1$). Ces mesures multiparamétriques apparaissent donc essentielles pour déterminer l'EBR de cellules

incapables de proliférer en conditions clonales, comme le sont les HMVEC-L. Enfin, le débit de dose impacte la réponse radio-induite des HMVEC-L mais dans une moindre mesure par rapport aux HUVECs.

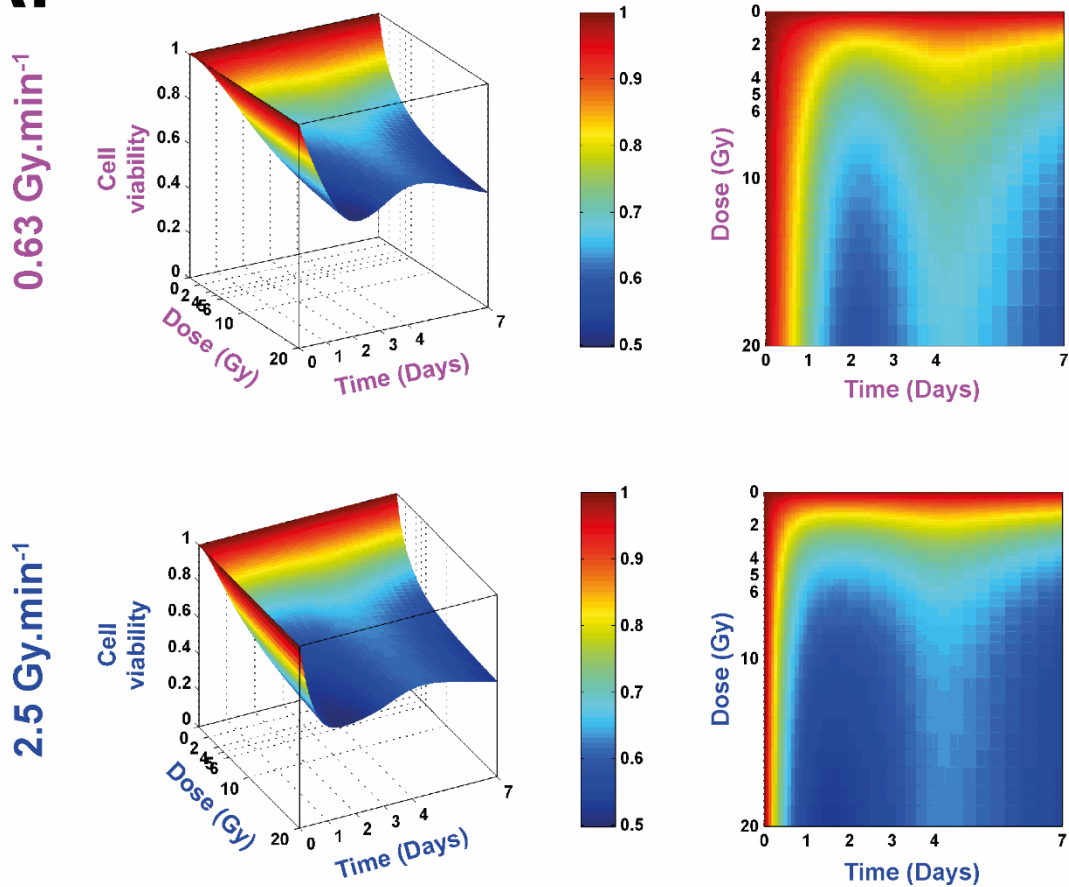
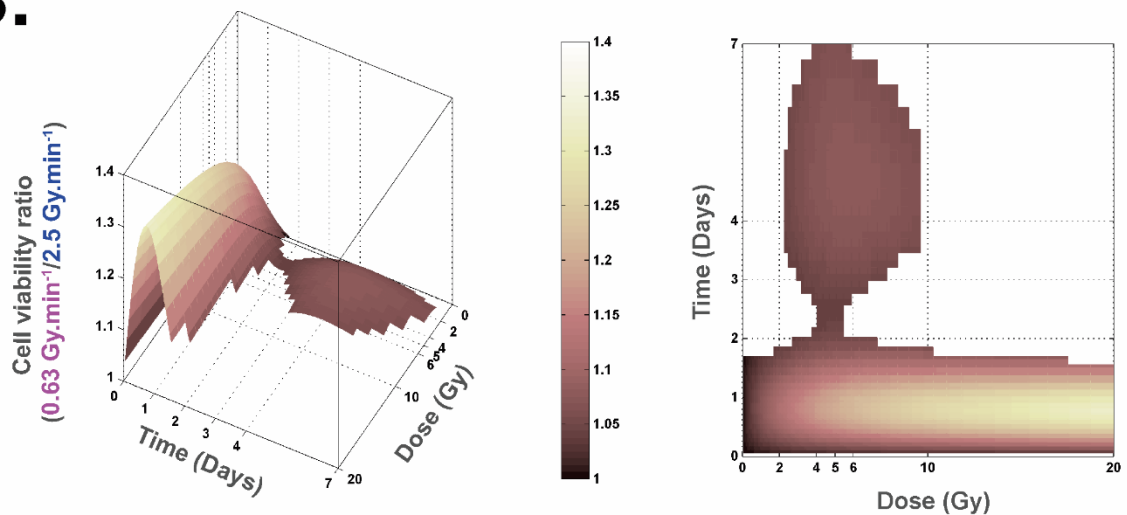
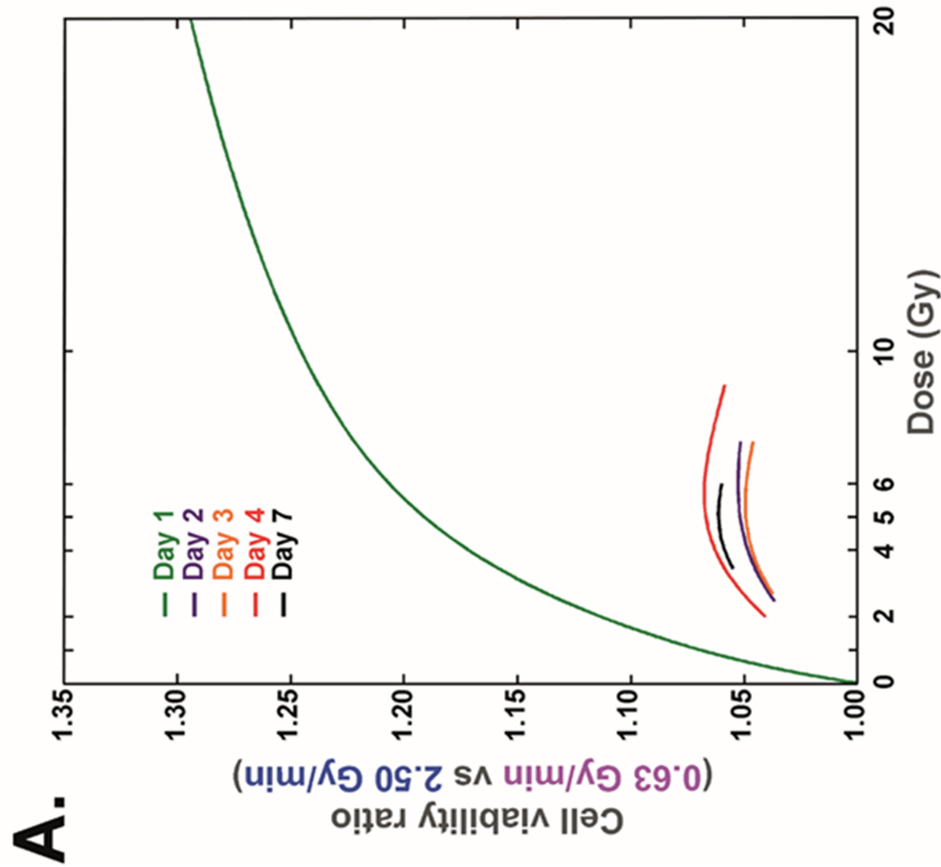
A.**B.**

Figure 1 : Viabilité cellulaire suite à une irradiation des HMVEC-L à 0,63 et 2,5 Gy/min. (A) Représentations 3D et 2D des mesures de viabilité cellulaire par comptage bleu trypan à la cellule de Malassez à 0,63 et 2,5 Gy/min. (B) Représentations 3D et 2D du rapport de viabilité relative [0,63/2,5 Gy/min]. La surface colorée correspond à une différence significative entre les deux débits de dose (p -value globale < 0,001). Chaque surface correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes.



B.

Dose (Gy)	Time (Days)	RBE	95% CI*
2.00	1.00	1.11	[1.08;1.14]
2.00	2.00	1.04	[1.00;1.07]
2.00	3.00	1.03	[0.99;1.06]*
2.00	4.00	1.04	[1.00;1.08]
2.00	7.00	1.04	[0.99;1.09]*
4.00	1.00	1.17	[1.12;1.22]
4.00	2.00	1.05	[1.01;1.10]
4.00	3.00	1.04	[1.00;1.08]
4.00	4.00	1.06	[1.01;1.10]
4.00	7.00	1.06	[1.00;1.11]
5.00	1.00	1.19	[1.14;1.24]
5.00	2.00	1.06	[1.01;1.11]
5.00	3.00	1.05	[1.01;1.09]
5.00	4.00	1.06	[1.02;1.11]
5.00	7.00	1.06	[1.00;1.12]
6.00	1.00	1.21	[1.15;1.27]
6.00	2.00	1.06	[1.01;1.11]
6.00	3.00	1.05	[1.00;1.09]
6.00	4.00	1.07	[1.02;1.12]
6.00	7.00	1.06	[1.00;1.12]
10.00	1.00	1.25	[1.17;1.32]
10.00	2.00	1.06	[1.00;1.12]
10.00	3.00	1.03	[0.99;1.09]*
10.00	4.00	1.05	[0.99;1.11]*
10.00	7.00	1.04	[0.97;1.11]*
20.00	1.00	1.30	[1.20;1.41]
20.00	2.00	1.04	[0.96;1.12]*
20.00	3.00	1.00	[0.93;1.07]*
20.00	4.00	1.02	[0.94;1.10]*
20.00	7.00	0.98	[0.89;1.08]*

Figure 2 : Valeurs du pseudo-EBR basées sur les mesures de viabilité cellulaire des HMVEC-L (rapport d'effet pour une dose et un temps donnés).
 (A) Valeurs du pseudo-EBR en fonction de la dose (en Gy) 1 jour (courbe verte), 2 jours (courbe bleue), 3 jours (courbe rose), 4 jours (courbe rouge) et 7 jours après l'irradiation (courbe noire). (B) Valeurs numériques du pseudo-EBR extraites des données expérimentales. *95% IC = 95% de l'intervalle de confiance. # Pas de différences significatives (IC inclut 1). Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

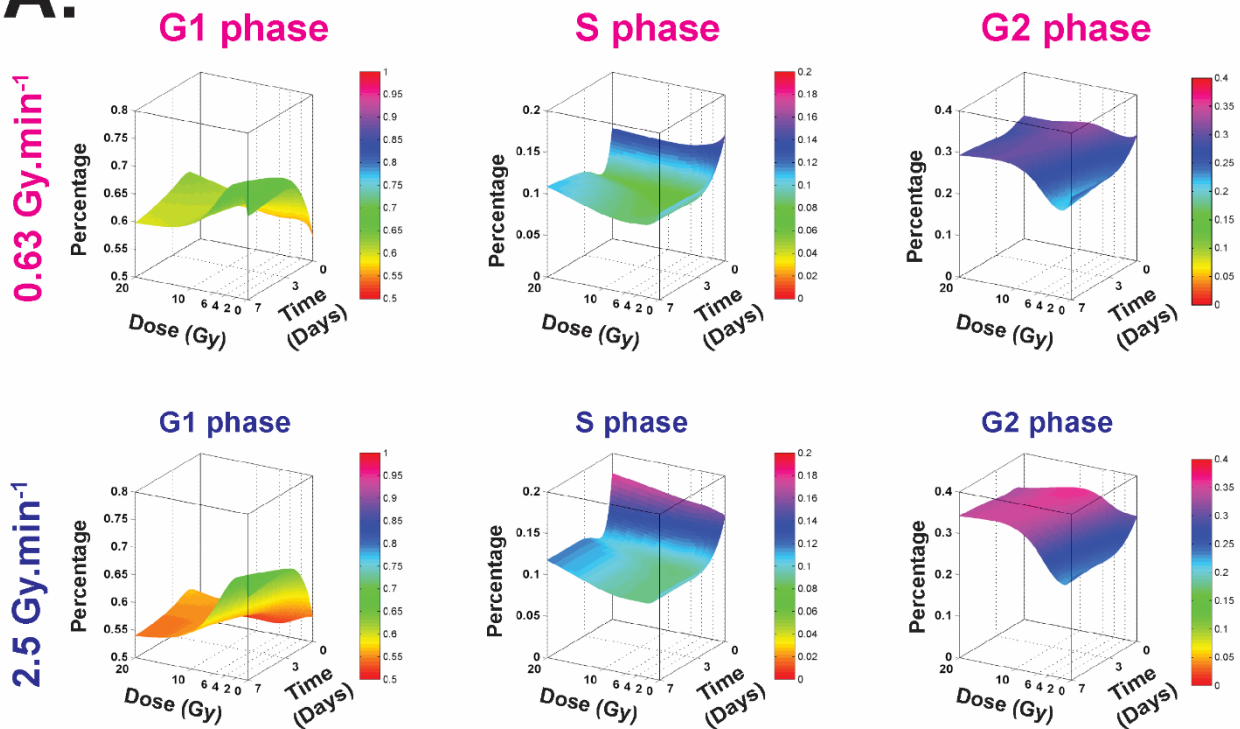
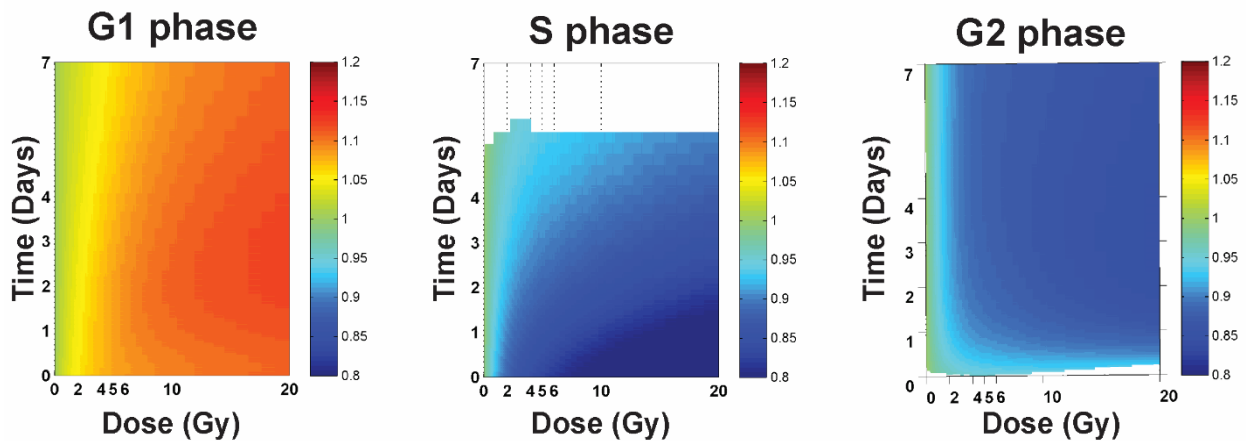
A.**B.**

Figure 3 : Répartitions dans les phases du cycle cellulaire des cellules irradiées à 0,63 et 2,5 Gy/min. (A) Modélisation de la dynamique en dose et en temps de la proportion de cellules dans les phases du cycle cellulaire (G1 (gauche), S (au milieu) et G2 (droite)). Chaque surface correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes. (B) Représentations 2D du rapport de la proportion des cellules à 0,63 Gy/min par rapport à 2,5 Gy/min [0,63/2,5 Gy/min] dans chacune des phases du cycle cellulaire (G1 (gauche), S (au milieu) et G2 (droite)). Les surfaces colorées correspondent à une différence significative entre les deux débits de dose (p -value globale < 0,001). Chaque surface correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

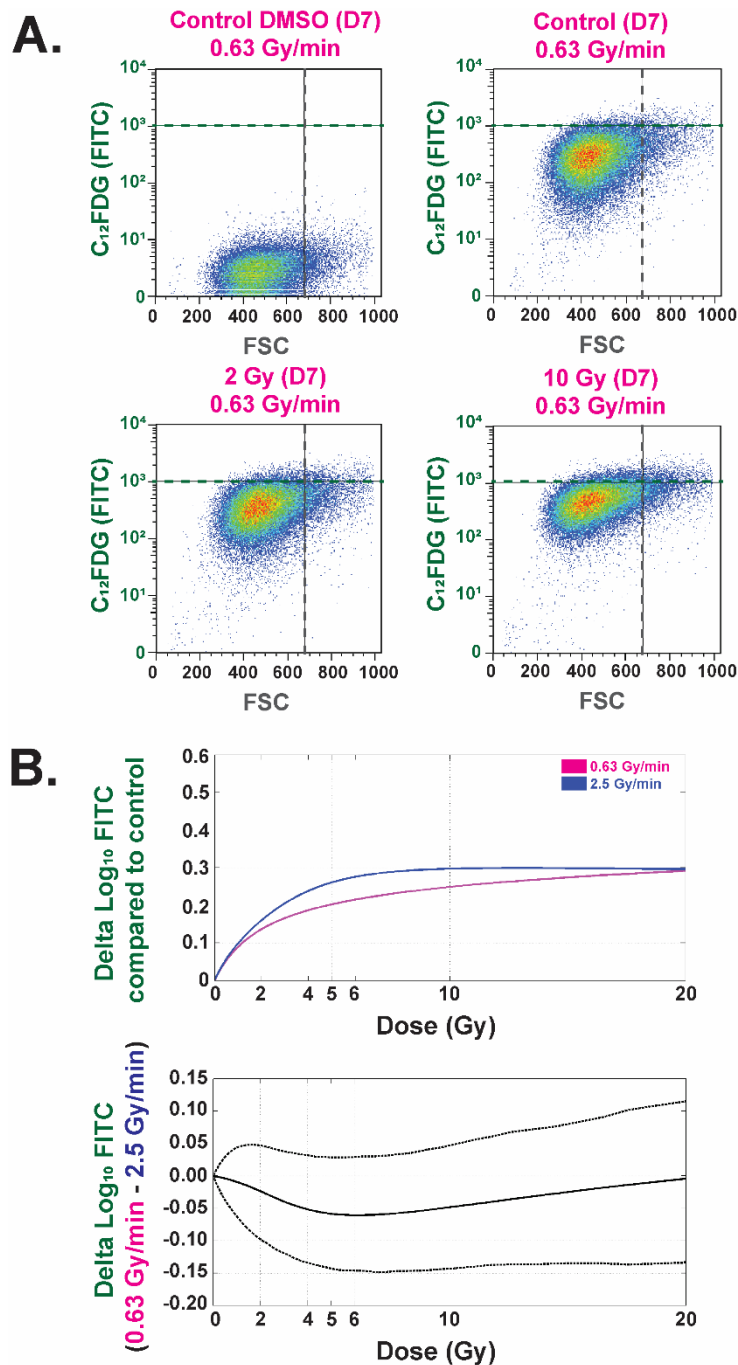


Figure 4 : Analyse par cytométrie en flux de la sénescence ($C_{12}FDG$) des HMVEC-L après irradiation. (A) Analyse bi-paramétrique (taille (FSC)/ $C_{12}FDG$ (FITC)) à 7 jours des HMVEC-L non irradiées (avec DMSO ou $C_{12}FDG$), irradiées à 2 et 10 Gy avec une tension 4 MV, au débit de 0,63 Gy/min. Cette représentation correspond à une expérience représentative (5×10^4 cellules vivantes). (B) Figure supérieure : Les courbes représentent la moyenne du Log_{10} (FITC) du nuage de point en fonction de la dose pour les deux débits de dose (0,63 Gy/min (courbe en violet) ou 2,5 Gy/min (courbe en bleu)). Chaque courbe correspond à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes comprenant au moins 5×10^4 cellules vivantes. (B) Figure inférieure : La courbe représente le $\text{log}_{10} (\text{FITC}_{0,63} / \text{FITC}_{2,5})$ en fonction de la dose. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux débits de dose.

Axe 2 : Impact du fractionnement de la dose sur la réponse biologique

Mariam Ben Kacem^{a,#}, Mohamed-Amine Benadjaoud^{b,#}, Morgane Dos Santos^c, Valérie Buard^a, Georges Tarlet^a, Bernard Le Guen^d, Agnès François^a, Olivier Guipaud^a, Fabien Milliat^a and Vincent Paget^{a,*}

^a*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of MEDical Radiobiology (LRMed), Fontenay-aux-Roses, 92260, France*

^b*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Fontenay-aux-Roses, France*

^c*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental exposures (LRAcc), Fontenay-aux-Roses, France*

^d *Electricité de France, Cap Ampère, Saint-Denis, France*

authors have equally contributed to this work

**Corresponding author*

Les résultats de cette étude obtenus dans le cadre du travail de thèse sont en cours de finalisation et feront l'objet d'un article à soumettre dans une revue à comité de lecture. Ces résultats sont discutés à la fin du manuscrit. Les données concernant le cycle cellulaire ne sont pas complètes en raison d'un problème technique. Enfin, les colorations histologiques ayant déjà été réalisées, l'analyse de ces coupes sera également intégrée dans l'article.

Objectifs :

En clinique, les protocoles d'hypofractionnement sont de plus en plus utilisés, notamment pour le traitement des cancers du poumon, du sein et de la prostate. Ainsi, il est intéressant d'étudier l'impact de différents protocoles de fractionnement de la dose sur la réponse biologique à l'irradiation. Suite à la mise en évidence d'un impact du débit de dose sur différents paramètres biologiques *in vitro* (viabilité, sénescence et expression génique) et *in vivo* (poids des animaux et dommages tissulaires) pour des irradiations en dose unique, nous avons alors décidé d'étudier l'impact des débits de dose sur des irradiations fractionnées *in vitro*. De plus, l'étude de l'impact de différents protocoles de fractionnement à BED équivalente

est également menée *in vivo*. L'objectif de ce travail est de développer des mesures d'EBR multiparamétriques afin de prédire les effets biologiques aux tissus sains pour différents protocoles de fractionnement en fonction du débit de dose. Cette étude se concentre sur les protocoles de radiothérapie émergents à savoir les fortes doses par fraction.

Matériel et méthode :

Des cellules endothéliales (HUVECs) ont été irradiées au LINAC (4 MV, 0,63 Gy/min ou 2,5 Gy/min) suivant 5 protocoles de fractionnement à dose totale équivalente (1 x 20 Gy (A), 2 x 10 Gy (B), 4 x 5 Gy (D), 10 x 2 Gy (E et F) et à 3x11 Gy (C), ce dernier ayant une BED équivalente à 1 x 20 Gy). Les représentations graphiques des données *in vitro* se basent sur les valeurs de BED_{3Gy} correspondant à chaque protocole : 154 Gy (1 x 20 Gy et 3 x 11 Gy), 87 Gy (2 x 10 Gy), 53 Gy (4 x 5 Gy) et 33 Gy (10 x 2 Gy) (Table I). Les protocoles ont un changement de milieu avant la première fraction d'irradiation, et avant la dernière fraction d'irradiation sauf pour le protocole F qui a un changement 3 jours après la dernière fraction d'irradiation (Figure S1). Les variations observées entre les protocoles E et F sont dues à l'impact du décalage du changement de milieu qui sera abordé dans la discussion générale du manuscrit. Chaque protocole possède son témoin respectif recevant ainsi les mêmes changements de milieu. La viabilité cellulaire, l'activité β -galactosidase et l'expression génique d'une signature sénescence de 44 gènes (Annexe 1) ont été mesurées à 7 ou 21 jours après la dernière fraction d'irradiation. Les détails techniques concernant la culture et les mesures biologiques sont décrits dans « *Variation of 4 MV X-ray dose rate strongly impacts biological response both in vitro and in vivo* » (Ben Kacem et al, soumis dans Scientific Reports).

Des souris C57BL/6J sont irradiées en thorax entier au LINAC suivant 4 protocoles de fractionnement différents (1 x 20 Gy, 3 x 11 Gy, 5 x 8,2 Gy et 22 x 3,3 Gy) ayant une $BED_{3Gy} \approx 154$ Gy (Figure S2, Table I). Un cinquième groupe de souris a été irradié suivant un protocole de 10 x 8,2 Gy, ayant une $BED_{3Gy} \approx 306$ Gy (Figure S2, Table I). L'étalement des fractions d'irradiation varie entre 1 jour (1 x 20 Gy) et 1 mois (22 x 3,3 Gy) (Figure S2). La survie des souris a été suivie sur une durée de 6 mois. Le poids a été mesuré à 3, 4, 5 et 6 mois après la dernière fraction d'irradiation. Des scanners pulmonaires à l'aide d'un micro-CT ont été réalisés à 1 et 6 mois post-irradiation. Pour chaque souris les poumons, le cœur et du sang ont été prélevés lors du sacrifice suivant l'imagerie micro-CT. Le poumon gauche et le lobe supérieur droit ont été inclus en paraffine pour réaliser des études histologiques. Le poumon gauche a en plus également été préalablement marqué avec une solution X-Gal permettant de quantifier la sénescence. Les lobes inférieurs du poumon droit ont été prélevés et stockés pour

permettre ultérieurement des mesures d'expression génique ultérieures. Enfin, le sang a été prélevé lors du sacrifice de chaque animal. Ce dernier a été stocké afin de permettre la réalisation de dosages sériques.

Résultats :

In vitro, la viabilité cellulaire est plus importante au plus faible débit de dose pour des protocoles de fractionnement ayant une $BED_{(3Gy)}$ supérieure à 115 Gy à 7 jours post-irradiation et pour une $BED_{(3Gy)} > 40$ Gy à 21 jours post-irradiation. La viabilité relative est également supérieure lorsque le nombre de fractions augmente suite à une irradiation à 2,5 Gy/min, ce qui n'est pas le cas à 0,63 Gy/min, quel que soit le temps. Le débit de dose a un impact sur l'expression génique des cellules irradiées au même protocole de fractionnement. Nos résultats montrent une réponse à l'irradiation différente pour deux protocoles de fractionnement (1 x 20 Gy et 3 x 11 Gy) ayant pourtant une $BED_{(3Gy)}$ équivalente (≈ 154 Gy). De plus, l'expression génique sur une « signature sénescence » de 44 gènes est impactée par le débit de dose et le fractionnement de la dose. Des irradiations *in vivo* à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy montrent une modification de la réponse biologique à l'irradiation en fonction du fractionnement de la dose sur l'imagerie scanner des souris C57BL/6J. Le poids après 3 mois et la survie ne sont quant à eux pas impactés par le débit de dose suite à une irradiation fractionnée.

Conclusion :

In vitro, le débit de dose a un impact sur la réponse des cellules au fractionnement de la dose si on considère les mesures biologiques : viabilité cellulaire et expression génique sur la « signature sénescence » de 44 gènes sur les HUVECs. En effet, le débit de dose le plus élevé semble être plus délétère *in vitro*. Des protocoles ayant une $BED_{(3Gy)}$ équivalente, censé refléter une efficacité similaire, montrent pourtant des différences significatives sur des données biologiques à la fois *in vitro* et *in vivo* pour un même débit de dose.

Résultats

• Effet du débit de dose sur un continuum de $BED_{(3Gy)}$ *in vitro*

Viabilité cellulaire

La viabilité relative aux deux débits de dose sur un continuum de $BED_{(3Gy)}$ a été représentée et les analyses statistiques ont pour référence la viabilité à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy, correspondant au protocole 1 x 20 Gy (Figure 1). Pour ces modélisations, uniquement les protocoles A (1 x 20 Gy), B (2 x 10 Gy), D (4 x 5 Gy) et E (10 x 2 Gy) sont pris en compte. Les protocoles C et F étant néanmoins représentés sur la figure 1 mais faisant l'objet d'une analyse statistique séparée. A 0,63 Gy/min sept jours après la dernière fraction d'irradiation, la viabilité cellulaire relative n'est significativement pas différente de celle à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy lorsque les valeurs de $BED_{(3Gy)}$ varient (Figure 1.A). En revanche, à 2,5 Gy/min, la viabilité relative augmente significativement lorsque la $BED_{(3Gy)}$ diminue par rapport à 154 Gy. A J7, le rapport de la viabilité relative [0,63/2,5 Gy/min] est, quant à lui, représenté en fonction de la $BED_{(3Gy)}$ et montre une viabilité significativement supérieure à partir d'une $BED_{(3Gy)} \geq 115$ Gy au débit de dose de 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min. De plus, pour une $BED_{(3Gy)} \approx 33$ Gy (10 x 2 Gy), la viabilité relative est significativement inférieure au débit de dose le plus faible (Figure 1.A).

A 21 jours après la dernière fraction d'irradiation et à 0,63 Gy/min, la viabilité relative est significativement supérieure pour le protocole à 4 x 5 Gy ($BED_{3Gy} = 53$ Gy) par rapport au protocole 1 x 20 Gy ($BED_{3Gy} = 154$ Gy) (Figure 1.B) et reste inchangée pour les autres protocoles de fractionnement. En revanche, suite à une irradiation à 2,5 Gy/min, la viabilité relative augmente significativement lorsque la $BED_{(3Gy)}$ diminue par rapport à 154 Gy à 21 jours post-irradiation. A ce temps, le rapport de viabilité relative permet de mettre en évidence une viabilité significativement plus importante au débit de dose le plus faible pour des $BED_{(3Gy)} \geq 40$ Gy (Figure 1.B).

Sénescence

Une analyse par cytométrie en flux permet d'étudier l'activité β -galactosidase (FITC) en fonction de la taille des cellules (FSC), du débit de dose et du protocole de fractionnement (Figure 2.A). Le déplacement du centre du nuage de point pour les deux débits de dose en fonction des différents protocoles de fractionnement représentés sur une échelle de BED_{3Gy} a été modélisée (Figure 2.B). Ainsi, l'activité β -galactosidase est significativement diminuée suite à une irradiation à 1 x 20 Gy ($BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy) par rapport à 2 x 10 Gy ($BED_{(3Gy)} \approx 87$ Gy) et 10 x 2 Gy ($BED_{(3Gy)} \approx 33$ Gy) au débit de 0,63 Gy/min (Figure 2.B).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence suite à une irradiation au débit de 2,5 Gy/min (Figure 2.B). De plus, le rapport [0,63/2,5 Gy/min] de l'activité β -galactosidase ne montre aucune différence significative entre les deux débits de dose (Figure 2.C).

Expression génique

L'analyse globale des gènes permet de regrouper dans des clusters les gènes ayant le même profil d'expression sur le continuum de $BED_{(3Gy)}$. Ainsi, nous mettons en évidence 6 et 7 clusters respectivement à 7 et 21 jours après la dernière fraction d'irradiation (Figure 3). A J7, 36 gènes ont une expression impactée par le débit de dose (Figure 3.A). Par exemple, MMP10, étant impliqué dans le remodelage tissulaire, est significativement plus exprimé à 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min pour des valeurs de $BED_{(3Gy)} \leq 65$ Gy (Figure 3.A). De plus, à 21 jours post-irradiation, l'expression de 30 gènes (dont 25 en commun avec J7) est significativement impactée par le débit de dose (Figure 3.B).

• Effet du fractionnement et du débit de dose à $BED_{(3Gy)}$ équivalente *in vitro* (protocoles A et C)

La comparaison entre deux protocoles de fractionnement (1 x 20 Gy et 3 x 11 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy a été réalisée sur différentes mesures biologiques. La viabilité cellulaire relative est identique entre les deux protocoles lors d'une irradiation à 0,63 Gy/min que ce soit à J7 ou J21 (Figure 4). De même, la viabilité relative n'est pas modifiée à 2,5 Gy/min entre les deux protocoles de fractionnement à J7 (Figure 4.A). Cependant, la viabilité relative est significativement supérieure dans le protocole à 3 x 11 Gy par rapport à 1 x 20 Gy lors d'une irradiation au débit de 2,5 Gy/min à J21 (Figure 4.B). L'activité β -galactosidase n'est quant à elle pas impactée par le protocole de fractionnement aux deux débits de dose (Figure 5). Il est à noter que l'analyse statistique a été réalisée sur 2 réplicats au débit de 0,63 Gy/min et 4 à 2,5 Gy/min. L'analyse de l'expression génique d'une « signature sénescence » permet de mettre en évidence les gènes qui ont leur expression significativement impactée par le protocole de fractionnement en fonction du temps et du débit de dose. Ainsi, au débit de dose de 0,63 Gy/min, 8 et 12 gènes ont leur expression significativement impactée par le protocole de fractionnement respectivement à J7 et J21 (Figure 6). De même, 13 gènes sont différentiellement exprimés de manière significative au débit de 2,5 Gy/min que ce soit à J7 ou J21. Par ailleurs, il y a en commun 6 et 7 gènes dérégulés avec la même tendance respectivement à 7 et 21 jours post-irradiation entre les deux débits de dose.

• Effet du protocole de fractionnement à $BED_{(3Gy)}$ équivalente *in vivo*

Survie et poids des animaux après l'irradiation

Les courbes de survie pour les protocoles P1 (1 x 20 Gy), P2 (3 x 11 Gy), P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy ne montrent pas de différence significative de survie en fonction du fractionnement (Figure 7). Cependant, le protocole P5 (10 x 5,8 Gy), ayant une $BED_{(3Gy)}$ deux fois plus importante (306 Gy), a une survie significativement inférieure aux autres protocoles (Figure 7). Entre 3 et 6 mois après l'irradiation, aucune différence significative n'a été mise en évidence sur la variation du poids en fonction du fractionnement de la dose à $BED_{(3Gy)}$ équivalente (Figure S3).

Scanners pulmonaires

L'acquisition des images micro-CT des souris à 1 et 6 mois après l'irradiation pour les 5 protocoles de fractionnement nous permet de mettre en évidence une opacification des poumons après l'irradiation quel que soit le fractionnement contrairement aux souris non irradiées (Figure 8). L'opacification à 6 mois semble être légèrement plus prononcée qu'à 1 mois pour tous les protocoles de fractionnement. La quantification de l'intensité en niveau de gris des voxels permet de quantifier et de modéliser la fréquence de distribution en fonction de l'intensité en unité Hounsfield (HU) pour chaque groupe de fractionnement (Figure 9.A). Ainsi, l'intensité moyenne en HU pour les souris à 6 mois par rapport à 1 mois est augmentée quel que soit le protocole de fractionnement. La distribution des intensités pour le protocole P1 (1 x 20 Gy) est la plus décalée vers la droite donc la plus délétère avec une médiane à -565 HU à 1 mois et -473 HU à 6 mois après l'irradiation (Figure 9.A). Afin de comparer les protocoles entre eux, la différence de distribution de l'intensité HU des différents protocoles a été calculée par rapport au protocole P1 (1 x 20 Gy) pour tous les quantiles (Figure 9.B). A 6 mois post-irradiation, les protocoles à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy peuvent être classés du plus délétère au moins délétère en fonction de l'opacification pulmonaire : P1 (1 x 20 Gy) suivi des protocoles P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) qui ne présentent pas de différences significatives entre eux et enfin le protocole P2 (3 x 11 Gy) qui est le moins délétère (Figure 9.B et S4).

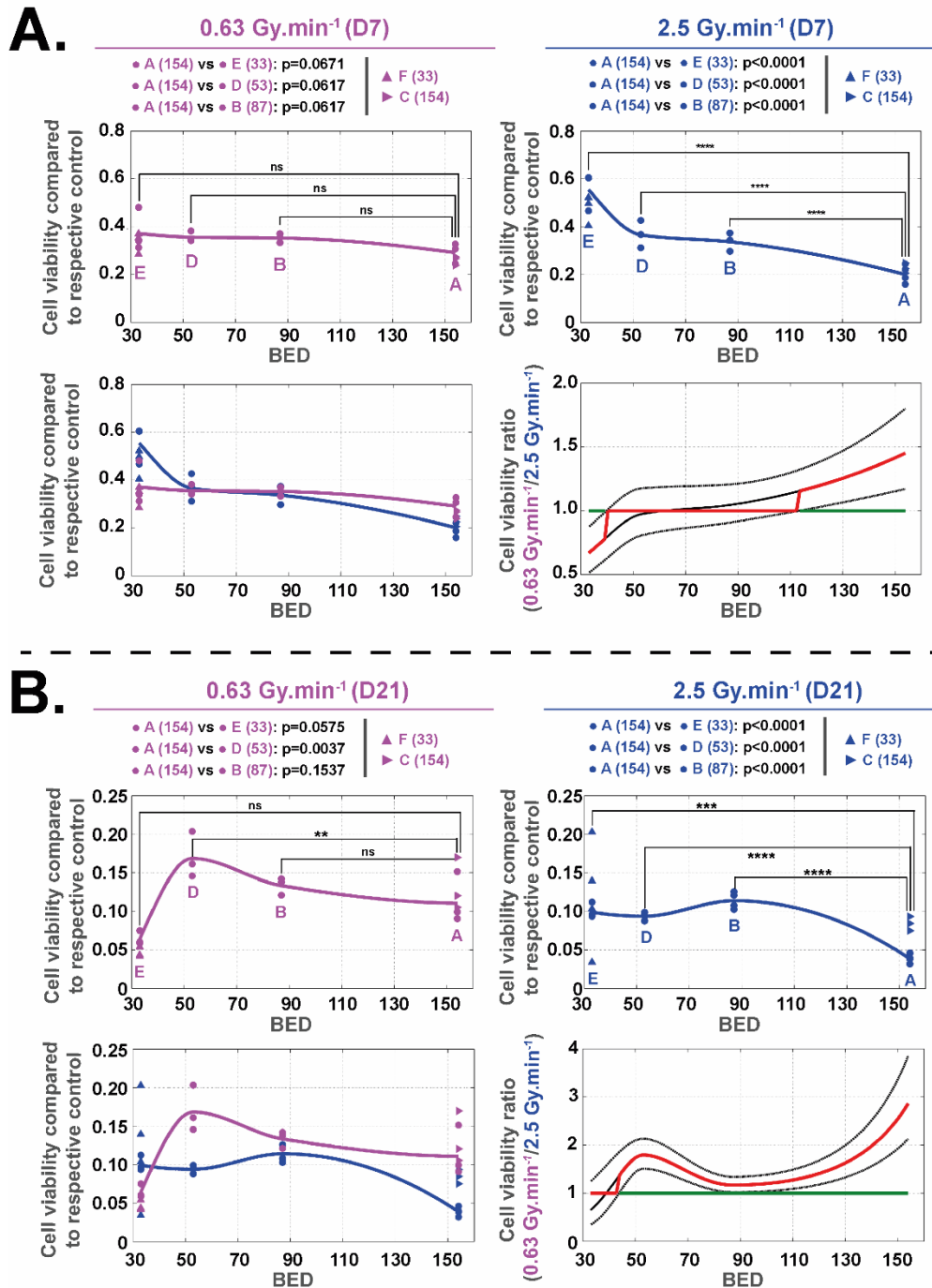


Figure 1 : Viabilité cellulaire relative des HUVECs irradiés à 0,63 et 2,5 Gy/min selon 4 protocoles de fractionnement. Modélisation des viabilités relatives pour les différents protocoles de fractionnement A (1 x 20 Gy), B (2 x 10 Gy), D (4 x 5 Gy) et E (10 x 2 Gy) à J7 (Panel A) et à J21 (Panel B). Les protocoles C (3 x 11 Gy) et F (10 x 2 Gy) sont représentés à titre indicatif. Pour chaque panel (J7 et J21), les ratios de viabilité sont représentés sur le graphique du bas à droite. La ligne verte correspond à la gamme de BED_(3Gy) pour laquelle il existe une différence significative de viabilité relative entre les deux débits de dose (p < 0,001). Chaque courbe représente la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes.

Conclusion : La valeur de BED_(3Gy) a un impact sur la viabilité relative suite à une irradiation au débit de 2,5 Gy/min mais qui n'est pas retrouvé au débit de 0,63 Gy/min. De plus, la viabilité relative des HUVECs est plus importante à 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min pour une BED_(3 Gy) supérieure à 115 Gy et 40 Gy respectivement à J7 et J21.

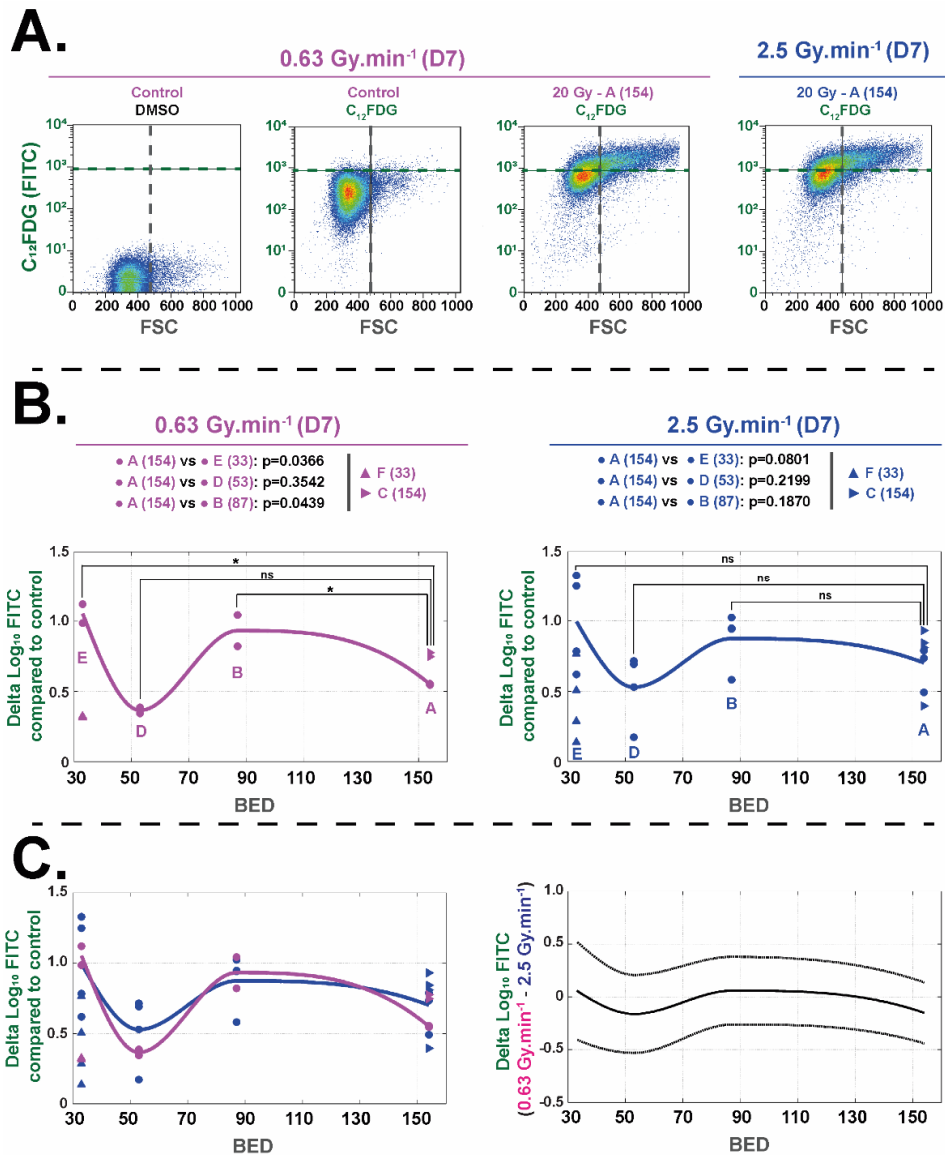


Figure 2 : Analyse par cytométrie en flux de la sénescence (C₁₂FDG). Les HUVECs sont irradiées suivant des protocoles à BED_(3Gy) ≈ 154 Gy (1 x 20 Gy (A)), 87 Gy (2 x 10 Gy (B)), 53 Gy (4 x 5 Gy (D)) et 33 Gy (10 x 2 Gy (E)). Les protocoles C (3 x 11 Gy) et F (10 x 2 Gy) sont représentés à titre indicatif. (A) Exemple de l'analyse bi-paramétrique (taille (FSC)/C₁₂FDG (FITC)) à J7 des HUVECs non irradiées (avec DMSO ou C₁₂FDG), et irradiées à 1 x 20 Gy (A) aux débits de dose de 0,63 ou 2,5 Gy/min, correspondant à une expérience représentative (5x10⁴ cellules vivantes). (B) Représentation de la différence du Log₁₀ (FITC) du centre du nuage de point comparé au contrôle respectif pour les deux débits de dose (0,63 Gy/min (courbe en rose) ou 2,5 Gy/min (courbe en bleu)). La courbe à 2,5 Gy/min correspond à la moyenne de 4 expériences indépendantes et la courbe à 0,63 Gy/min correspond à la moyenne de seulement 2 expériences indépendantes en raison d'un problème technique. (C) Représentation du Log₁₀ (FITC_{0,63} - FITC_{2,5}) en fonction de la BED_(3Gy). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux débits de dose. Les courbes à 0,63 Gy/min et 2,5 Gy/min correspondent respectivement à la moyenne de 2 et 4 expériences indépendantes.

Conclusion : Aucune différence significative de l'activité β-galactosidase des HUVECs n'a été mise en évidence sur l'impact du débit de dose pour des irradiations fractionnées. Cependant, il est à noter que l'analyse statistique a été réalisée sur un n = 2 pour 0,63 Gy/min et n = 4 pour 2,5 Gy/min. L'ajout de réplicats pourrait mettre en évidence une différence significative entre les deux débits de dose.

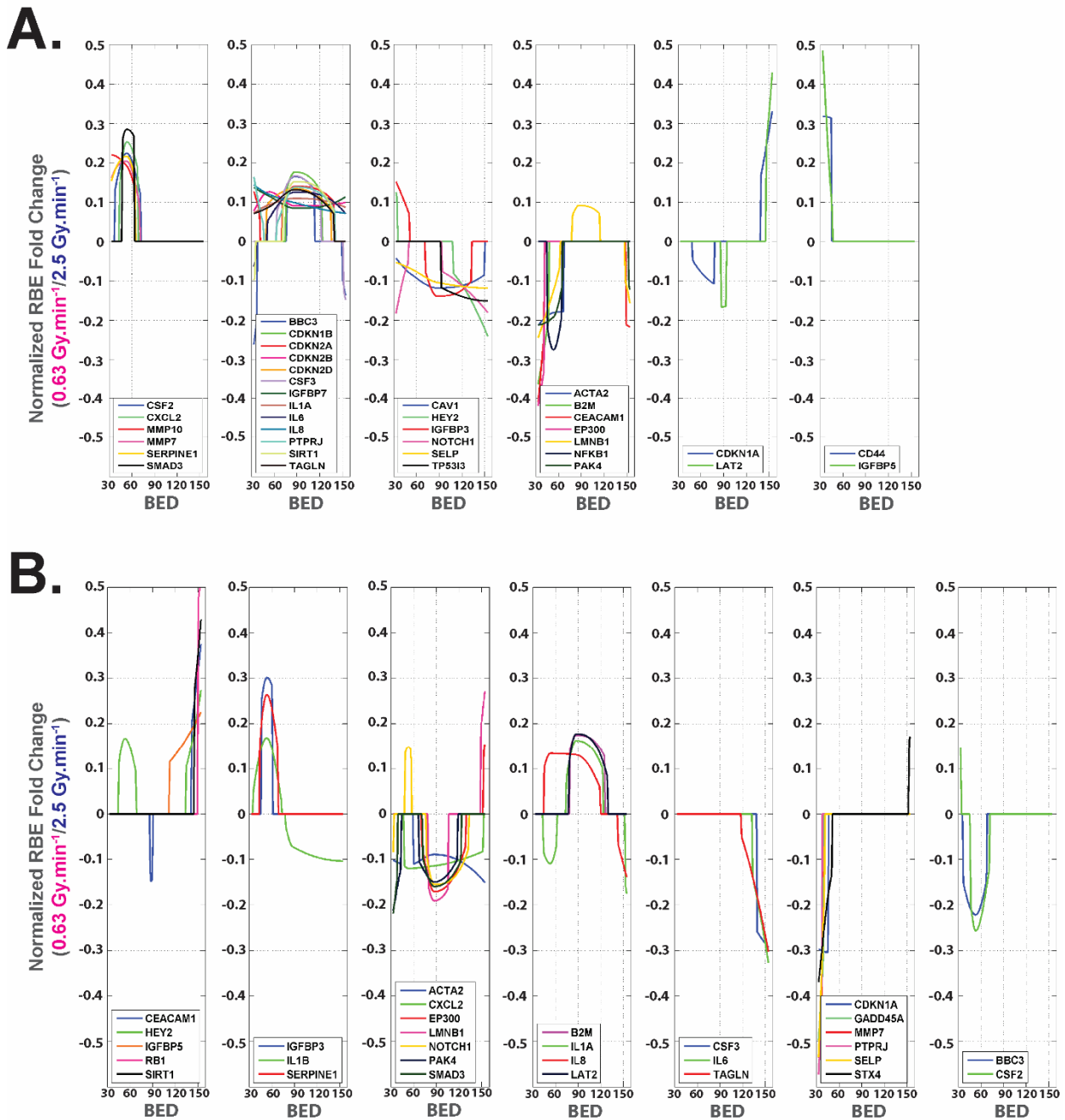


Figure 3 : Clustering de l'expression génique par RT-qPCR. (A) Clusters à J7. Chaque courbe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les gènes sont regroupés en 6 clusters en fonction de leur profil d'expression suivant la $BED_{(3Gy)}$. Seuls les gènes différentiellement exprimés de façon significative sont représentés sur les graphiques (36 gènes sur les 44 mesurés). (B) Clusters à J21. Chaque courbe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les gènes sont regroupés en 7 clusters en fonction de leur profil d'expression suivant la $BED_{(3Gy)}$. Seuls les gènes différentiellement exprimés de façon significative sont représentés sur les graphiques (30 gènes sur les 44 mesurés).

Conclusion : Sur les 44 gènes analysés, 36 et 30 gènes sont différemment exprimés de façon significative entre les deux débits de dose (0,63 et 2,5 Gy/min) respectivement à J7 et J21.

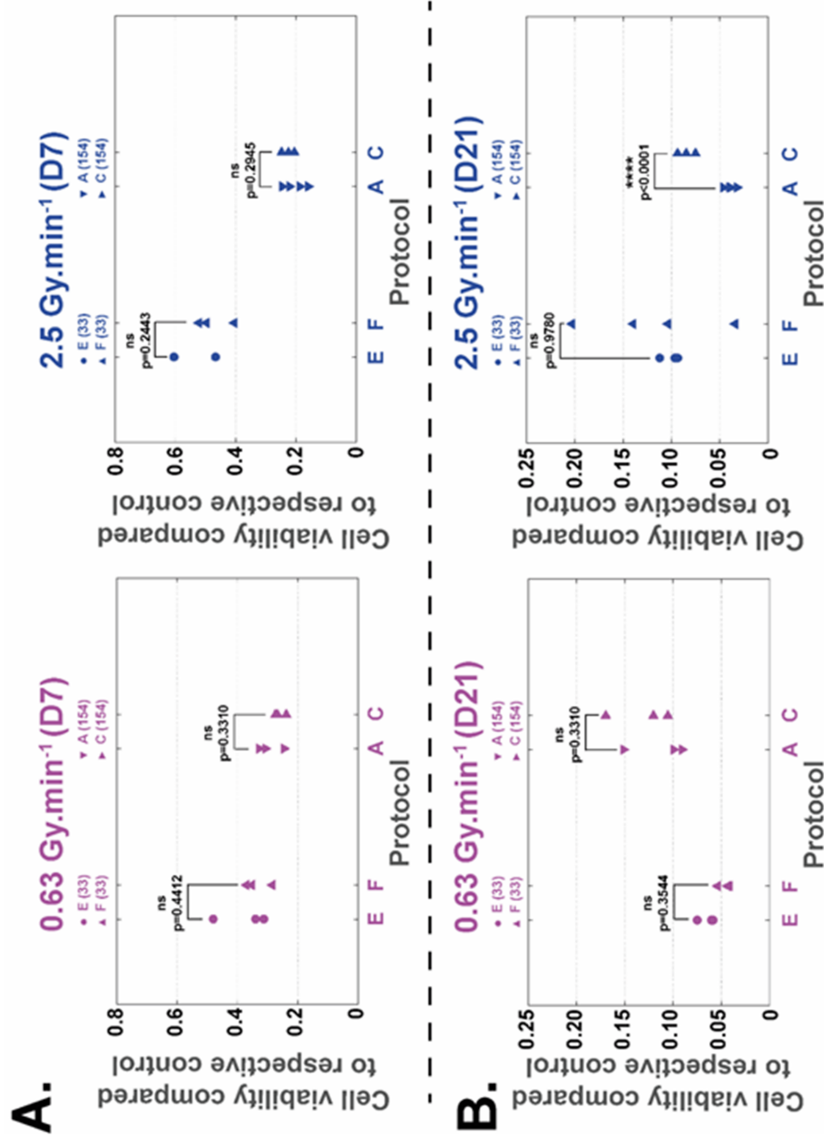


Figure 4 : Viabilité cellulaire relative des HUVECs irradiées selon 2 protocoles de fractionnement ayant une BED_{3Gy} équivalente et pour deux débits de dose. Les mesures de viabilité relative ont été réalisées à J7 (A) et J21 (B) après la dernière fraction d'irradiation. Les HUVECs ont été irradiées à 0,63 (marqueurs roses) et 2,5 Gy/min (marqueurs bleus) pour les protocoles A (1 x 20 Gy) et C (3 x 11 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy ou pour les protocoles E et F (10 x 2 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 33$ Gy. Le dernier changement de milieu a lieu avant la dernière fraction sauf pour le protocole F qui est réalisé après 3 jours. Les variations observées entre les protocoles E et F sont dues à l'impact du décalage du changement de milieu qui sera abordé dans la discussion générale du manuscrit. Chaque marqueur correspond à une expérience indépendante. Chaque condition regroupe les mesures d'au moins 3 expériences indépendantes.

Conclusion : Ces données nous permettent de comparer la viabilité relative entre 2 protocoles ayant une $BED_{(3Gy)}$ équivalente (« A versus C » ou « E versus F ») à débit de dose et temps identiques. Ainsi, le protocole C entraîne une viabilité cellulaire relative significativement supérieure au protocole A à J21 uniquement au débit de dose de 2,5 Gy/min.

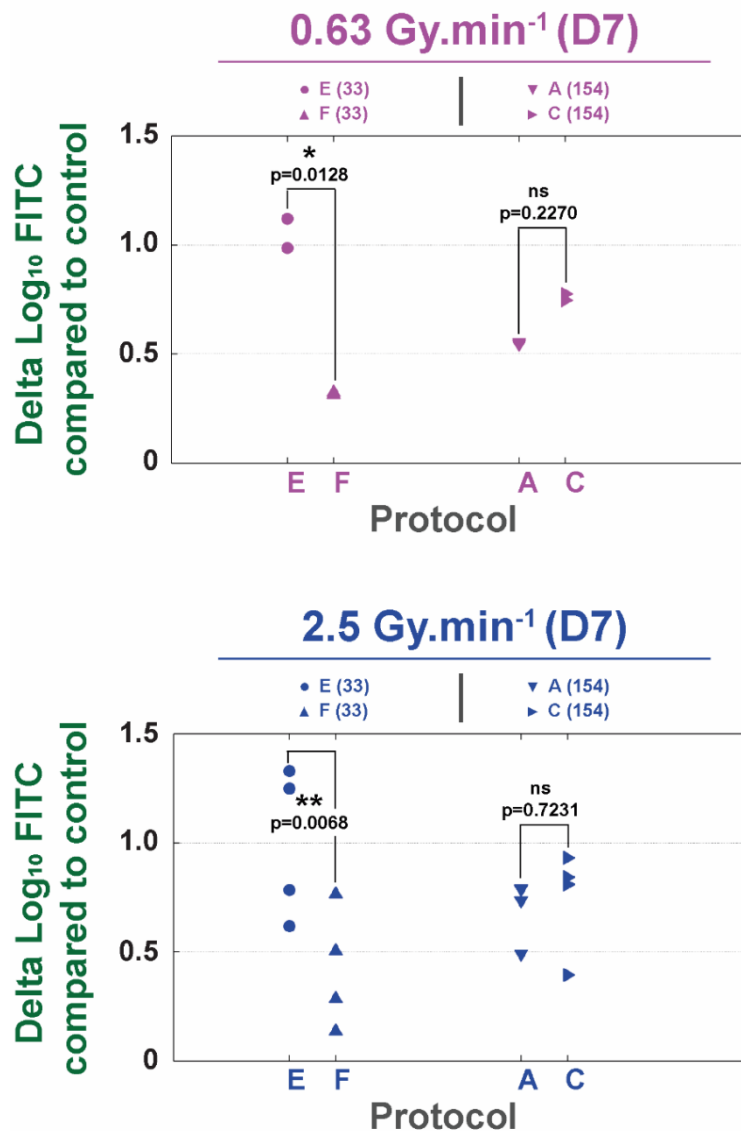


Figure 5 : Analyse par cytométrie en flux de la sénescence (C₁₂FDG) des HUVECs après irradiation selon 2 protocoles de fractionnement à BED_{3Gy} équivalente pour deux débits de dose. Les HUVECs ont été irradiées à 0,63 (marqueurs roses) et 2,5 Gy/min (marqueurs bleus). L'activité β-galactosidase est représentée à travers le Log₁₀(FITC) en fonction du débit de dose pour deux protocoles de fractionnement (A (1 x 20 Gy) et C (3 x 11 Gy)) à BED_(3Gy) équivalente (≈ 154 Gy) et pour les protocoles E et F (10 x 2 Gy) à BED_(3Gy) équivalente (≈ 33 Gy). Le dernier changement de milieu a lieu avant la dernière fraction sauf pour le protocole F qui est réalisé après 3 jours. Les variations observées entre les protocoles E et F sont dues à l'impact du décalage du changement de milieu qui sera abordé dans la discussion générale du manuscrit. Chaque marqueur correspond à une expérience indépendante. Chaque condition regroupe les mesures de 2 ou 4 expériences indépendantes respectivement à 0,63 et 2,5 Gy/min.

Conclusion : Ces données nous permettent de comparer l'activité β-galactosidase entre 2 protocoles ayant une BED_(3Gy) équivalente (« A versus C » ou « E versus F ») à un même débit de dose. Ainsi, aucune différence significative de l'activité β-galactosidase n'a été mise en évidence entre les protocoles A et C quel que soit le débit de dose. Cependant, l'activité β-galactosidase est significativement supérieure pour les cellules irradiées au protocole E par rapport à F quel que soit le débit de dose. Il est à noter que l'analyse statistique a été réalisée sur un n = 2 pour 0,63 Gy/min et n = 4 pour 2,5 Gy/min. L'ajout de réplicats pourrait permettre de mettre en évidence une différence significative entre les protocoles.

		0,63 Gy/min		2,5 Gy/min	
Débit					
Temps		J7	J21	J7	J21
Survie cellulaire	FAS		+		
	BIRC5				
	TP53I3	+		+	
	BBC3				
	NOTCH1			+	
	PAK4				
	PTPRJ (DEP-1)				
Cycle cellulaire et prolifération	CDK1	+	+		
	CDKN1A (p21)				-
	CDKN2A (p16)			+	
	CDKN2D (p19)		-		-
	CDKN1B (p27)				
	CDKN2B (p15)				
	CAV1				+
	RB1				
	TAGLN	-	-	-	+
	EP300				
	GADD45A				
	CD44				+
Inflammation	IL1B				+
	IL6				+
	IL8				
	CSF2	+			
	CSF3			+	
	IL1 α		-		-
Réponse immunitaire (+ adhésion)	LAT2 (NTAL)	+		+	
	STX4				
	SELP	+		+	
	CXCL2		+		+
	CEACAM1			-	+
Remodelage matriciel	ACTA 2		-		
	HEY 2				
	SERPINE1				
	MMP7			+	
	MMP10	+			
Signalisation	B2M				
	NFKB1			+	
	SMAD3				
	SMAD7				
	IGFBP3		-		-
	IGFBP5				+
	IGFBP7			-	
Protéine nucléaire	LMNB1		+	+	
	SIRT1				
Total	44 gènes	8	12	13	13

plus exprimé pour 1 x 20 Gy (A)

plus exprimé pour 3 x 11 Gy (C)

Figure 6 : Récapitulatif des gènes significativement impactés par le protocole d'irradiation à 0,63 et 2,5 Gy/min à J7 et J21 jours post-irradiation. Les 44 gènes étudiés sont impliqués dans différents processus biologiques comme la survie, le cycle, la prolifération, l'inflammation ou encore le remodelage matriciel et correspondent à une signature sénescence déterminée dans le laboratoire. Les couleurs bleue et orange renseignent sur la significativité de l'expression pour chacun des gènes. Chaque condition correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Conclusion : L'analyse statistique à 0,63 Gy/min permet de mettre en évidence 8 et 12 gènes différemment exprimés respectivement à J7 et J21 entre les deux protocoles de fractionnement à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. A 2,5 Gy/min, on observe 13 gènes différemment exprimés entre les deux protocoles à la fois à J7 et J21. A 7 et 21 jours post-irradiation, les gènes impactés par l'irradiation en commun entre les deux débits de dose sont respectivement au nombre de 6 et 7.

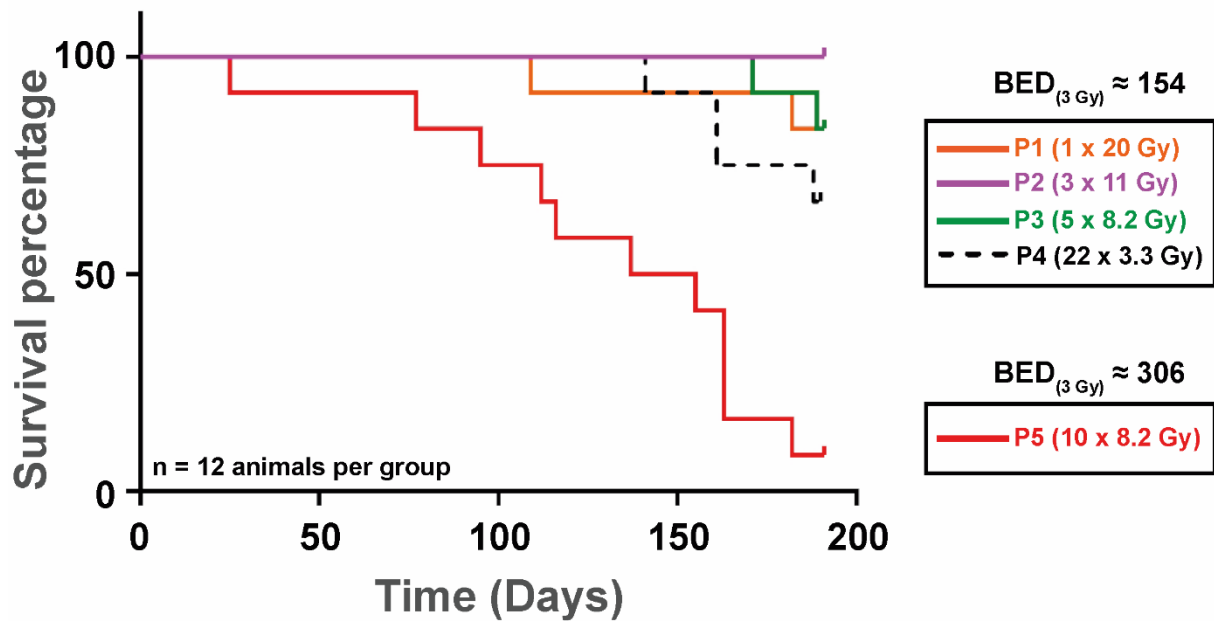


Figure 7 : Courbes de survie pour des souris C57BL/6J irradiées en thorax entier suivant 5 protocoles de fractionnement à 2,5 Gy/min. Les protocoles P1 (1 x 20 Gy, en orange), P2 (3 x 11 Gy, en violet), P3 (5 x 8,2 Gy, en vert) et P4 (22 x 3,3 Gy, en noir) ont une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. Le protocole P5 (10 x 8,2 Gy, en rouge) a une $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy. La survie des animaux a été suivie jusqu'à la fin de notre étude correspondant à l'euthanasie des animaux à 191 jours après l'irradiation. La survie des animaux irradiés au protocole P5 est significativement inférieure aux autres protocoles ($p < 0,001$).

Conclusion : La survie des animaux ne met pas en évidence de différences significatives en fonction du fractionnement de la dose à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. Les souris irradiées au protocole P5 ($BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy) ont une survie significativement inférieure par rapport aux protocoles à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy.

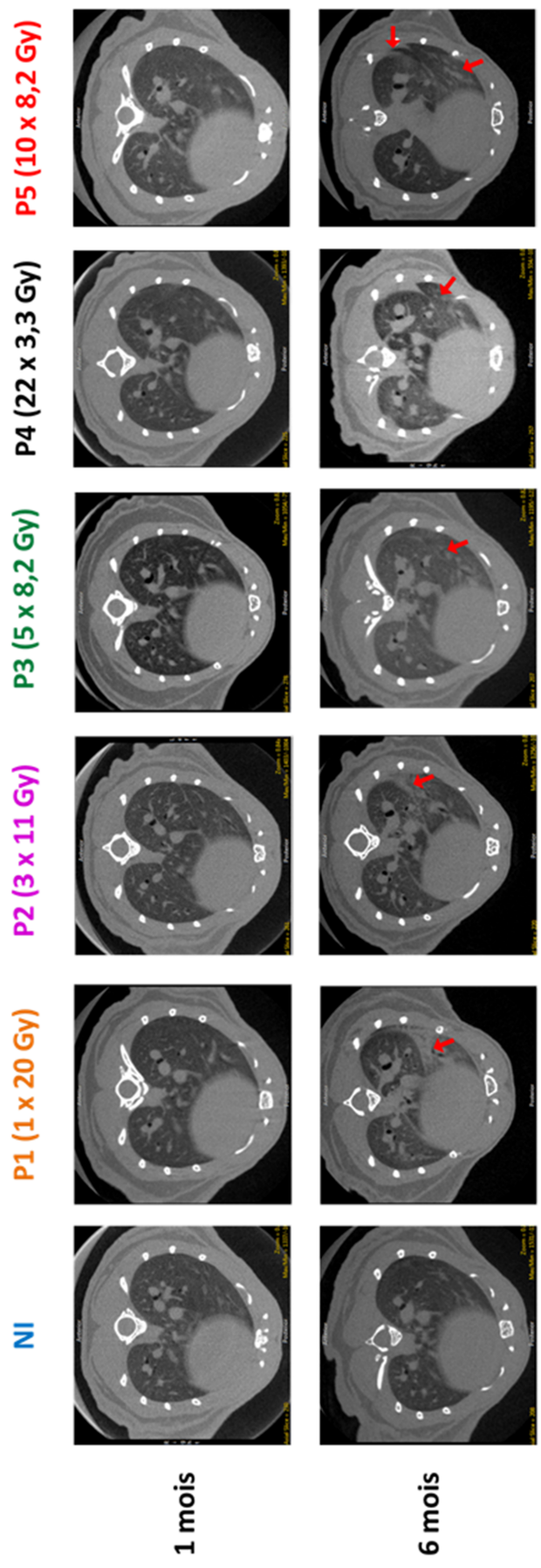


Figure 8 : Images micro-CT de souris C57BL/6J irradiées suivant 5 protocoles de fractionnement à 2,5 Gy/min. Les images montrent une opacification au niveau pulmonaire (flèches en rouge) en fonction du protocole de fractionnement. Chaque image correspond à une image représentative d'un groupe entre 9 et 12 souris (sauf pour le point 6 mois au protocole P5, l'image venant de la seule souris survivante).

Conclusion : L'opacification des poumons semble légèrement plus importante à 6 mois par rapport à 1 mois quel que soit le protocole de fractionnement.

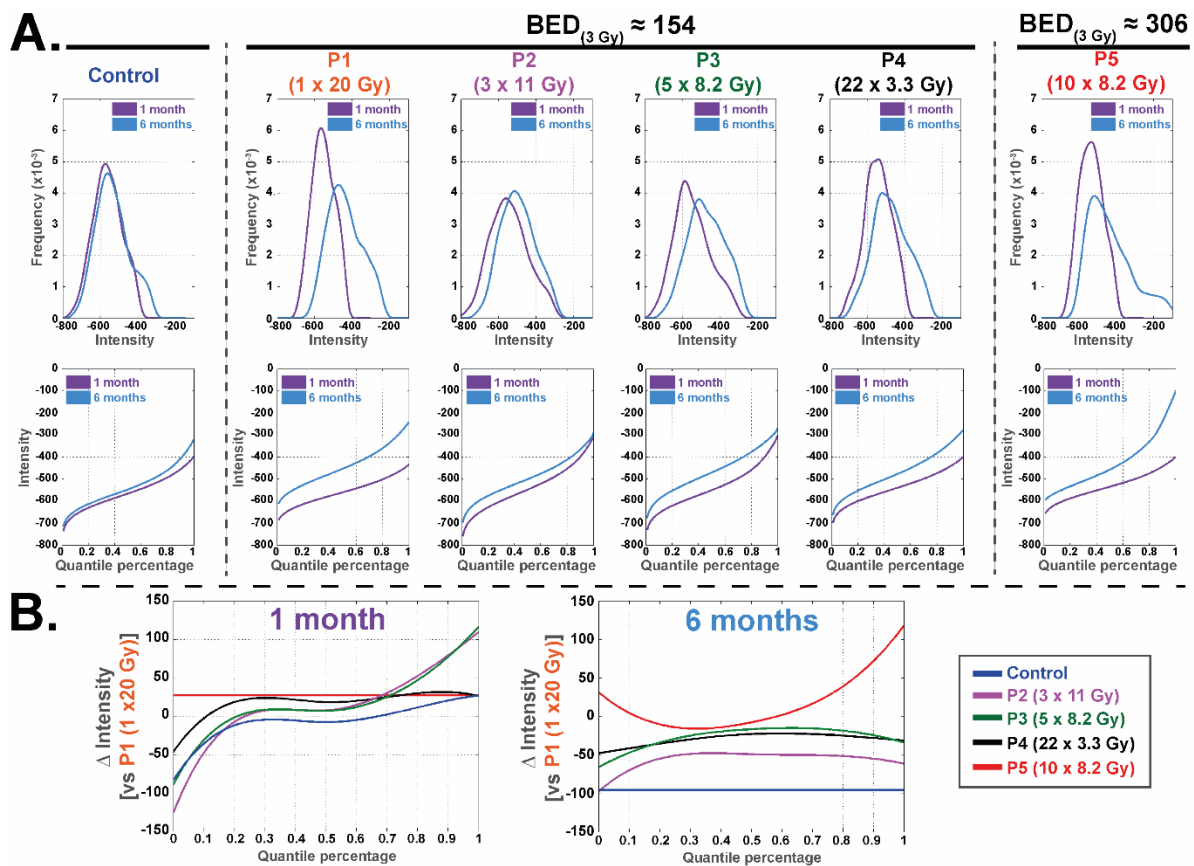


Figure 9 : Intensité HU des scanners de poumons de souris C57BL/6J irradiées suivant 5 protocoles de fractionnement à 2,5 Gy/min. Les souris ont été irradiées aux protocoles P1 (1 x 20 Gy), P2 (3 x 11 Gy), P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy et au protocole P5 (10 x 8,2 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy. (A) Ligne supérieure : Représentation de la fréquence de distribution des intensités HU pour chaque protocole de fractionnement à 1 (courbe violette) et 6 mois (courbe bleue). Ligne inférieure : Représentation de la différence de distribution de l'intensité HU des différents protocoles par rapport au protocole P1 (1 x 20 Gy) pour tous les quantiles à 1 (courbe violette) et 6 mois (courbe bleue). (B) Représentation de la différence de distribution de l'intensité HU en fonction des quantiles pour chacun des protocoles (P2 à P5) par rapport au protocole P1.

Conclusion : Pour une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy, le protocole P1 (1 x 20 Gy) est le plus délétère car il induit une opacification plus importante que les autres protocoles de fractionnement que ce soit à 1 ou 6 mois après l'irradiation. Ces résultats permettent de classer les protocoles à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy des plus délétères au moins délétère seulement à 6 mois post-irradiation. Ainsi, le protocole P1 (1 x 20 Gy) est le plus délétère suivi des protocoles P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) qui ne présentent pas de différences significatives entre eux et enfin le protocole P2 (3 x 11 Gy) qui est le moins délétère. Le protocole P5 (10 x 8,2 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy est significativement plus délétère que les autres protocoles.

Figures supplémentaires

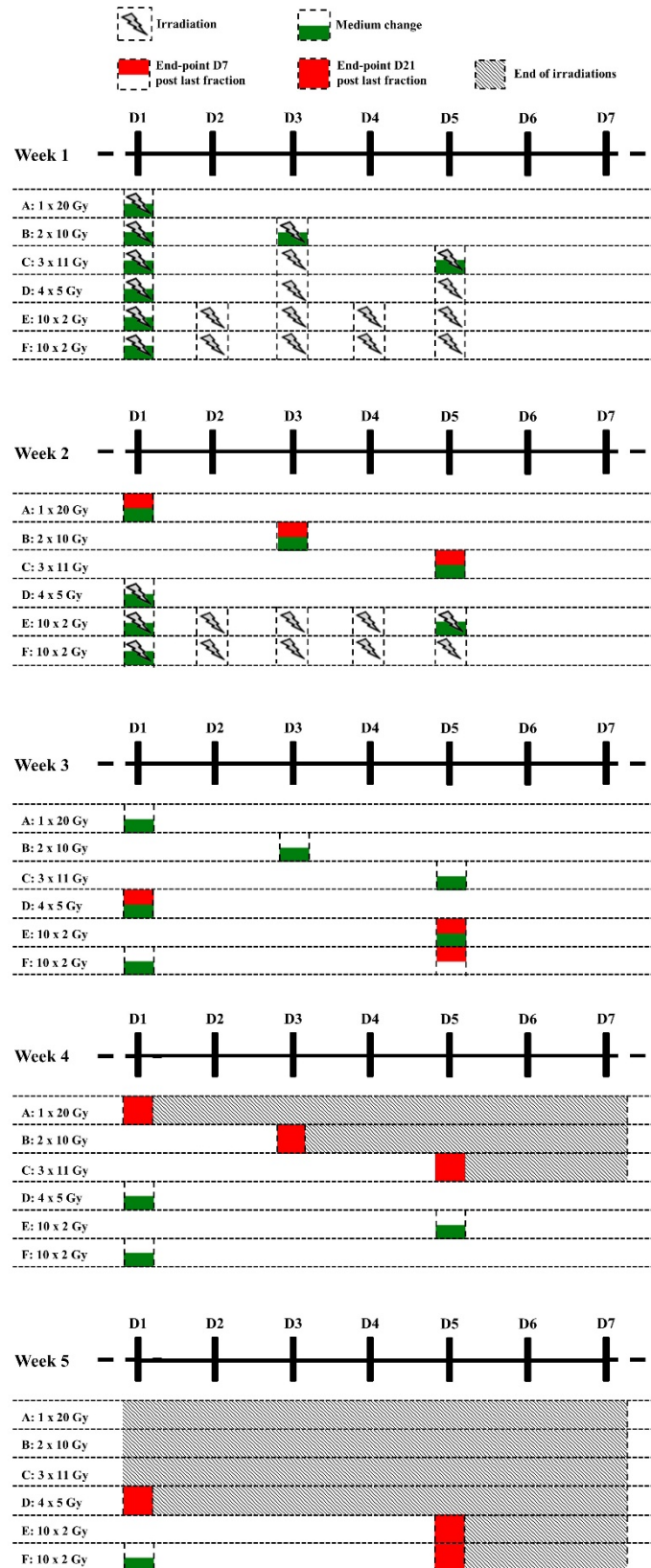


Figure S1 : Détails des protocoles d'irradiations fractionnées *in vitro* pour les HUVECs. Les HUVECs sont irradiées selon 6 protocoles de fractionnements : A (1 x 20 Gy), B (2 x 10 Gy), D (4 x 5 Gy), E et F (10 x 2 Gy) à dose totale équivalente de 20 Gy ; et C (3 x 11 Gy) à BED_(3Gy) équivalente au protocole A. La différence entre les protocoles E et F correspond au changement du milieu pendant les irradiations puisque les cellules irradiées au protocole E ont un changement de milieu avant la dernière fraction d'irradiation contrairement aux cellules irradiées selon le protocole F qui ont un changement de milieu 3 jours après leur dernière fraction d'irradiation. Pour les mesures allant jusqu'à 21 jours post-irradiation, le changement de milieu a lieu tous les 7 jours suivant le dernier changement de milieu.

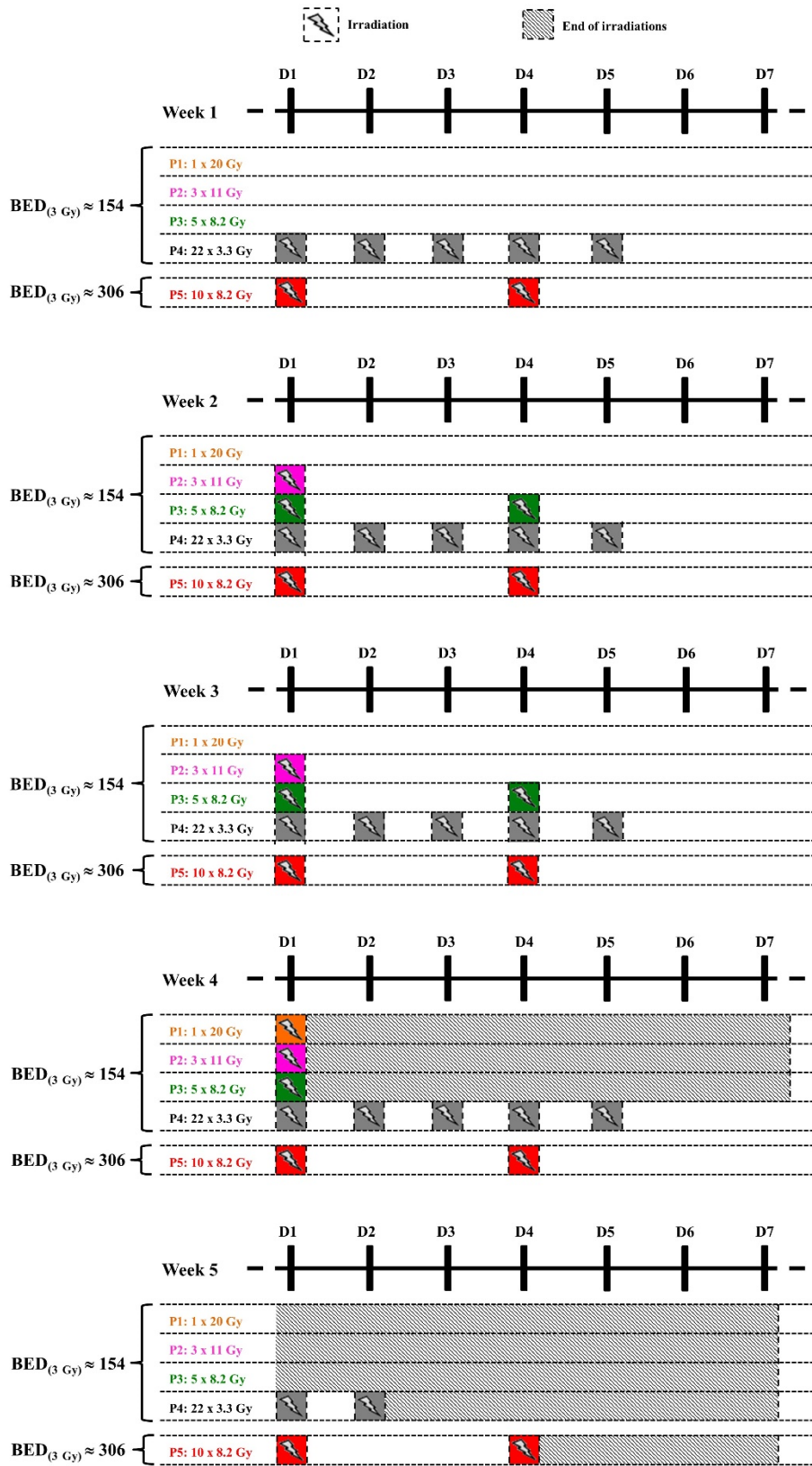


Figure S2 : Détails des protocoles d'irradiations fractionnées *in vivo* chez des souris C57BL/6J. Les souris sont irradiées suivant 5 protocoles de fractionnements : P1 (1 x 20 Gy), P2 (3 x 11 Gy), P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy et P5 (10 x 5,8 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy. Les souris sont euthanasiées à 1 et 6 mois après la dernière fraction d'irradiation.

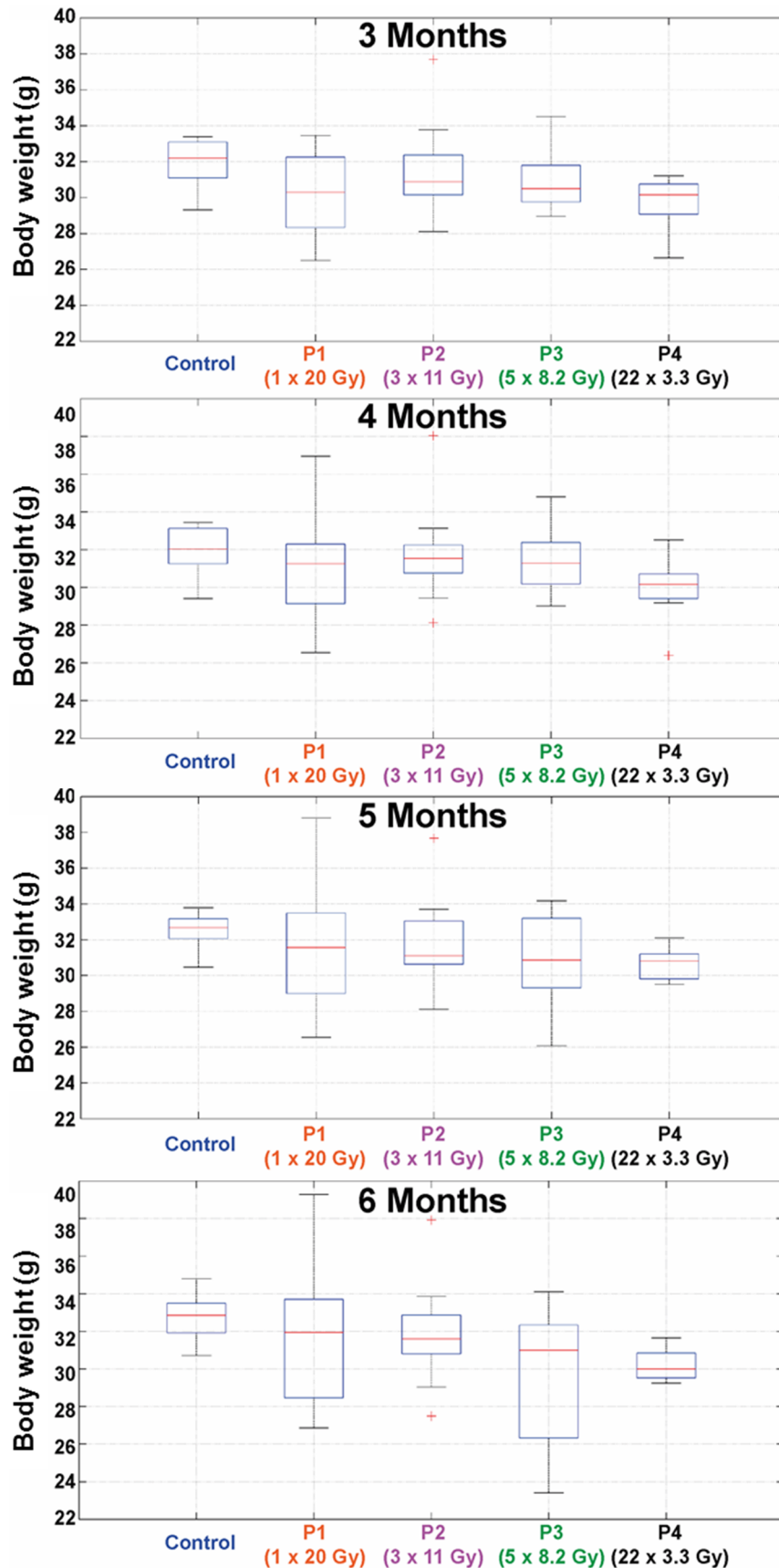


Figure S3 : Suivi de la variation du poids des souris C57BL/6J après irradiation entre 3 et 6 mois post-irradiation. Les souris ont été irradiées à 2,5 Gy/min suivant 5 protocoles de fractionnements : P1 (1 x 20 Gy), P2 (3 x 11 Gy), P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. Le poids a été suivi entre 3 et 6 mois post-irradiation. Pour chaque groupe, la variation du poids a été représentée par l'intermédiaire d'un diagramme en boîte.

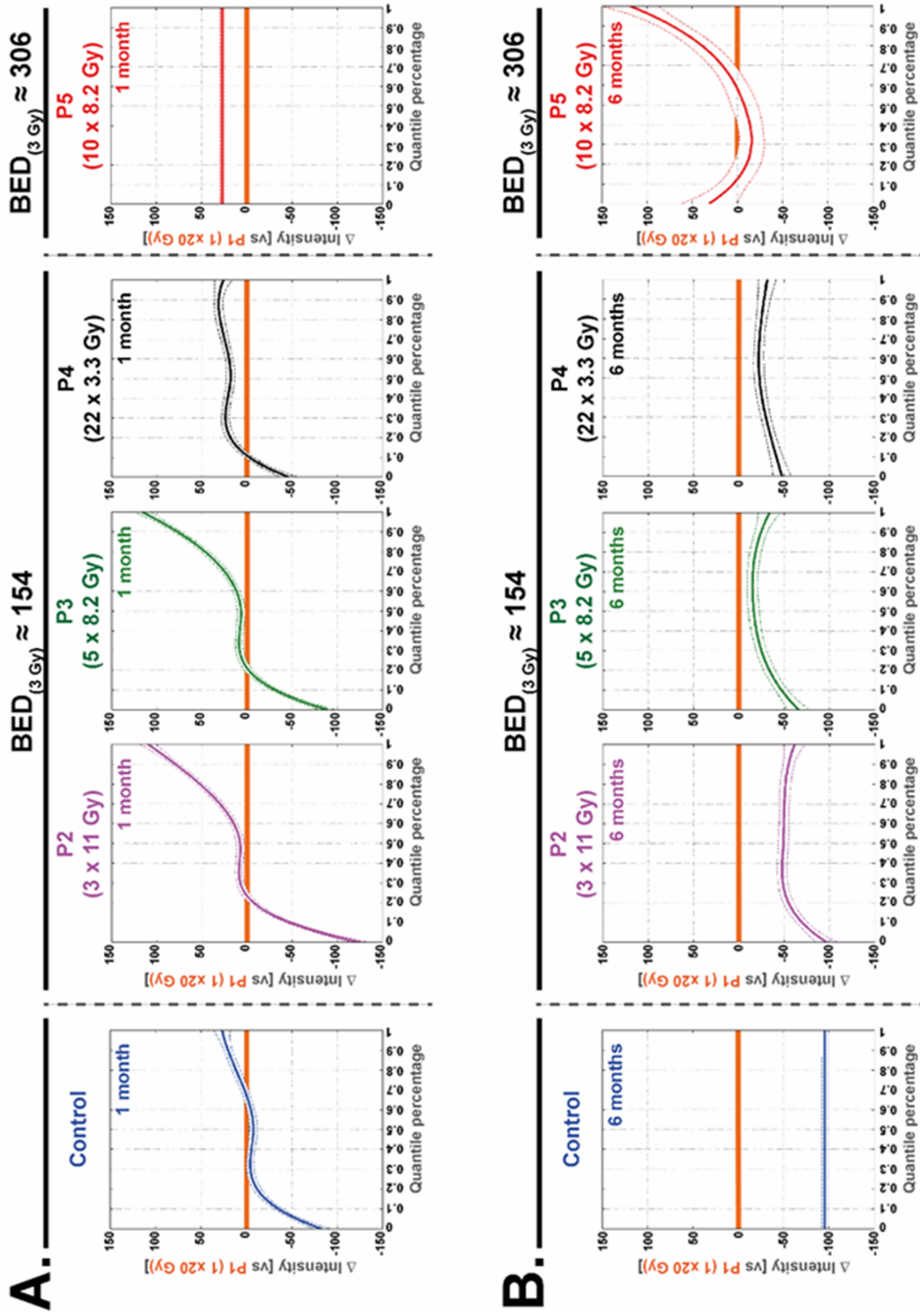


Figure S4 : Variation de l'intensité des HU extra-irradiées suivant 5 protocoles de fractionnement à 2,5 Gy/min. Les souris ont été irradiées aux protocoles P1 (1 x 20 Gy), P2 (3 x 11 Gy), P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy et au protocole P5 (10 x 8,2 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy. La différence de distribution de l'intensité HU en fonction des quantiles pour chacun des protocoles (P2 à P5) par rapport au protocole P1 a été représentée à 1 mois (A) et 6 mois (B) post-irradiation. La ligne horizontale orange correspond à l'intervalle de quantiles pour lesquels la différence est significative ($p < 0,001$).

		0,63 Gy/min		2,5 Gy/min	
Débit					
Temps		J7	J21	J7	J21
Survie cellulaire	FAS				
	BIRC5				
	TP53I3				
	BBC3				
	NOTCH1				
	PAK4				
	PTPRJ (DEP-1)				
Cycle cellulaire et prolifération	CDK1				
	CDKN1A (p21)				
	CDKN2A (p16)				
	CDKN2D (p19)				
	CDKN1B (p27)				
	CDKN2B (p15)				
	CAV1				
	RB1				
	TAGLN				
	EP300				
	GADD45A				
	CD44				
	Inflammation	IL1B			
IL6					
IL8					
CSF2					
CSF3					
Réponse immunitaire et adhésion cellulaire	IL1α				
	LAT2 (NTAL)				
	STX4				
	SELP				
	CXCL2				
Remodelage matriciel	CEACAM1				
	ACTA 2				
	HEY 2				
	SERPINE1				
	MMP7				
Signalisation	MMP10				
	B2M				
	NFKB1				
	SMAD3				
	SMAD7				
	IGFBP3				
	IGFBP5				
IGFBP7					
Protéine nucléaire	LMNB1				
	SIRT1				
Total	44 gènes	16	19	12	10

plus exprimé pour 10 x 2 Gy (E)

plus exprimé pour 10 x 2 Gy (F)

Figure S5 : Récapitulatif des gènes significativement impactés par le protocole d'irradiation à 0,63 et 2,5 Gy/min J7 et J21 post-irradiation. Les 44 gènes étudiés sont impliqués dans différents processus biologiques comme la survie, le cycle, la prolifération, l'inflammation ou encore le remodelage matriciel et correspondent à une signature sénescence déterminée dans le laboratoire. Les couleurs bleue et orange renseignent sur la significativité de l'expression pour chacun des gènes. Chaque condition correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

<i>In vitro</i>	Number of fraction(s)	Dose per fraction (Gy)	α/β	BED
	1	20	3	153.33
	2	10	3	86.67
	4	5	3	53.33
	10	2	3	33.33
3	11	3	154.00	

<i>In vivo</i>	Number of fraction(s)	Dose per fraction (Gy)	α/β	BED
	1	20	3	153.33
	3	11	3	154.00
	5	8.2	3	153.07
	22	3.3	3	152.46
	10	8.2	3	306.13

Table I : Valeurs de $BED_{(3Gy)}$ *in vitro* et *in vivo*

	$BED_{(3 Gy)} \approx 154$				$BED_{(3 Gy)} \approx 306$
	P1	P2	P3	P4	P5
	[1 x 20 Gy]	[3 x 11 Gy]	[5 x 8,2 Gy]	[22 x 3,3 Gy]	[10 x 8,2 Gy]
Day of death after irradiation	109	191 (Ep)	171	141	25
	182	191 (Ep)	189	161	77
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	161	95
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	188	112
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	116
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	137
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	155
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	163
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	163
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	182
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)
	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)	191 (Ep)

(Ep): End-point

Table II : Données chiffrées issues des courbes de survie à 6 mois des groupes d'animaux irradiés selon 5 protocoles de fractionnement. Chacun des groupes est constitué de 12 souris C57BL/6J. La survie des animaux a été suivie jusqu'à la fin de notre étude correspondant à l'euthanasie des animaux à 191 jours après l'irradiation (End-point).

Discussion & Perspectives

Au cours de cette discussion, nous nous intéresserons d'abord au choix du modèle cellulaire *in vitro* ainsi qu'à la gamme de dose étudiée. Nous aborderons également la méthode d'irradiation utilisée pour faire varier le débit de dose. Nous discuterons ensuite les données obtenues sur l'impact du débit de dose à la fois *in vitro* et *in vivo* suite à une irradiation en dose unique et fractionnée. Nous aborderons alors l'intérêt de notre étude pour la prédiction du risque des techniques émergentes de radiothérapie utilisant des rayons X, notamment au travers de travaux réalisés au laboratoire et qui s'intéressent à l'impact de l'énergie du rayonnement sur la réponse biologique *in vitro*. A cette réflexion, nous élargirons l'intérêt de l'approche que nous avons développé pour d'autres modalités d'irradiations.

A. Choix du modèle d'étude et de la gamme de dose *in vitro*

Peu d'études se sont intéressées aux réponses radio-induites de cellules humaines primaires saines. Aussi la majorité des études se focalisant sur la réponse radio-induite des cellules cancéreuses (Lohse et al., 2011; Sorensen et al., 2011; Karan et al., 2013; King et al., 2013; Verbakel et al., 2013; Oktaria et al., 2017; Terashima et al., 2017), il a été montré que la réponse radio-induite dépend fortement du type cellulaire utilisé au cours d'une étude. En effet, parmi les équipes qui s'intéressent à l'impact d'une variation du débit de dose sur la réponse cellulaire, la valeur de l'EBR peut par exemple varier de 1 à 1,5 respectivement pour les cellules humaines d'un cancer pulmonaire NSCLC (H460) (Karan et al., 2013) ou d'un adénocarcinome de sein (MCF-7) (Oktaria et al., 2017) lorsque le débit de dose varie (de 3,61 à 10,84 Gy/min pour les H460 et de 0,5 à 5 Gy/min pour les MCF-7). Ces études soulignent l'influence du type cellulaire choisi pour le calcul de la valeur de l'EBR, surtout dans le cas de cellules cancéreuses pouvant présenter des radiosensibilités très différentes à un même rayonnement.

Il est largement décrit dans la littérature que le compartiment vasculaire, et plus particulièrement l'endothélium, joue un rôle important dans l'initiation et le développement des lésions radio-induites aux tissus sains (Milliat et al., 2008) notamment au niveau pulmonaire (Santana et al., 1996; Citrin et al., 2013) mais aussi intestinal (Paris et al., 2001; Corre et al., 2013). En effet, il a été montré que l'irradiation affecte la plupart des fonctions de l'endothélium en induisant l'apoptose (Paris et al., 2001; Panganiban et al., 2013) ou encore des processus inflammatoires (Milliat et al., 2008) conduisant à la fibrose (Milliat et al., 2006). Les cellules endothéliales (CE) sont alors un bon modèle d'étude étant donné leur implication dans les lésions radio-induites. Afin de guider notre choix sur le meilleur modèle de CE, un précédent travail de thèse (en cours de publication) réalisé au laboratoire s'est intéressé à la sénescence endothéliale radio-induite au niveau transcriptionnel sur 6 lignées de CE humaines primaires.

Ainsi ont été retenues : des CE humaines primaires de veine de cordon ombilical (HUVECs, *primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), microvasculaires de poumon (HMVEC-L, *Human Lung Microvascular Endothelial Cells*), microvasculaires de derme (HMVEC-D, *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*), microvasculaires de cœur (HMVEC-C, *Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells*), d'artère pulmonaire (HPAEC, *Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*) et microvasculaires d'intestin (HIMECs, *Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells*). Des mesures d'expression génique de 44 gènes impliqués dans différents processus biologiques comme la viabilité, le cycle cellulaire, la sénescence, l'inflammation, la réponse immunitaire ou encore le remodelage matriciel ont donc été réalisées suite à des irradiations avec des rayons X de haute énergie (4MV). Ces 44 gènes constituent la « signature sénescence » utilisé pour les mesures d'expression génique des travaux de thèse (Annexe 1). La concordance de réponse à l'irradiation entre chaque lignée a été évaluée en comparaison aux 5 autres lignées. Ainsi, il a été possible de déterminer le coefficient de concordance de Lin pour chaque type de CE vis-à-vis des autres. Ce coefficient est le reflet de la capacité d'un type de CE à regrouper la réponse radio-induite de l'ensemble des types de CE de l'étude. Ainsi, ces données ont révélé un coefficient de concordance plus importante pour les HUVECs ce qui suggère que ces dernières récapituleraient et engloberaient l'ensemble de la réponse de ces cellules endothéliales à l'irradiation. Pour ces raisons, nous avons donc retenu les HUVECs comme modèle d'étude *in vitro* afin de nous placer à la fois dans des conditions favorables en termes de réponse cellulaire pouvant être induite, mais aussi en termes de pertinence biologique par rapport aux données cliniques. Néanmoins, la réponse radio-induite, notamment la sénescence, a également été décrite dans plusieurs études portant sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines (HMVEC-L) (Heo et al., 2016; Lafargue et al., 2017). Aussi, afin de vérifier et conforter les mesures biologiques obtenues *in vitro* sur le modèle HUVECs, nous avons également réalisé quelques mesures biologiques en dose unique sur des HMVEC-L, à savoir des mesures de viabilité cellulaire et de sénescence.

Par ailleurs, l'irradiation est connue pour induire une augmentation de la perméabilité vasculaire caractérisée par le passage de l'albumine au niveau transcellulaire pour des doses uniques comprises entre 2 et 50 Gy (Park et al., 2016). De plus, les doses par fraction délivrées par les protocoles d'hypofractionnement utilisés en clinique peuvent aller jusqu'à 20 Gy (Zaorsky et al., 2013; Beckta et al., 2019). Ainsi, dans notre étude, nous avons choisis de réaliser des irradiations sur une large gamme de dose (de 0 à 20 Gy) à la fois *in vitro* et *in vivo*, ceci afin de se placer encore une fois au plus près des données de la littérature et des pratiques cliniques.

B. Variation du débit de dose lors d'une irradiation

Pour la majorité des études, l'augmentation du débit de dose se fait généralement par le retrait du filtre égalisateur (Lohse et al., 2011; Karan et al., 2013; Verbakel et al., 2013). Pour rappel, le cône égalisateur permet d'aplatir le profil de dose afin d'assurer un dépôt de dose homogène (Sharma, 2011). Dans une autre étude, l'énergie a également été modifiée afin d'obtenir deux débits de dose différents pour comparer leurs effets *in vitro* (Verbakel et al., 2013). Ainsi, les résultats observés ne peuvent être considérés comme le simple reflet d'une variation de débit de dose au sens strict puisque la filtration et l'énergie ont également été modifiées. De plus, le rayonnement sans filtre égalisateur (FFF) est inhomogène mais peut être considéré comme homogène si nous nous intéressons à une petite surface d'irradiation. Au cours des travaux de thèse, nous avons décidé d'utiliser des rayonnements avec filtre égalisateur (FF) afin d'avoir une surface d'irradiation importante de 30 x 30 cm² nous permettant d'irradier plusieurs boîtes de culture (jusqu'à 12 T25 et/ou 6 T75 par tir) de manière simultanée en faisceau homogène. Pour faire varier le débit de dose, le nombre de pulse a été ajusté en changeant le moins possible la distance entre la table d'irradiation et la source. En effet, Haff *et al.* ont démontré une variation importante dans le dépôt de la dose en fonction de la distance de la table où se trouve l'échantillon par rapport à la source d'irradiation pour les photons de basses énergies (Haff et al., 2016). En effet, plus la distance de l'échantillon par rapport à la source augmente, plus l'atténuation du rayonnement est importante ce qui explique une différence de distribution de la dose sur l'échantillon (Haff et al., 2016). Même si la distance de l'échantillon aurait un impact moindre en termes de variation de dépôt de dose pour les photons de haute énergie tels que ceux utilisés dans notre étude, nous avons néanmoins décidé de jouer uniquement sur le nombre de pulses afin de faire varier le débit de dose dans nos expériences.

C. Impact du débit de dose sur la réponse radio-induite

De nos jours, peu d'études ont été menées sur les effets biologiques dus à une variation de débit de dose pour les rayons X de haute énergie tels que ceux utilisés en clinique. De plus, la plupart des études s'intéressent à l'impact du débit de dose sur des cellules cancéreuses et, à ma connaissance, aucune recherche n'a été menée sur des cultures primaires humaines dans des gammes de débits de dose utilisés en clinique. Selon la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR), l'EBR est estimée à 1 pour des photons dont les énergies sont comprises entre 0,1 et 3 MeV (Valentin, 2003). La CIPR estime pourtant que la dose par fraction, le débit

de dose ainsi que le TEL ont un impact sur la réponse radio-induite. Cependant, ce postulat sous-entend que les effets radio-induits sont considérés comme identiques quel que soit le débit de dose utilisé au cours de l'irradiation. Nous avons donc décidé de vérifier expérimentalement cette valeur d'EBR en utilisant un rayonnement X de référence à 4 MV (1,3 MeV en énergie moyenne) à un débit de dose de 0,63 Gy/min. L'exposition d'intérêt correspondant quant à elle à un rayonnement X de même énergie mais au débit de dose de 2,5 Gy/min (proche de celui utilisé en clinique pour un traitement conventionnel de radiothérapie). En effet, la valeur d'EBR des photons sert de référence en clinique pour comparer l'efficacité des autres types de rayonnements (proton, carbone ...). Elle permet de définir la dose clinique à administrer au patient lorsqu'un autre type de rayonnement est utilisé. Il est ainsi primordial que sa valeur soit la plus précise possible afin d'éviter des extrapolations erronées pouvant conduire à une surestimation ou sous-estimation de la dose au niveau du tissu sain ou tumoral respectivement.

1. Irradiation en dose unique *in vitro* et *in vivo*

Le test de clonogénicité, considéré comme le « gold standard » pour évaluer l'EBR d'un rayonnement d'intérêt par rapport à un rayonnement de référence (Puck & Marcus, 1956), nous a permis de mettre en évidence une différence significative entre les deux débits de dose utilisés (0,63 Gy/min et 2,5 Gy/min) pour des doses comprises entre 1 et 4 Gy sur des HUVECs (Ben Kacem et al.). Si on considère le critère de survie clonogénique, la valeur d'EBR varie de 1,11 à 1,21 ce qui correspond à une efficacité de 11 à 21 % plus importante pour le débit de 2,5 Gy/min par rapport à 0,63 Gy/min (Ben Kacem et al.). En revanche, les HMVEC-L ont montré une incapacité à proliférer en conditions clonales. En effet, ces cellules ont besoin d'une densité d'ensemencement 2 fois supérieure aux HUVECs (6700 cellules/cm² contrairement à 3000 cellules/cm² (Dos Santos et al., 2018; Paget et al., 2019)) pour proliférer dans des conditions normales. Ces données viennent conforter les différentes études soulevant les différentes limites du test de clonogénicité (Pomp et al., 1996; Kirkpatrick et al., 2008; Kirkpatrick et al., 2009). Pomp *et al.* ont comparé les fractions survivantes de différents types de cellules humaines (fibroblastes et cellules de mélanome) et ont démontré l'importance de déterminer une valeur d'efficacité d'ensemencement (PE, *plating efficiency*) fiable pour valider les données de survie clonogénique obtenues (Pomp et al., 1996). La PE est définie par le rapport du nombre de colonies formées par rapport au nombre de cellulesensemencées (Franken et al., 2006). Par ailleurs, pour d'autres auteurs, ce test est inapproprié aux fortes doses par fraction (Kirkpatrick et al., 2008) (cas de l'hypofractionnement important et de la radiochirurgie). De plus, l'interaction cellule-cellule est importante dans les processus de

réponse à l'irradiation (Prise et al., 2005; Bentzen, 2006). Les réponses des cellules endothéliales suite à une irradiation peuvent être très variées comme l'induction de l'apoptose (Santana et al., 1996; Paris et al., 2001; Guipaud et al., 2018), l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-coagulant (Molla & Panes, 2007; Guipaud et al., 2018), l'induction de la sénescence (Oh et al., 2001; Panganiban et al., 2013; Kim et al., 2014) ou encore d'une transition endothélio-mésenchymateuse (Kim et al., 2013; Mintet et al., 2015). Or, le test de clonogénicité ne prend pas en compte et ne nous renseigne absolument pas sur le phénotype des cellules survivantes, qui peuvent cependant, après irradiation, fortement impacter leur microenvironnement. Pour ces raisons, nous avons décidé dans notre approche de compléter par d'autres mesures biologiques la mesure « classique » d'EBR réalisée avec le test de clonogénicité. Le but étant de prendre en considération un nombre suffisant d'informations biologiques afin d'évaluer de manière plus précise le risque d'entraîner des effets délétères sur les tissus sains post-irradiation. Nous nous sommes donc intéressés à la mesure de la viabilité cellulaire par comptage bleu trypan à la cellule de Malassez. De manière générale, la viabilité relative des HUVECs est plus importante à 0,63 Gy/min qu'à 2,5 Gy/min à dose et temps identiques (Ben Kacem et al.). Ces résultats sont confirmés par l'observation et l'acquisition d'images des tapis cellulaires (HUVECs) après l'irradiation (Annexe 2). De plus, dans une moindre mesure, ces observations sont retrouvées avec la même tendance sur les HMVEC-L.

Afin de compléter ces données de viabilité cellulaire, nous nous sommes également intéressés à la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Cette dernière est impactée par une variation du débit de dose pour ces deux types de cellules endothéliales. En effet, la proportion de cellules en phases S est significativement plus importante à 2,5 Gy/min par rapport à 0,63 Gy/min que ce soit pour les HUVECs ou les HMVEC-L. Il est probable que cette proportion de cellules en phase S soit bloquée dans le cycle au moment de la réplication de l'ADN en raison de dommages radio-induits plus importants au plus fort débit de dose (Turner et al., 2015). Il est aussi envisageable que les cellules irradiées à 2,5 Gy/min aient plus de dommages complexes (cassures double brins). Sachant que les DSBs sont corrélées à la phosphorylation de la sous-unité H2Ax des histones, il serait intéressant de réaliser des marquages γ -H2Ax afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse (Redon et al., 2009). Cependant, cette technique est limitée. En effet, une étude a montré, pour une même dose, un nombre de foyers γ -H2Ax différent en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule irradiée (Kato et al., 2008). Ainsi, il a été mis en évidence un nombre de foyers γ -H2Ax deux fois plus important en métaphase par rapport en

phase G1. Cette étude a également montré que le nombre de DSB n'est pas toujours corrélé au nombre de foyers γ -H2Ax pour les cellules mitotiques puisque même après la réparation de l'ADN les foyers γ -H2Ax ont tendance à rester sur le site lésionnel (Kato et al., 2008). Néanmoins afin de s'affranchir au maximum de ce type de variations, notre modèle expérimental d'HUVECs à confluence nous assure une homogénéité dans la réponse, avec environ 80 % de cellules en phase G1 au moment d'irradier (Ben Kacem et al.; Paget et al., 2019). Par ailleurs, lors d'une précédente étude qui s'intéressait à l'impact de l'énergie sur la réponse radio-induite *in vitro*, plusieurs mesures biologiques (viabilité, prolifération, cycle et expression génique) ont montré une différence très marquée entre les deux rayonnements. Dans le même temps, le nombre de foyers γ -H2Ax n'était quant à lui pas impacté par l'énergie malgré une EBR variant jusqu'à 1,36 pour une survie clonogénique de 95 % (Paget et al., 2019). Ainsi, compte tenu de ces résultats préliminaires nous avons décidé de prioriser les autres mesures biologiques plutôt que de réaliser des marquages γ -H2Ax lors de l'étude sur le débit de dose. Par ailleurs, la différence de viabilité obtenue entre les deux débits de dose pourrait s'expliquer par une capacité proliférative plus importante à 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min. En effet, un nombre de cellules seul ne nous renseigne absolument pas sur la nature des blocages dans le cycle cellulaire à un temps donné ni sur un renouvellement potentiel au sein de la population. Afin de quantifier plus précisément la proportion de cellules retournant en prolifération, il serait intéressant de réaliser une étude similaire avec l'ajout de nucléosides marqués qui seront spécifiquement incorporés par les cellules dupliquant leur ADN comme nous avons pu le réaliser lors de nos travaux sur l'impact de l'énergie (Paget et al., 2019) grâce à la technologie Click iT™ EdU (Krishan et al., 2010).

Les différences de répartition dans le cycle cellulaire ainsi que l'augmentation plus marquée de la taille des cellules après irradiation à 20 Gy au plus fort débit de dose pour les HUVECs, nous amènent à nous intéresser à la sénescence radio-induite (Annexe 2). En effet, il est largement décrit dans la littérature que les cellules entrées en sénescence sont bloquées dans le cycle cellulaire tout en gardant une certaine activité métabolique (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). De plus, la sénescence radio-induite des cellules endothéliales est largement décrite (Kim et al., 2014) avec notamment une augmentation de l'activité β -galactosidase (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Par ailleurs, il a été démontré que ces cellules sénescents sont importantes dans le développement des lésions radio-induites au niveau vasculaire (Stewart et al., 2006; Taunk et al., 2015; Wang et al., 2016). Dans notre étude, nous avons observé une activité β -galactosidase significativement plus importante à 2,5 comparé à 0,63 Gy/min pour

des doses supérieures à 2,2 Gy pour les HUVECs (Ben Kacem et al.). En revanche, nous n'avons obtenu aucune différence significative de l'activité β -galactosidase pour les HMVEC-L lorsque l'on fait varier le débit de dose de 0,63 à 2,5 Gy/min. Les HMVEC-L, utilisées dans notre étude, sont issues d'un donneur unique (contrairement à un pool de 4 donneurs pour les HUVECs). Ces HMVEC-L ont également deux passages supplémentaires, soit entre 10 et 12 divisions de plus que les HUVECs. Ceci expliquerait un taux de base plus élevé de β -galactosidase observé pour les HMVEC-L qui ne permettrait pas à stress équivalent d'avoir un différentiel significatif entre les deux débits de dose, même si un léger différentiel a pu être identifié lors de la modélisation des données pour une gamme de dose entre 1 et 15 Gy (cf page 160).

Afin de consolider ces observations, nous avons réalisé, sur les HUVECs, une étude d'expression génique sur une « signature sénescence » de 44 gènes (Annexe 1) impliqués dans différents processus biologiques englobant la sénescence mais aussi la survie cellulaire, l'inflammation et le cycle cellulaire. Ainsi, la viabilité relative supérieure à 0,63 Gy/min est confirmée par l'expression plus importante du marqueur de mortalité FAS à 2,5 Gy/min. De plus, l'expression des gènes CDKN2B (p15), GADD45 et RB1 étant plus importante à 2,5 Gy/min par rapport à 0,63 Gy/min à partir de 7 jours post-irradiation nous indique un arrêt de la prolifération (Golias et al., 2004; Pawlik et al., 2004; Bertoli et al., 2013) plus important au plus fort débit de dose. Ces résultats peuvent alors expliquer en partie la proportion plus importante de cellules en phase S au plus fort débit de dose. Enfin, nous observons également une expression significativement plus importante à 2,5 Gy/min par rapport à 0,63 Gy/min de gènes impliqués dans le SASP (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Burton & Krizhanovsky, 2014; Hernandez-Segura et al., 2018) comme IL8. Par ailleurs, les ARN ont été extraits et rétrotranscrits pour des HMVEC-L irradiés sur la gamme de dose complète (0 à 20 Gy) à 3 et 7 jours après l'irradiation pour les deux débits de dose. Néanmoins, comme nous n'avons pas mis en évidence, par cytométrie, une différence significative de l'activité β -galactosidase entre les deux débits de dose, nous n'avons, pour l'instant, pas analysé l'expression génique des HMVEC-L après l'irradiation toujours dans un souci de priorisation des résultats. Cependant, ces analyses pourront être réalisées a posteriori afin de vérifier si des tendances communes avec la réponse des HUVECs peuvent être mises en évidence. Par ailleurs, une altération des fonctions mitochondriales après l'irradiation a largement été décrite dans la littérature (Azzam et al., 2012). La mitochondrie est le principal organite consommateur d'oxygène à travers la chaîne respiratoire. Elle est alors le compartiment le plus riche en ERO (Boveris et al., 1973; Cadenas et al., 2000). Suite à l'irradiation, la génération d'ERO dans la mitochondrie est

responsable d'une induction d'apoptose (Ogura et al., 2009) mais aussi de dommages au niveau de l'ADN mitochondrial (Antipova et al., 2011). Ces ERO étant solubles sont responsables, entre autres, des réponses bystander (dommages cellulaires radio-induits des cellules non irradiées) (Chen et al., 2009; Jain et al., 2011). L'import des protéines dans la mitochondrie est fondamental au maintien de la biogénèse mitochondriale. Une altération de ce transport protéique en réponse à l'irradiation conduit à une amplification du stress oxydatif pouvant conduire aux réponses tardives comme les maladies dégénératives ou les troubles métaboliques (Huckriede et al., 1995; Davey et al., 2006). Afin d'affiner le modèle mathématique, il serait également intéressant de quantifier les ERO induits par les différents débits de dose même si les outils pour les caractériser peuvent être techniquement compliqués et sujet à controverse (Chen et al., 2010).

Ces différents travaux montrent par une preuve de concept qu'il existe un effet du débit de dose *in vitro*. Afin de les valider, nous nous sommes alors intéressés à un modèle *in vivo* reposant sur l'irradiation localisée d'un segment de 3 cm d'une anse intestinale de souris C57BL/6J (Ben Kacem et al.). Nous avons ainsi observé une perte de poids significativement plus importante pour les souris irradiées au débit de dose le plus élevé. La perte de poids, considérée comme un indicateur du bien-être animal, est directement liée à la souffrance de l'animal en réponse à un traitement (Chapman et al., 2013). Le suivi du poids des animaux a été contrôlé une fois par semaine afin d'éviter d'induire un stress supplémentaire et donc d'induire un biais sur la mortalité des animaux comme il est admis sur d'autres modèles d'irradiation (Kallman et al., 1964; Nunamaker et al., 2013). Des coupes histologiques à 1 semaine permettent de mettre en évidence une déstructuration du tissu intestinal après l'irradiation qui est retrouvé partiellement régénéré après 6 semaines quel que soit le débit de dose (Ben Kacem et al.). Nous avons mesuré un score lésionnel qui ne met pas en évidence de différences entre les deux débits quel que soit le temps. Ce score lésionnel se base sur les ulcérations de la muqueuse, l'atypie épithéliale, l'épaississement séreux, la fibrose intestinale, la congestion lymphatique ou encore la sclérose vasculaire (Jensen et al., 1983). La fibrose est décrite dans la littérature comme étant la principale réponse tardive radio-induite (Bentzen, 2006). Ainsi, il est intéressant de réaliser des colorations au Trichrome de Masson qui permettraient de colorer les fibres de collagènes afin de quantifier la fibrose radio-induite (Rannou et al., 2015; Zhou et al., 2017). Par ailleurs, afin de tenter d'expliquer les différences retrouvées au niveau du poids des souris, nous avons réalisé un marquage de la caténine p120 qui est un marqueur de l'homéostasie intestinale. Sept jours après l'irradiation, l'expression de cette protéine est significativement moins importante à 2,5 qu'à 0,63 Gy/min. Cette observation

reflète une différence de l'atteinte au temps précoce au niveau intestinal en fonction du débit de dose. Afin d'expliquer de façon plus précise la perte de poids observé chez les animaux, il serait intéressant d'effectuer des mesures plus précises afin de mettre en évidence les différences d'atteintes intestinales. Il a été rapporté dans la littérature que l'irradiation entraîne une diminution de la régénération des cryptes intestinales (Dong et al., 2018). Il serait donc intéressant de réaliser un marquage des cellules souches des cryptes afin d'évaluer la capacité de prolifération et de différenciation des cellules souches. Lgr5 indispensable à la régénération des cryptes, BMI1, CD44 ou encore Sox9 sont des marqueurs connus des cryptes intestinales (Yan et al., 2012; Metcalfe et al., 2014; Roche et al., 2015; Chang et al., 2016). De plus, suite à l'irradiation, il a été décrit une altération du transporteur actif Na/K ATPase et une dysfonction du péristaltisme intestinal (Lebrun et al., 1998; Sandle, 1998). Ces études suggèrent qu'il serait intéressant de mettre en place des mesures fonctionnelles simples et rapides pour confirmer les résultats *in vivo* concernant la perte de poids plus importante après une irradiation à 2,5 Gy/min par rapport à 0,63 Gy/min. Pour finir, la perte de poids des animaux étant précoce elle pourrait s'expliquer par une apoptose endothéliale plus importante au plus fort débit de dose. En effet, il a été montré que l'apoptose endothéliale entraîne une dysfonction de la barrière intestinale (Corre et al., 2013). Ainsi, la dysfonction d'activité du transporteur Na/K ATPase et l'apoptose radio-induite endothéliale pourraient induire une altération de l'absorption intestinale plus importante au plus fort débit de dose et ainsi être, en partie, à l'origine de la différence de poids observée chez les animaux après l'irradiation.

Récapitulatif de l'axe 1 : Impact du débit de dose sur la réponse biologique

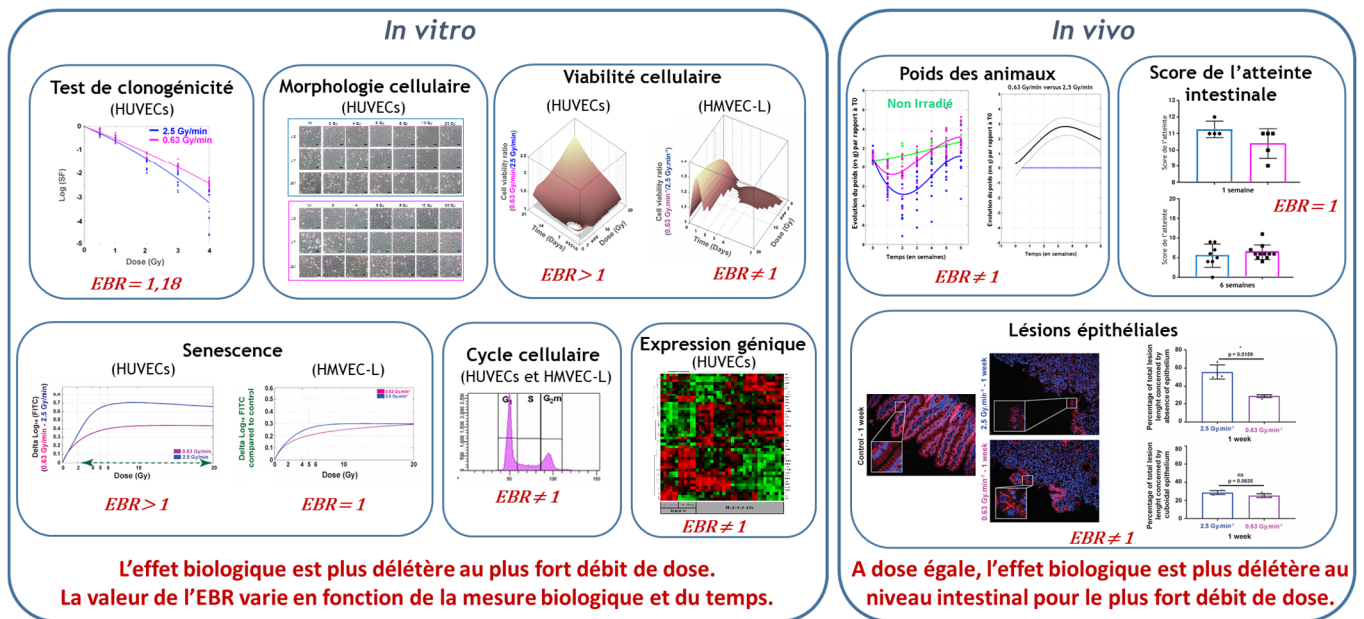


Figure 51 : Récapitulatif de notre étude sur l'impact du débit de dose sur la réponse radio-induite *in vitro* et *in vivo*

Notre étude met en évidence un effet plus délétère du débit de dose le plus élevé pour les tissus sains (Figure 51). En effet, *in vitro*, au plus fort débit de dose, la survie est plus faible, les proportions du cycle cellulaire sont significativement différentes et l'induction de la sénescence est plus importante. Ces observations ont été confirmées *in vivo*, sur un modèle de souris C57BL/6J, par une perte de poids et de l'intégrité de l'épithélium intestinal significativement plus importante au plus fort débit de dose à 1 semaine post-irradiation. Ces résultats vont dans le sens d'une EBR différente de 1 contrairement au postulat de la CIPR (Valentin, 2003) pour les rayons X ayant un débit de dose différent. Notre étude montre également l'intérêt d'utiliser des mesures biologiques multiparamétriques pour prédire de manière plus précise les effets radio-induits des nouvelles modalités de radiothérapie faisant varier le débit de dose.

2. Irradiations en dose fractionnée *in vitro* et *in vivo*

Au cours de notre étude, nous avons décidé d'irradier des HUVECs à une tension fixe de 4 MV avec les mêmes débits de dose que ceux utilisés pour les irradiations en dose unique : 0,63 et 2,5 Gy/min (Ben Kacem et al.). Parmi les études *in vitro* s'intéressant au fractionnement de la dose, ces dernières utilisent des protocoles à dose totale équivalente (Terashima et al., 2017; Koyama et al., 2018). Cependant, ces études administrent une dose totale de 2 Gy en 1 à 8 fractions (allant de 0,25 à 2 Gy/fraction), ce qui reste très éloigné des protocoles utilisés en clinique (Beckta et al., 2019). Ainsi, nos protocoles de fractionnement *in vitro* ont été choisis afin d'avoir une dose totale équivalente de 20 Gy administrée en 1, 2, 4 ou 10 fractions. En clinique, les mesures de BED prenant en compte le rapport α/β sont utilisées pour comparer les effets biologiques de différents protocoles de fractionnement. Le rapport α/β est généralement considéré comme égal à 3 Gy pour la plupart des tissus sains à réponse lente. Au cours de notre étude, nous avons donc décidé de comparer les effets biologiques radio-induit en fonction des $BED_{(3Gy)}$ des différents protocoles de fractionnement utilisés. L'observation et l'acquisition d'images des tapis cellulaires (HUVECs), à 7 jours après la dernière fraction d'irradiation, montrent une viabilité cellulaire qui semble plus importante au débit de dose de 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min (Annexe 3). Ainsi, les comptages bleu trypan à la cellule de Malassez nous ont permis de quantifier cette viabilité cellulaire. La viabilité relative est indépendante de la valeur de la $BED_{(3Gy)}$, de la dose et/ou du nombre de fractions suite à une irradiation à 0,63 Gy/min. En revanche, la viabilité relative dépend de la $BED_{(3Gy)}$ à 2,5 Gy/min. La viabilité relative des HUVECs est plus importante à 0,63 par rapport à 2,5 Gy/min pour une $BED_{(3Gy)}$ supérieure à 115 Gy et 40 Gy respectivement à 7 et 21 jours après l'irradiation. De plus, si nous nous intéressons à la viabilité relative des cellules après l'irradiation pour un même protocole de fractionnement, les irradiations au débit de dose de 2,5 Gy/min sont plus délétères que celles à 0,63 Gy/min. L'expression génique montre une expression plus importante des gènes impliqués dans un arrêt de progression dans le cycle cellulaire (Bertoli et al., 2013). En effet, les gènes CDKN2A (p16), CDKN2B (p15) et CDKN2D (p19) sont significativement plus exprimés au débit de dose le plus faible pour les $BED_{(3Gy)}$ comprises entre 70 et 135,7 Gy à 7 jours post-irradiation. Ces observations vont dans le sens d'un arrêt dans le cycle cellulaire (Bertoli et al., 2013). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant l'impact du débit de dose pour des irradiations fractionnées sur l'activité β -galactosidase des cellules endothéliales HUVECs. Or nous avons mis en évidence pour des irradiations en dose unique à 1 x 20 Gy une activité β -galactosidase significativement supérieure à 2,5 par rapport

à 0,63 Gy/min (Ben Kacem et al.). L'absence de différence pour le protocole à 1 x 20 Gy ($BED_{(3Gy)} = 154$ Gy) dans cette étude du fractionnement s'explique tout simplement par une baisse de puissance statistique, en lien avec un nombre de réplicas trop faible à 0,63 Gy/min ($n = 2$ à 0,63 Gy/min en raison d'un problème technique et $n = 4$ à 2,5 Gy/min). Il faudra reproduire deux fois les expériences à 0,63 Gy/min afin de valider définitivement les données obtenues.

Néanmoins les résultats de notre étude *in vitro* corroborent les travaux de Terashima *et al.* (Terashima et al., 2017). En effet, à dose totale équivalente de 2 Gy avec un fractionnement allant de 1 x 2 Gy à 8 x 0,25 Gy, cette équipe montre qu'une augmentation du nombre de fraction ainsi qu'une diminution de la dose par fraction entraînent une viabilité relative significativement inférieure au plus fort débit de dose (2 Gy/min par rapport à 1 et 1,5 Gy/min) (Terashima et al., 2017). Les auteurs montrent ainsi l'importance du débit de dose ainsi que de la dose par fraction lors des irradiations en dose fractionnée. Ces différences d'effets entre les deux débits de dose sont expliquées par une induction d'effets cytotoxiques (mortalité cellulaire comme l'apoptose et l'arrêt dans le cycle cellulaire) plus importante au plus fort débit de dose. En effet, pour le fractionnement de faibles doses totales (1 à 6 Gy), il a été montré une augmentation de l'effet cytotoxique sur des cellules cancéreuses notamment de poumon (NSCLC) lorsque le débit de dose est élevé (supérieur à 2 Gy/min) (Dey et al., 2003; Gupta et al., 2011) contrairement à un plus faible débit de dose (inférieur à 1 Gy/min) (Smith et al., 1999).

Par ailleurs, nous avons comparé les effets biologiques de deux protocoles de fractionnement ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. La valeur de $BED_{(3Gy)}$ est utilisée en clinique pour comparer la réponse biologique de différents protocoles de fractionnement entre eux. Ainsi une valeur de $BED_{(3Gy)}$ équivalente suggère une réponse biologique similaire. L'irradiation des HUVECs suivant le protocole A (1 x 20 Gy) et C (3 x 11 Gy) à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy, devrait donc en théorie nous conduire à une réponse radio-induite identique. Cependant, nous mettons en évidence, à J21, une viabilité relative significativement supérieure à 3 x 11 Gy par rapport à 1 x 20 Gy suite à une irradiation à 2,5 Gy/min. L'expression génique est également impactée par le fractionnement de la dose quel que soit le débit de dose à J7 et J21. En effet, l'analyse statistique à 0,63 Gy/min permet de mettre en évidence 8 et 12 gènes différemment exprimés respectivement à J7 et J21 entre les deux protocoles de fractionnement à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy. A 2,5 Gy/min, nous observons 13 gènes différemment exprimés entre les deux protocoles à la fois à 7 et 21 jours post-irradiation. A J7 et J21, les gènes en commun entre les deux débits de dose sont respectivement au nombre de 6 et 7.

Au cours de mes travaux de thèse, d'autres expérimentations ont permis de nous intéresser à l'effet de la culture cellulaire sur les différentes mesures biologiques. En effet, le protocole à 10 x 2 Gy ($BED_{(3Gy)} = 33$ Gy) a été dupliqué avec des choix de changements de milieux différents. D'une part le groupe E a eu un changement de milieu 1h avant la dernière fraction d'irradiation puis tous les 7 jours suivant ce changement de milieu. D'autre part, pour le protocole F, le changement de milieu a lieu 3 jours après la dernière fraction d'irradiation et tous les 7 jours suivant cette date. Ainsi, nous n'observons aucun impact du changement de milieu sur la viabilité cellulaire relative à 7 et 21 jours après l'irradiation. Cependant, le changement de milieu a eu un impact sur l'activité β -galactosidase qui est significativement supérieure pour le groupe E comparé à F quel que soit le débit de dose utilisé au moment de l'irradiation. L'étude de l'expression génique de la « signature sénescence » permet de mettre en évidence le nombre de gènes significativement exprimés de manières différentes entre les deux protocoles (E par rapport à F) en fonction du temps et du débit de dose. Ainsi, 16 et 19 gènes sont différemment exprimés de manière significative entre les deux protocoles à 0,63 Gy/min respectivement à J7 et J21. De plus, à 2,5 Gy/min, 12 et 10 gènes ont une expression impactée par le changement de milieu respectivement à J7 et J21. Entre les deux débits de dose, les gènes en commun différemment exprimé en fonction du protocole de fractionnement sont au nombre de 8 à la fois à 7 et 21 jours post-irradiation. Ces différences illustrent la difficulté de mener *in vitro* des études sur les protocoles normofractionnés. En effet, le choix des conditions de culture pour l'étude du fractionnement de la dose *in vitro* impacte les effets biologiques observés et limite ainsi leur interprétation. Ces limites techniques sont un frein à l'étude de l'impact de protocoles de fractionnements ayant des temps de culture différents. Etudier l'impact du fractionnement de la dose directement sur un modèle *in vivo* permettrait alors de s'affranchir de ce type de limites techniques sévères.

Pour rappel, la BED permettant de comparer différents protocoles de fractionnement, suggère un effet biologique identique pour une valeur de BED équivalente. Or nous mettons en évidence un différentiel de la réponse radio-induite à BED équivalente ce qui suggère une limite de cette mesure pour la prédiction de l'effet biologique après l'irradiation. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la réponse radio-induite de différents protocoles de fractionnement *in vivo* à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy sur un modèle d'irradiation thorax entier chez des souris C57BL/6J. Ce modèle d'irradiation a été choisi car il est largement décrit dans la littérature et la fibrose radio-induite a été montré pour des doses uniques supérieures à 6 Gy (Chiang et al., 2005). Les irradiations ont toutes été réalisées à l'aide d'un accélérateur linéaire médical (LINAC) à une tension de 4 MV et au débit de dose de 2,5 Gy/min afin de se rapprocher le plus possible des

conditions d'irradiation utilisées en clinique. La survie des animaux ainsi que leurs poids à partir de 3 mois post-irradiation ne mettent pas en évidence de différences significatives en fonction du fractionnement de la dose à $BED_{(3Gy)}$ équivalente.

L'imagerie scanner des poumons des souris nous permet de quantifier l'intensité en niveau de gris de chaque voxel. Cette intensité est en unité Hounsfield (HU). Les valeurs en HU correspondent à l'opacification du tissu. Elles varient entre -1000 pour l'air (correspondant à un voxel noir sur les images micro CT) et +1000 pour l'os (voxel blanc) en passant par 0 pour l'eau (DenOtter et al., 2019). Ainsi, la fréquence de distribution en fonction des HU montre une opacification des poumons à 6 mois par rapport à 1 mois quel que soit le protocole de fractionnement. La quantification de l'intensité en niveau de gris des scanners nous a permis de comparer de façon plus précise l'opacification des poumons en fonction du protocole d'irradiation et du temps. Ainsi, à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy, le protocole P1 (1 x 20 Gy) est le plus délétère car il induit une opacification plus importante que les autres protocoles de fractionnement 6 mois après l'irradiation. La quantification de la fréquence de distribution en fonction de l'intensité HU permet de classer les différents protocoles de fractionnement en fonction de leurs degrés de toxicité sur le poumon sain. Ces résultats permettent de classer les protocoles à $BED_{(3Gy)} \approx 154$ Gy des plus délétères au moins délétères seulement à 6 mois post-irradiation. Ainsi, le protocole P1 (1 x 20 Gy) est le plus délétère suivi des protocoles P3 (5 x 8,2 Gy) et P4 (22 x 3,3 Gy) qui ne présentent pas de différences significatives entre eux et enfin le protocole P2 (3 x 11 Gy) qui est le moins délétère. L'administration des fractions d'irradiation est à une fréquence moins élevée (1 fraction/semaine) pour ce dernier protocole (P2) par rapport aux protocoles P3 (1 fraction/4 jours) et P4 (1 fraction/jours). Cet étalement permettrait au tissu de se régénérer et expliquerait ainsi un effet moins délétère du protocole P2. Le protocole P5 (10 x 8,2 Gy) ayant une $BED_{(3Gy)} \approx 306$ Gy est significativement le plus délétère par rapport aux autres protocoles si on considère la survie et l'imagerie scanners à 1 et 6 mois (pour la seule souris survivante du groupe). Cette observation est confirmée par la perte de poids significativement plus importante à partir de 3 mois post-irradiation. Ces résultats vont dans le sens d'une efficacité biologique plus importante lorsque la valeur de $BED_{(3Gy)}$ augmente. Zhou *et al.* ont mis en place un modèle permettant de déterminer un index fibrosant en fonction du fractionnement de la dose suite à une irradiation en thorax entier de souris C57BL/6 (Zhou et al., 2017). Cet index est basé sur la diminution du volume du poumon et la densification du tissu pulmonaire après l'irradiation. Il permet ainsi d'estimer les doses entraînant une fibrose pulmonaire après une irradiation avec 1 ou 5 fractions. L'imagerie micro-CT reste cependant limitée pour une description des dommages. Une analyse

anatomopathologique restera nécessaire pour conclure de façon plus précise sur la cause de l'opacification pulmonaire qui peut être due par exemple à l'induction d'une fibrose ou d'un œdème (Stone et al., 2003; Choi et al., 2016; Bledsoe et al., 2017; Citrin et al., 2017). Ainsi, dans un premier temps, l'analyse histologique sera réalisée grâce à des colorations Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) et Trichrome de Masson ainsi qu'une contre coloration au Nuclear Fast Red (Evangelou et al., 2017; Zhou & Moore, 2017). La coloration HES permettra de mesurer par exemple l'épaississement de la barrière alvéolo-capillaire (Downing et al., 2010) qui reflète une diminution de la capacité des échanges gazeux. Un score lésionnel pourra ainsi être déterminé en intégrant plusieurs variables en plus de l'épaisseur des septas alvéolaire comme l'ulcération de la muqueuse, le dépôt de fibrine ou encore l'infiltration leucocytaire (Ashcroft et al., 1988; Hubner et al., 2008; Downing et al., 2010; Lavigne et al., 2017). La coloration au Trichrome de Masson permet de marquer les fibres de collagènes et servira à mettre en évidence la fibrose radio-induite à 6 mois post-irradiation (Almeida et al., 2013; Lavigne et al., 2017) pour comparer les différents protocoles de fractionnement. Par ailleurs, les poumons des animaux irradiés ont été prélevés et incubés dans une solution de X-gal (étant un substrat de l'enzyme β -galactosidase). Cependant, cette méthode montre un nombre de cellules faux-positives non négligeable (Georgakopoulou et al., 2013; Evangelou et al., 2017). La contre-coloration au Nuclear Fast Red se base sur l'utilisation de la lipofuscine qui est considérée comme un marqueur universel de la sénescence *in vitro* et *in vivo* (Evangelou & Gorgoulis, 2017; Evangelou et al., 2017). En effet, la formation d'un agrégat de lipofuscine dans les cellules sénescents a été décrite (Georgakopoulou et al., 2013). Ainsi, le double marquage X-gal et Nuclear Fast Red permettra de mettre en évidence et de quantifier les cellules sénescents en éliminant les faux positifs.

Par ailleurs, de récentes techniques permettent de marquer *in vivo* les vaisseaux sanguins lors de l'acquisition de l'imagerie micro-CT grâce à l'injection d'un produit de contraste comme le *Fenestra* ou l'*ExiTron* (Mannheim et al., 2016). L'acquisition récente d'un micro-CT au sein du service permet d'envisager et rend possible la réalisation de ce type d'acquisition au LRMed. Par la suite, l'analyse des images et la reconstruction 3D du réseau vasculaire seraient possibles afin de quantifier les modifications du réseau vasculaire (Jahrling et al., 2009; Epah et al., 2018). Cette approche permettrait de quantifier la surface fonctionnelle du réseau vasculaire au niveau pulmonaire et ainsi de renseigner sur le degré d'implication du système vasculaire dans les dommages radio-induits observés. De plus, l'opacification observée à l'aide du micro-CT ne nous renseigne pas non plus sur la fonctionnalité du poumon irradié. L'utilisation d'un pléthysmographe permet par exemple de mesurer des différences de pression

dans l'enceinte hermétique ce qui permet d'obtenir des informations sur la fréquence respiratoire ou encore les volumes pulmonaires. Ces mesures sont notamment réalisées au cours d'un exercice physique de l'animal afin de déterminer la consommation en oxygène et les volumes d'air inspiré et expiré. Au cours d'une précédente thèse au laboratoire, un test d'effort a été mis au point pour évaluer la déficience fonctionnelle du poumon (Lavigne et al., 2019). Enfin pour compléter de manière non exhaustive ces résultats, des prélèvements pulmonaires des lobes inférieurs droits et des prélèvements sanguins ont été réalisés au cours de ces travaux de thèse. Ces prélèvements permettront par exemple de réaliser des études d'expressions géniques ainsi que des dosages sériques de protéines du surfactant D et A, par exemple, étant connus pour la détection précoce des pneumopathies radiques (Sasaki et al., 2001; Wutzler et al., 2011).

Récapitulatif de l'axe 2 : Impact du fractionnement de la dose sur la réponse biologique

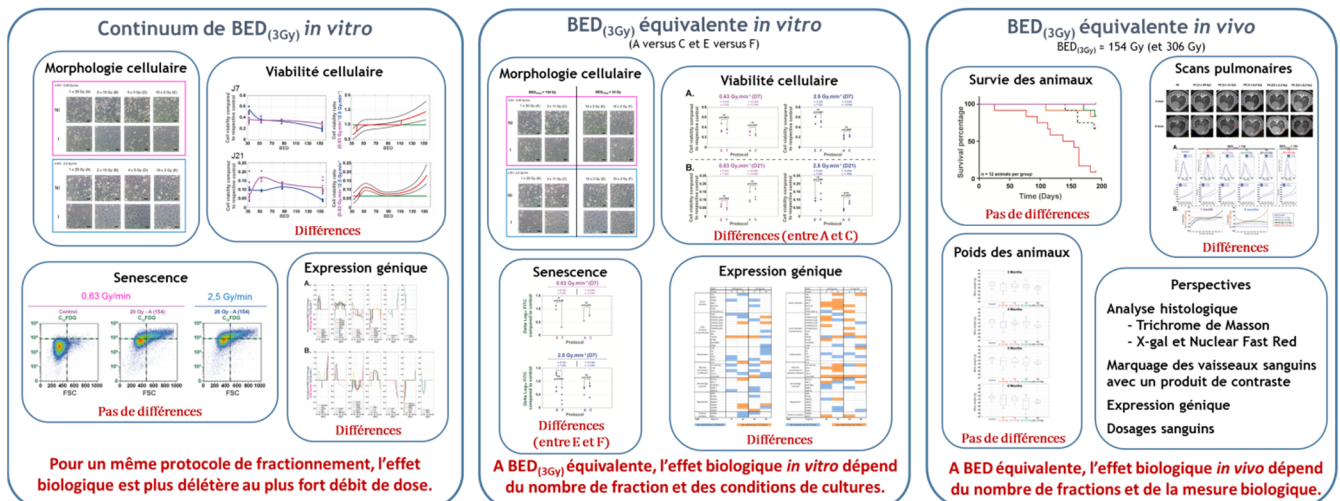


Figure 52 : Récapitulatif de notre étude sur l'impact du fractionnement de la dose *in vitro* et *in vivo*

Notre étude a mis en évidence un effet biologique plus délétère au plus fort débit de dose pour des irradiations fractionnées *in vitro* sur le modèle HUVECs (Figure 52). Pour des protocoles de fractionnement ayant une BED équivalente, l'effet biologique est différent, à la fois *in vitro* (viabilité, sénescence, expression génique sur les HUVECs) et *in vivo* (scanners pulmonaires des souris C57BL/6J irradiées en thorax entier).

D. Modèle d'EBR multiparamétrique

In vitro, les différentes mesures biologiques de notre étude permettent de classer certains tests comme « prédictifs » et d'autres moins informatifs et/ou pertinents. Par exemple, le cycle cellulaire ne renseigne pas de manière directe sur un blocage dans le cycle cellulaire sauf s'il est complété par d'autres tests. Néanmoins, il permet d'identifier des gammes de temps et/ou de doses pour lesquelles une différence significative est observée entre deux modalités d'irradiation. En revanche, le comptage manuel au bleu trypan est une mesure prédictive (au moins pour les doses uniques) de l'effet des rayonnements ionisants *in vivo* que nous avons pu valider sur l'effet du débit de dose (Ben Kacem et al.). La sélection de mesures biologiques pertinentes *in vitro* à intégrer dans le modèle prédictif est essentielle pour ne pas perdre d'informations mais également avoir un modèle complet et ciblé. Ainsi, pour des raisons techniques, de temps et coût, toutes ces mesures ne pourront pas être systématiquement réalisées sur la gamme de dose (2, 4, 5, 6, 10 et 20 Gy) et de temps étudiés (J1, J2, J3, J4, J7, J14 et J21) comme au cours de cette thèse. En effet, si nous nous plaçons dans une optique de connaître rapidement l'effet d'une nouvelle modalité d'irradiation, il faudra disposer d'une méthodologie incluant à la fois le ou les quelques tests pertinents, et ce aux temps et doses remarquables. Nous pouvons ainsi parler de réduction de la dimension pour éliminer les pertes d'informations dans chacun des tests mais aussi la redondance d'information qu'ils peuvent apporter entre eux. Ainsi, par exemple, dans notre étude, l'activité β -galactosidase à 7 jours post-irradiation atteint un plateau à partir de la dose de 5 Gy. Le rapport d'effet à cette dose est de $\text{Log}_{10}(\text{FITC}_{0,63}/\text{FITC}_{2,5}) = -0,27$; ce qui signifie une activité β -galactosidase à 2,5 Gy/min 85 % ($1/10^{-0,27}=1,85$) supérieure à celle mesurée à 0,63 Gy/min (IC [41 % ; 139 %] ; $p < 0,001$). Cette dose de 5 Gy est celle qui maximise les différences d'effets de la sénescence liée à l'activité β -galactosidase entre les deux débits de dose. Lorsque nous fixons la dose à 5 Gy, la viabilité cellulaire est significativement supérieure au débit de dose de 0,63 Gy/min par rapport à 2,5 Gy/min à 1, 2, 3, 7, 14 et 21 jours. Au vu de nos résultats, les temps 1, 2, 3 et 7 jours semblent être avantageux en termes de rapidité de prédiction de risque lors d'une situation accidentelle ou de demande d'expertise. Les expériences d'irradiations en dose fractionnée montrent que la dose par fraction et le nombre de fractions doivent être pris en compte dans le modèle d'EBR multiparamétrique. Au vu de nos résultats, la valeur de $\text{BED}_{(3\text{Gy})}$ semble effectivement moins prédictive du différentiel de réponse radio-induite. Cependant, nous avons observé une influence du protocole de culture cellulaire sur les mesures biologiques suite à des

irradiations fractionnées. Cette limite technique ne doit pas être écartée pour l'interprétation des résultats et surtout pour le modèle prédictif.

Notre étude nous a permis d'éprouver et de sélectionner certains tests à intégrer dans le futur modèle mathématique de prédiction des effets radio-induits. En effet, la viabilité par des comptages au bleu trypan, la sénescence étant liée aux dommages radio-induits comme la fibrose ainsi que l'expression de certains gènes apparaissent pertinents au développement d'un modèle prédictif de lésions radio-induites. La dose de 5 Gy et des temps précoces après l'irradiation sont également pertinents pour réaliser un ou des tests plus restreints pour répondre et se rapprocher au plus près des nouvelles pratiques cliniques dont on ne connaît pas forcément toujours les effets secondaires sur les tissus sains à moyen et long terme. A terme les mesures d'efficacité biologique relative (EBR) devraient être capable d'intégrer des mesures biologiques sur la viabilité/mortalité cellulaire, la sénescence, l'expression génique mais aussi la concentration d'ERO, les dommages à l'ADN ... Ainsi, le modèle mathématique prédictif permettrait à l'aide d'une mesure biologique simple de pouvoir prédire les réponses des autres mesures biologiques intégrées dans le modèle et ainsi d'avoir une prédiction de l'effet radio-induit de manière plus globale (Figure 53).

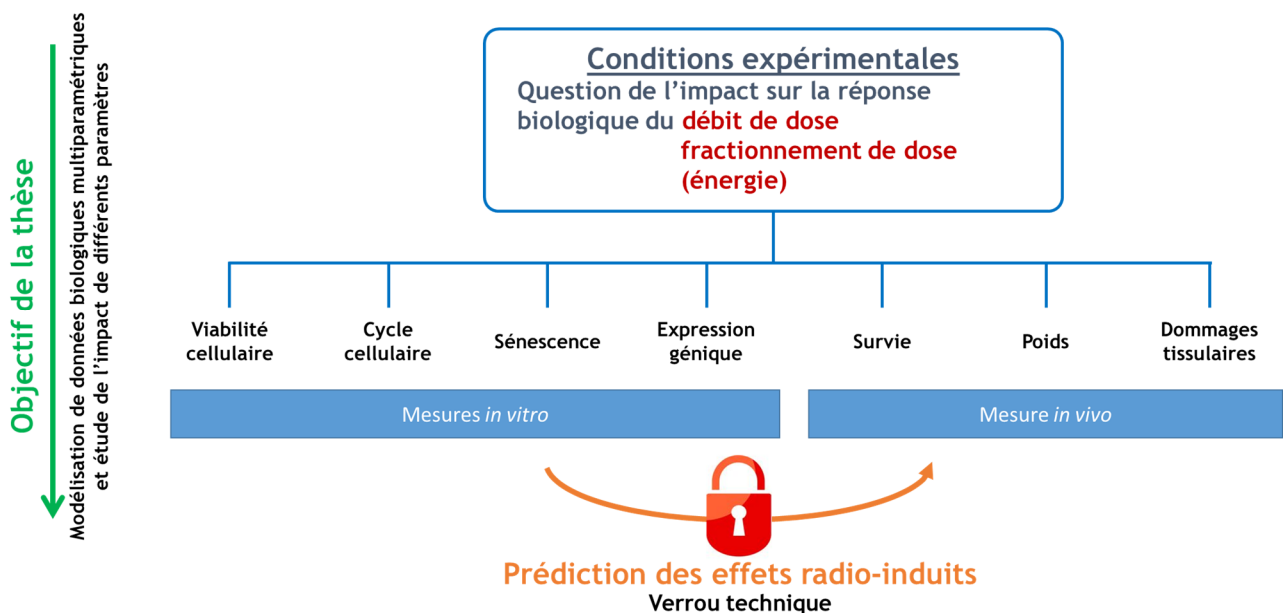


Figure 53 : Perspectives du modèle prédictif des effets radio-induits des nouvelles modalités d'irradiation aux rayons X

E. Intérêt de l'étude pour les techniques émergentes d'irradiation aux rayons X

En clinique, les pratiques pour délivrer les rayonnements sont en constante évolution. Les nouveaux appareils permettent de délivrer des rayonnements à de plus forts débits de dose et énergies. Grâce à l'amélioration balistique, le faisceau s'adapte aux variations anatomiques du patient au cours de l'irradiation qui est plus localisée et permet d'épargner de plus en plus de tissus sains. Pour rappel, le postulat de la CIPR concerne les photons ayant une énergie comprise entre 0,1 et 3 MeV (Valentin, 2003). Un travail récent mené au laboratoire s'est intéressé *in vitro* sur des HUVECs aux effets biologiques avec des rayons X de basse (220 kV) et haute énergie (4 MV) (Annexe 4) (Paget et al., 2019). Ces travaux ont mis en évidence un impact de l'énergie des photons sur la réponse radio-induite des cellules endothéliales HUVECs (Paget et al., 2019). En effet, à 4 MV, l'induction de la sénescence augmente, la survie et la prolifération des cellules diminuent significativement par rapport à 220 kV. L'expression de 44 gènes « signature sénescence » (Annexe 1) est également impactée par cette variation d'énergie au moment de l'irradiation et confirme les autres mesures biologiques (Paget et al., 2019).

De plus, le fractionnement évolue en radiothérapie. On distingue le fractionnement de la dose et le fractionnement spatial. Les protocoles de fractionnement de la dose évoluent vers une diminution du nombre de séances ayant l'avantage de réduire le temps de déplacement du patient entre son domicile et le centre de soin. Cette évolution conduit à des protocoles d'hypofractionnement qui sont généralement associés à une augmentation de la dose par fraction. Des études ont montré que l'augmentation du nombre de fraction, lors de protocoles hyperfractionnés, entraîne une diminution de la survie cellulaire (Terashima et al., 2017) et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Cervelli et al., 2014). Plusieurs études montrent également qu'une augmentation de la dose par fraction induit, quant à elle, une toxicité plus importante au niveau de la prostate (Fonteyne et al., 2012; Toledano et al., 2012) mais un meilleur control tumoral au niveau pulmonaire (Figlia et al., 2018). Ces observations montrent que les facteurs : nombre de fractions, nature du tissu et dose par fraction, doivent être pris en compte dans la prédiction du risque associé aux nouveaux protocoles de radiothérapie.

Par ailleurs, le fractionnement spatial correspond aux évolutions techniques de distribution spatiale de la dose. Le dépôt de la dose est non uniforme et suit un motif résultant de l'utilisation de grilles c'est ce qu'on appelle la radiothérapie fractionnée GRID (Billena et al., 2019) ou par l'utilisation de collimateurs multilames (MLC) (Neuner et al., 2012). On distingue la radiothérapie GRID photon qui est indiquée pour le traitement des tumeurs de gros volumes (Laissue et al., 2012) mais aussi la radiothérapie GRID proton qui permet une meilleure

protection des organes à risque localisés derrière la cible tumorale (Henry et al., 2016). La grille permet de créer des motifs hexagonaux de «points chauds» entourés par le tissu non irradié. Le collimateur multilames permet une succession orthogonale de bandes irradiées et non irradiées. On parle de faisceaux multilames ou microlames en fonction de la distance qui séparent ces différents motifs. Plusieurs études cliniques se sont intéressées aux bénéfices d'un traitement par radiothérapie avec fractionnement spatial. Mohiuddin *et al.* ont suivi 87 patients au cours de soins palliatifs avec d'une part des patients traités par la radiothérapie GRID seule (20 %) ou combinée avec une radiothérapie externe (Mohiuddin et al., 1999). Ainsi, 78 % de patients ressentent moins de douleurs après le traitement et 72,5 % d'entre eux ont obtenu une diminution de la masse tumorale. De plus, Edwards *et al.* ont traité 53 patients, atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou, en utilisant une radiothérapie GRID à la dose de 15 Gy suivi d'une radiothérapie externe conventionnelle. Après 3 ans le taux de contrôle tumoral était de 81 % et seulement 2 patients ont présenté des toxicités radio-induites tardives (Billena & Khan, 2019). Au cours d'une autre étude, Mohiuddin *et al.* ont évalué l'efficacité du fractionnement spatial dans le cadre d'une étude clinique portant sur 22 patients atteints de différents types de cancer dans le cadre de soins palliatifs (Mohiuddin et al., 1990). Les symptômes ont été diminués chez 91 % des patients et une légère toxicité cutanée et gastro-intestinale a été observée chez 5 patients. Dans cette étude, 14 patients ont bénéficié d'une radiothérapie conventionnelle en plus de la radiothérapie GRID. De plus, parmi les 22 patients, 6 avaient déjà reçu une radiothérapie antérieure. L'utilisation de ces traitements supplémentaires rend l'utilité du fractionnement spatial difficile à comprendre, ce qui est récurrent dans les études cliniques existantes sur la thérapie GRID (Mohiuddin et al., 1990; Billena & Khan, 2019).

Le fractionnement spatial, à l'aide de minibeams ou microbeams, minimise la toxicité des irradiations aux fortes doses en limitant le volume de tissus sains irradiés, c'est-à-dire en diminuant l'effet dose-volume (Prezado et al., 2013; Peucelle et al., 2015; Schultke et al., 2017). Cela permettrait aux cellules saines autour de la zone irradiée de migrer et d'assurer la réparation des zones endommagées (Prasanna et al., 2014). Le fractionnement spatial est également utilisé dans d'autres situations d'exposition (Prezado & Fois, 2013; Henry et al., 2016) qui seront développées dans la partie suivante.

Certaines études mettent en évidence l'impact d'autres facteurs comme l'énergie et le fractionnement spatial dans la réponse radio-induite. Le modèle d'EBR multiparamétrique pourrait à terme intégrer plusieurs facteurs en plus de la radiosensibilité du tissu et la dose comme la source d'irradiation, le débit de dose, l'énergie, le fractionnement spatial ou encore des paramètres renseignant sur le fractionnement de la dose (dose/fraction, nombre de fraction, temps entre les fractions et étalement). Des facteurs de pondérations doivent être déterminés en se basant sur les études précliniques afin d'avoir un modèle prédictif unique.

F. Intérêt de notre approche pour d'autres situations d'expositions

Historiquement, la radiothérapie se développe autour de l'utilisation des photons. Cependant, n'importe quelle particule (neutre ou chargée) ayant une énergie suffisante peut ioniser la matière et être utilisée en radiothérapie. Depuis plusieurs années, des évolutions technologiques permettent l'utilisation de nouvelles particules ionisantes comme les protons, les ions carbonés, etc. On parle d'hadron-thérapie pour désigner les irradiations cliniques utilisant des faisceaux de protons ou de carbonés par exemple. L'EBR d'un rayonnement particulaire correspond au rapport de la dose d'un rayonnement X (photons) par rapport à la dose d'un rayonnement particulaire induisant un même effet biologique (Choi et al., 2012). Cette notion permet de bénéficier du recul de l'expérience clinique acquise avec les irradiations utilisant des rayons X (Paganetti, 2015). Le rayonnement de référence est défini comme un rayonnement X utilisé en clinique (Mohan et al., 2017). L'EBR du photon définie à 1 par la CIPR (Valentin, 2003) est actuellement utilisée en clinique pour comparer et calculer la dose à administrer avec une autre source d'irradiation. Or nous avons démontré au cours de cette thèse qu'il existe une variabilité de l'efficacité biologique en fonction de l'énergie (Paget et al., 2019), du débit de dose (Ben Kacem et al.) ou du fractionnement de la dose.

1. Protonthérapie

La protonthérapie est une forme de radiothérapie qui utilise des faisceaux de protons au moyen d'un accélérateur de particules chargées. Ce dernier peut être un cyclotron, un synchrocyclotron ou un synchrotron (Thariat et al., 2018). Actuellement, il existe 3 centres de protonthérapie en France : le Centre Antoine Lacassagne à Nice, le Centre de Protonthérapie à Orsay et enfin le Centre François Baclesse à Caen (INCa, 2016; Dendale et al., 2019). La protonthérapie correspond à 1 % des indications de radiothérapie en France (Dendale et al., 2019). En 2013, 688 patients ont été traités, la plupart pour des tumeurs malignes de l'œil chez des patients de plus de 25 ans (INCa, 2016). Cependant, 100 à 150 enfants sont traités chaque année (INCa, 2016). Or l'espérance de vie de ces patients après traitement étant importante, la prédiction du risque de complications à long terme est indispensable.

Contrairement aux photons, les protons vont déposer leur énergie et s'arrêter à une profondeur donnée en fonction de leur énergie initiale (Thariat et al., 2018). Ainsi, les protons permettent d'irradier des tumeurs profondes en limitant le dépôt de dose en début de parcours (Figure 52). On parle alors de fin de parcours extrêmement ionisant. Les protons présentent donc un avantage pour le dépôt de la dose par rapport aux photons (Mohan et al., 2017). Il a été

montré que la variation d'énergie pour les protons permet d'avoir un pic de Bragg qui s'étale en fonction de la profondeur atteinte (appelé SOBP, *spread-out Bragg peak*) (Thariat et al., 2018). Cette caractéristique permet d'irradier de plus grands volumes de tumeur situés en profondeur et avec un rayonnement homogène. Le pouvoir d'arrêt des protons dépend également de la composition du tissu traversé. Ce paramètre est nécessaire pour déterminer le parcours des protons dans le tissu de façon précise (Thariat et al., 2018). En effet, l'exactitude de cette valeur va déterminer la précision de la prédiction du dépôt de dose au sein du tissu. La trajectoire des protons est déviée à cause de leurs interactions électromagnétiques avec les noyaux. De plus, les interactions avec les électrons sont différentes d'un proton à un autre et expliquent le phénomène de diffusion de la dose en bord de faisceau (ou pénombre latérale) observé chez les protons (Thariat et al., 2018). Ces incertitudes physiques constituent les principales limites de la protonthérapie.

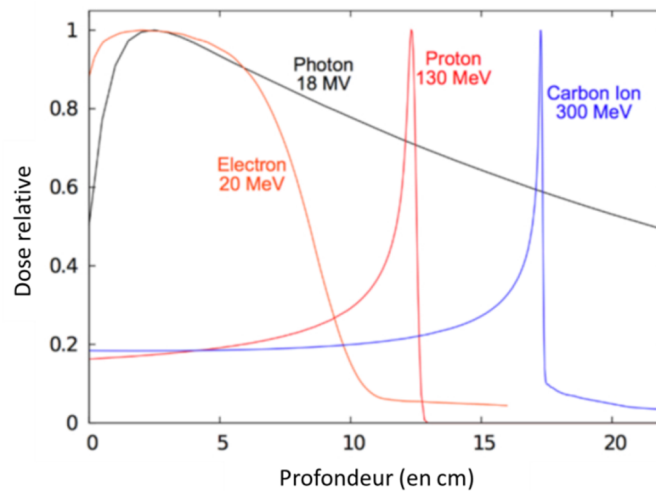


Figure 54 : Distribution du dépôt de la dose en fonction de la distance parcourue
Adapté de (Kaiser et al., 2019).

Plusieurs études démontrent que l'EBR des protons varie de manière significative le long du trajet du faisceau (Paganetti, 2014; Mohan et al., 2017). Paganetti *et al.* expliquent suite à l'analyse de plusieurs données expérimentales *in vitro* et *in vivo*, que la valeur moyenne de l'EBR au pic de Bragg est d'environ 1,15 par rapport aux photons (Chaudhary et al., 2014; Paganetti, 2014). De plus, la valeur de l'EBR varie de 1,1 à 1,7 en fonction de la distance parcourue dans le tissu. En effet, le calcul de l'EBR amène à une valeur de 1,1 dans la région d'entrée et 1,7 lors de l'atténuation du faisceau à la fin du parcours (Paganetti, 2014). De plus, la valeur de l'EBR semble augmenter avec la diminution du ratio α/β et de la dose (Paganetti, 2014; Mohan et al., 2017). Bien que la variabilité de la valeur d'EBR pour les protons soit acceptée et étant donné une incertitude importante des données, dans la pratique clinique la valeur de l'EBR est supposée égale à 1,1 (Mohan et al., 2017). De plus, cette hypothèse est

principalement basée sur des données issues de tests de survie clonogénique (McNamara et al., 2015). Or, comme nous l'avons largement décrit dans ce manuscrit ce test reste limité pour la prédiction d'un risque étant donné qu'il ne prend pas en compte le phénotype des cellules survivantes suite à l'irradiation. L'EBR peut également être déterminée ou dérivée des observations cliniques comme par exemple le volume tumoral, la survie ou encore le score de performance ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) qui permet de décrire l'état général du patient (allant du grade 0 (pleinement actif) au grade 4 (handicap)) (Makita et al., 2014). De plus, les incertitudes physiques peuvent influencer la dose biologique efficace reçue par le patient par rapport à la dose calculée dans les plans de traitement. Ces incertitudes peuvent donc amener à sous-estimer les toxicités aux tissus sains et surestimer la capacité de control tumoral (Jones, 2017; Mohan et al., 2017).

Il n'existe à ce jour aucune preuve clinique claire de l'impact de cette hypothèse de valeur d'EBR de 1,1. Etant donné le nombre croissant de patients traités par la protonthérapie, les preuves cliniques de la variabilité de l'EBR pour les protons sont de plus en plus discutées (Paganetti, 2014; Paganetti, 2015; Luhr et al., 2018). La question d'une définition « exacte » de cette valeur d'EBR pour les protons fait l'objet de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifique (Lomax, 2008; McNamara et al., 2015; Paganetti, 2015). Certains auteurs proposent de considérer une valeur d'EBR variable et dynamique en fonction de la dose, du TEL et du tissu (rapport α/β) comme pour les ions lourds afin d'éviter d'établir une valeur unique, source d'incertitudes et de biais (McNamara et al., 2015; Paganetti, 2015; Luhr et al., 2018). Ainsi, les termes d'EBR de référence et d'EBR clinique peuvent être utilisés. L'EBR de référence correspond à la valeur obtenue pour une tolérance des tissus sains avec les protocoles normofractionnés à 2 Gy par fraction. L'EBR clinique fait quant à elle référence à la valeur choisie par l'oncologue pour le traitement du patient. Cette dernière est proche de l'EBR de référence mais peut être influencée par l'hétérogénéité de la distribution de la dose précédemment abordée (Wambersie, 1999). L'amélioration de la connaissance de l'EBR amènerait à une meilleure compréhension des observations cliniques ainsi qu'à l'amélioration des modèles prédictifs en radiobiologie.

2. Carbonothérapie

La carbone-thérapie ou l'hadron-thérapie par ions carbonés correspond à l'irradiation des tissus par des faisceaux d'ions carbonés à l'aide d'un accélérateur de particule comme pour la protonthérapie (Choi & Kang, 2012). L'ion carbone est considéré comme un ion lourd par comparaison aux photons et protons. A ma connaissance, l'hadron-thérapie par ions carbonés

n'est actuellement pas utilisée en pratique clinique en France ce qui n'est pas le cas au Japon et en Allemagne. Cependant, il existe 1 seul centre de recherche pour l'hadron-thérapie par ions carbonés : Archade (*Advanced Resource Center for HADrontherapy in Europe*) à Caen depuis 2015 (HAS, 2010). Les faisceaux d'irradiation aux ions carbonés utilisés en clinique ont un TEL moyen d'environ 15 keV/ μm lors de l'entrée dans les tissus. La valeur de TEL augmente de plus en plus en traversant la matière pour atteindre 100 keV/ μm au niveau du pic de Bragg et jusqu'à 500 keV/ μm à la fin du dépôt d'énergie (Kanai et al., 1997). Cette valeur est considérablement supérieure à celle des protons et des photons de haute énergie (facteur 100) (Rodriguez-Lafrasse et al., 2012). De plus, cette valeur élevée de TEL a pour conséquence une efficacité biologique relative élevée par rapport aux photons et protons. En effet, en prenant comme critère 10 % de survie avec le test de clonogénicité, l'EBR varie entre 1,1 et 3 en fonction de la valeur du TEL et donc de la distance parcourue dans la matière (Weyrather et al., 1999; Suzuki et al., 2000). Une étude bibliographique, datant de 2009, montre une variabilité des valeurs d'EBR allant de 1,2 à 10 en fonction de l'étude considérée (Ando et al., 2009). Quant à elle, la CIPR établit une efficacité biologique relative de 3 pour les ions carbonés par rapport aux photons (Valentin, 2003).

Liu *et al.* montrent une augmentation de la migration des HUVECs suite à une irradiation aux rayons X par rapport au contrôle non irradié qui n'est pas retrouvée avec une irradiation aux ions carbonés. Ces travaux montrent une EBR supérieure pour les ions carbonés par rapport aux photons (Liu et al., 2014). De plus, les travaux de Kiyohara *et al.* se sont intéressés à l'adhésion des cellules inflammatoires sur les cellules endothéliales qui y est décrite comme un processus impliqué dans les dommages radio-induits (Kiyohara et al., 2011). Suite à une irradiation aux ions carbonés, l'expression de l'ICAM-1 est 4,4 et 5 fois plus importante respectivement pour les doses de 2 et 5 Gy par rapport aux photons (Kiyohara et al., 2011). L'EBR est également supérieure pour les ions carbonés par rapport aux photons, sa valeur variant de 2,2 à 5 pour les doses allant de 1 à 5 Gy (Kiyohara et al., 2011). Ces résultats sont également corroborés par les travaux de Helm *et al.* qui ont montré une augmentation de la formation de micronoyaux quelques jours après une irradiation significativement plus importante avec les ions carbonés par rapport aux photons (Helm et al., 2016). Il a été montré qu'un TEL plus élevé entraîne des dommages plus importants au niveau de l'ADN et des blocages dans le cycle plus persistants. Pour cette raison, l'hadron-thérapie par les ions carbonés constitue le traitement de choix pour les tumeurs radiorésistantes (Pommier et al., 2010).

Outre les ions carbonés, il existe d'autres ions lourds qui pourraient être utilisés lors des irradiations et parmi lesquels on retrouve l'hélium, le néon, le fer, etc... Ceux-ci seront abordés dans la partie suivante.

3. Autres ions lourds (Ne, He, Si, Ar et Fe)

En France, il existe un grand accélérateur national d'ions lourds (GANIL) dédié à la recherche. La majorité des irradiations sont réalisées avec des ions carbonés mais aussi argons, héliums ou encore uraniums (GANIL, 2019). Baselet *et al.* montrent sur des cellules endothéliales humaines d'artère coronaire (HCAECs) une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion des cellules immunitaires (ICAM-1). Les jonctions intercellulaires et l'adhésion plaquettaire (vWF, facteur de von Willebrand) sont quant à elles diminuées à 1 jour post-irradiation à 2 Gy aux ions fer (Fe) et rayons X (Baselet *et al.*, 2017). L'impact de l'irradiation sur les cellules endothéliales apparaît plus important et plus durable suite à une irradiation de 2 Gy aux ions Fe par rapport aux rayons X. Concernant l'inflammation et l'adhésion dans le compartiment endothélial, elles sont augmentées suite à une irradiation aux rayons X et diminuées après une irradiation au Fe (Baselet *et al.*, 2017). Par ailleurs, Peucelle *et al.* ont étudié l'utilisation des néons, de l'argon, du silicium et du fer pour une approche thérapeutique dans le cas des irradiations mini-faisceaux (MBRT, *minibeam radiation therapy*) car elles apparaissent efficaces pour le contrôle tumoral (Peucelle *et al.*, 2015). Ces études montrent une distribution de la dose avantageuse pour la pratique clinique. En effet, plus l'ion utilisé pour l'irradiation est lourd (avec un numéro atomique Z élevé) et plus la diffusion de la dose en bord latéral de faisceau est faible (Peucelle *et al.*, 2015). Ceci explique une efficacité biologique relative plus importante avec une irradiation aux ions lourds.

4. Radiothérapie vectorisée

Depuis 1990, des études cliniques s'intéressent à la radio-immunothérapie notamment pour le traitement des patients atteints d'un lymphome non hodgkinien (Goy *et al.*, 2016; Kramer *et al.*, 2018). La radio-immunothérapie est une radiothérapie vectorisée, c'est-à-dire qu'elle se base sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal, couplé à une source émettrice de particules alphas, dirigé sur un antigène tumoral. L'anticorps étant dirigé contre les cellules cancéreuses, cette technique permet de mettre en contact la source radioactive directement avec les cellules tumorales. En radio-immunothérapie, il existe plusieurs émetteurs de particules utilisés : bêta (β^-), alpha (α) et les électrons Auger (Menager *et al.*, 2016). Cette thérapie est intéressante dans

le cas d'un risque de toxicité trop important sur les tissus sains avec une radiothérapie conventionnelle notamment pour le traitement des métastases ou de lymphomes. Plusieurs études cliniques ciblant le CD20 ont mené à l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2002-2003 de deux anticorps radiomarqués pour le traitement des lymphomes folliculaires : ^{131}I -tositumomab et ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Navarro-Teulon et al., 2013). Le lymphome folliculaire est un type de lymphome non Hodgkinien. En effet, une étude clinique s'intéressant à l'efficacité de l'iode 131 (^{131}I -tositumomab) pour le traitement des patients atteints d'un lymphome folliculaire met en évidence une réponse complète chez 75 % de ces patients (Kaminski et al., 2005). De plus, la radio-immunothérapie est également retrouvée pour le traitement des tumeurs solides (Navarro-Teulon et al., 2013). Une étude clinique de phase II s'intéresse au traitement de patients atteints d'un médulloblastome. Cette étude montre qu'aucune mortalité n'est induite par le traitement correspondant à l'injection d'iode radioactif (^{131}I -3F8 et ^{124}I -3F8) chez ces patients (Kramer et al., 2018).

Pouget *et al.* utilisent ^{125}I , produisant des électrons Auger, qui est dirigée vers le noyau, le cytoplasme ou la membrane de cellules de carcinomes (A-431 et SK-OV-3) (Pouget et al., 2008). L' ^{125}I est plus nocif lorsqu'il est dirigé vers le noyau par rapport au cytoplasme ou à la membrane cellulaire. De plus, si l'on compare la toxicité pour ces deux dernières localisations, celle-ci est significativement plus importante lorsque l' ^{125}I est dirigé sur la membrane cellulaire par rapport au cytoplasme. Ainsi, les effets biologiques sur la membrane plasmique semblent importants à prendre en compte pour l'explication des dommages radio-induits observés. Ces résultats renforcent l'idée que seule l'utilisation de la survie cellulaire liée directement aux dommages à l'ADN ne suffit pas toujours à prédire le devenir cellulaire. De plus, cela suggère que des mesures biologiques ciblant les effets membranaires seraient d'un intérêt pour un futur modèle prédictif.

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que la valeur de l'EBR varie en fonction du temps, de la dose et de la mesure biologique considérée pour des rayons X. Or, les particules montrent une évolution dans le dépôt de la dose avec une meilleure précision combinée à une meilleure efficacité ($EBR > 1$). Cependant, le manque de recul des effets biologiques de ces types d'irradiation explique leur utilisation restreinte. Dans la littérature, les nouvelles données *in vitro* ainsi que les données cliniques préliminaires sur les rayonnements particulaire confirment de plus en plus que l'EBR varie de manière complexe notamment en fonction de la dose et du TEL (Mohan et al., 2017). Il serait donc intéressant de considérer l'EBR comme une variable en fonction du temps et de la dose et non plus comme une valeur fixe.

Le calcul de l'EBR des particules (Jones, 2017) se base sur l'EBR des photons qui est considéré comme égale à 1 pour des énergies comprises entre 0,1 et 3 MeV (Valentin, 2003). Or comme nous l'avons mis en évidence au cours des différentes études (Ben Kacem et al.; Paget et al., 2019), l'EBR des photons est différente de 1 et dépend de l'énergie mais aussi du débit de dose du rayonnement. La référence est un rayonnement X mais qui n'a pas été clairement défini. Doit-on utiliser un rayonnement de 220 kV à 0,6 Gy/min (en référence au rayonnement ^{60}Co (Gomolka et al., 2005)) ou un rayonnement à une plus forte énergie de 4 à 25 MeV et 2 Gy/min (rayonnement utilisé en clinique (Thariat et al., 2018)) ? Nous pouvons donc nous poser la question de la pertinence des valeurs d'EBR actuellement définies pour les différents types de rayonnements utilisés. En effet, que ce soit pour l'énergie ou le débit de dose, nous avons établi la preuve de concept que l'EBR des photons est différente de 1.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont montré l'intérêt d'implémenter des mesures biologiques multiparamétriques pour permettre de prédire de manière plus précise les effets radio-induits des nouvelles modalités d'irradiation au niveau du tissu sain. Nous avons ainsi mis en évidence un impact du débit de dose sur différentes mesures biologiques à la fois *in vitro* et *in vivo* pour des irradiations en dose unique à la même énergie. Dans ce premier axe de la thèse, des effets plus délétères sont alors observés au débit de dose le plus élevé. Des travaux complémentaires ont également montré un impact de l'énergie sur la réponse radio-induite. Ainsi, nos résultats vont dans le sens d'une EBR dépendante de l'énergie et du débit de dose qui est différente de 1 contrairement au postulat de la CIPR. Par ailleurs, au cours du deuxième axe de la thèse, nous avons montré un impact du débit de dose *in vitro* suite à des irradiations avec différents protocoles de fractionnement sur un continuum de BED. Les mesures de BED, utilisées en clinique pour comparer les protocoles de fractionnement, montrent des limites pour prédire la réponse radio-induite d'un tissu. En effet, une même valeur de BED signifierait une réponse radio-induite similaire. Cependant, nous observons une différence de réponse *in vitro* et *in vivo* après une irradiation à 4 MV et 2,5 Gy/min pour deux protocoles ayant une BED équivalente.

L'institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) est l'expert public en matière de la recherche et d'expertise sur les risques nucléaires et radiobiologiques. Il émet une expertise en réponse à la demande de l'autorité publique entre autres sur la protection des personnes contre les rayonnements ionisants. Nos différents résultats nous permettent de sélectionner quelques mesures biologiques *in vitro* à intégrer dans un futur modèle mathématique pour la prédiction du risque dans le domaine médical. Ainsi, à l'aide d'une mesure biologique à des temps précoces, ce modèle semblera à terme être utile pour assurer l'expertise de l'IRSN de façon rapide et fiable pour la radioprotection des patients traités par radiothérapie.

Notre étude soulève également une limite quant aux caractéristiques physiques du rayonnement de référence à prendre en compte et qui n'est à ce jour pas clairement défini. Au vu des nombreuses études cliniques et du recul thérapeutique, le rayonnement X à haute énergie et à un débit de dose de 2 Gy/min peut raisonnablement être considéré comme un rayonnement de référence. L'EBR des photons est variable en fonction du temps, de la dose et de la mesure biologique. Le calcul de l'EBR des particules est basé sur l'EBR des photons qu'il est primordiale de définir de façon précise pour permettre une optimisation des traitements en radiothérapie.

Annexes

Annexe 1 : Liste des 44 gènes « signature sénescence ».

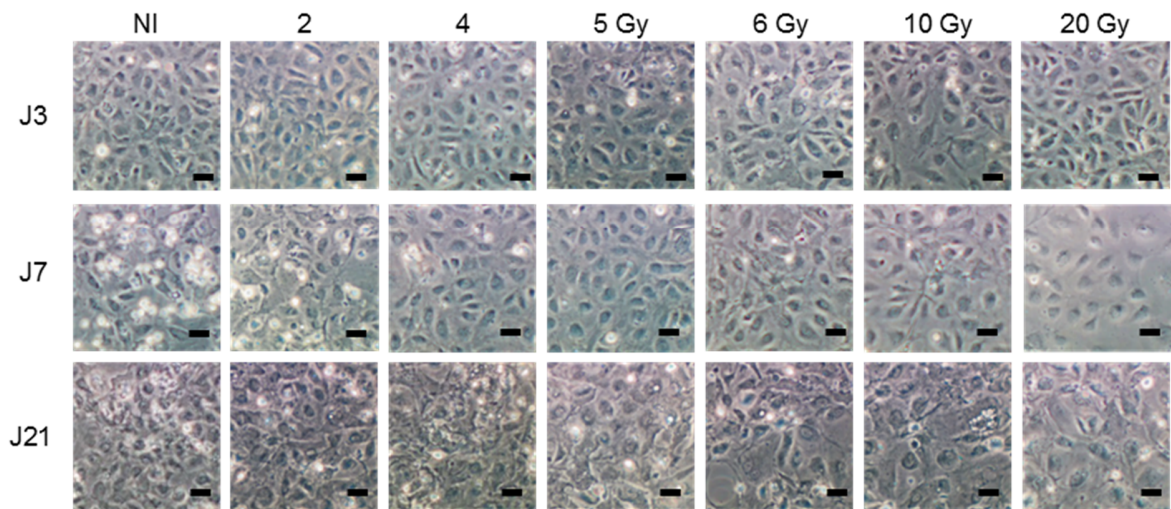
Les gènes sont impliqués dans plusieurs processus biologiques en plus de la sénescence comme l'inflammation, le cycle cellulaire ainsi que la survie cellulaire.

Gène		Code Sonde
ACTA2	Actin Alpha 2 Smooth Muscle Aorta	Hs00909449_m1
BBC3	BCL2 Binding Component 3	Hs00248075_m1
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5 (Survivin)	Hs00978503_m1
CD44	CD44 molecule	Hs01075861_m1
CDK1	Cyclin-Dependent Kinase 1	Hs00938777_m1
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A	Hs00355782_m1
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	Hs00923894_m1
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Hs00929873_m1
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Hs99999083_m1
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor	Hs00236330_m1
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Hs00169255_m1
HEY2	Hes-Related family BHLH Transcription Factor with YRPW	Hs00232622_m1
IL1B	Interleukin 1, beta	Hs01555410_m1
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	Hs00985639_m1
IL8	Interleukin 8	Hs00174103_m1
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Hs00765730_m1
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Hs01126606_m1
SMAD7	SMAD family member 7	Hs00998193_m1
TAGLN	Transgelin	Hs00162558_m1
TP53I3	Tumor Protein P53 Inducible Protein 3	Hs00936520_m1
IGFBP3	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3	Hs00426287_m1
IGFBP5	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5	Hs00181213_m1
IGFBP7	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 7	Hs00266026_m1
MMP 7	Matrix Metalloproteinase 7	Hs01042796_m1
MMP10	Matrix Metalloproteinase 10	Hs00233987_m1
CDKN2D (p19)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2D	Hs00176481_m1
CAV1	Caveolin 1	Hs00971716_m1
CDKN1B (p27)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B	Hs01597588_m1
CDKN2B (p15)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B	Hs00793225_m1
EP300	E1A Binding Protein P300	Hs00914223_m1
LMNB1	Lamin B1	Hs01059210_m1
NOTCH1	Notch 1	Hs01062014_m1
PAK4	P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 4	Hs01100061_m1
RB1	Retinoblastoma 1	Hs01078066_m1
SIRT1	Sirtuin 1	Hs01009006_m1
B2M	Beta-2-Microglobulin	Hs00187842_m1
PTPRJ (DEP-1)	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type J	Hs01119326_m1
STX4	Syntaxin 4	Hs00190266_m1
LAT2 (NTAL)	Linker for Activation of T Cells Family Member 2	Hs00247916_m1
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Hs00601975_m1
IL1A	Interleukin 1, alpha	Hs00174092_m1
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1	Hs00989786_m1
SELP	P-Selectin	Hs00174583_m1
SMAD3	SMAD family member 3	Hs00232219_m1
ACTB	actin, beta	Hs99999903_m1
PGK-1	phosphoglycerate kinase 1	Hs99999906_m1
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	Hs00177083_m1
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1

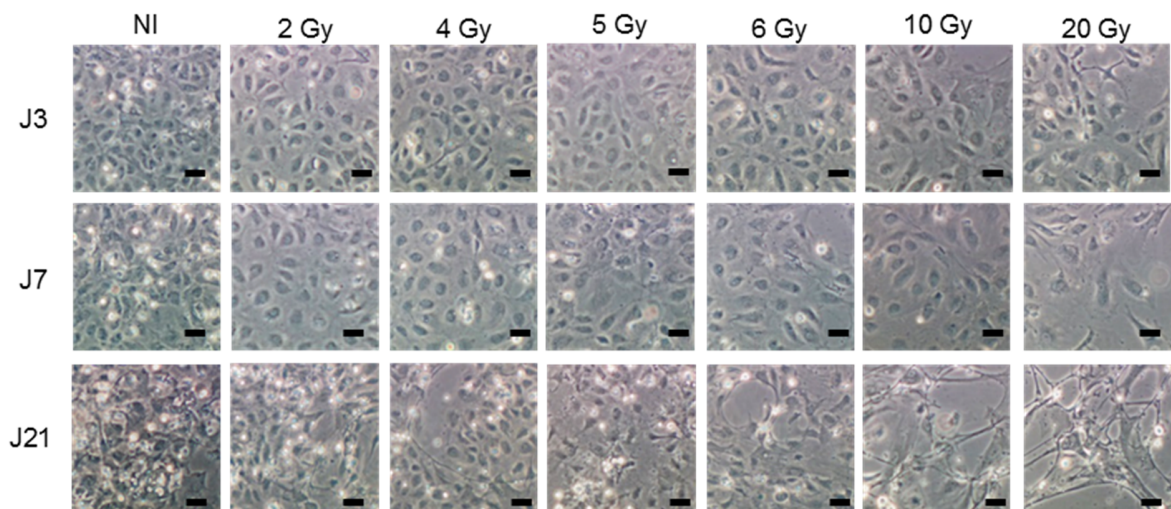
Annexe 2 : Morphologie cellulaire des HUVECs à J3, J7 et J21 suite à une irradiation à deux débits de dose.

Les HUVECs ont été irradiées avec différentes doses (0, 2, 4, 5, 6, 10 et 20 Gy) soit à 0,63 Gy/min (A) soit à 2,5 Gy/min (B). La barre d'échelle correspond à 50 μm .

A 4 MV - 0,63 Gy/min



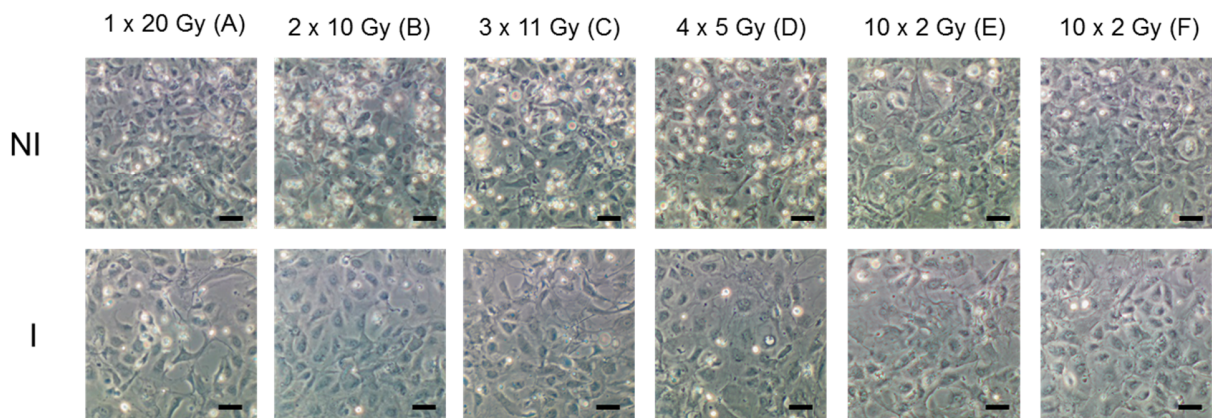
B 4 MV - 2,5 Gy/min



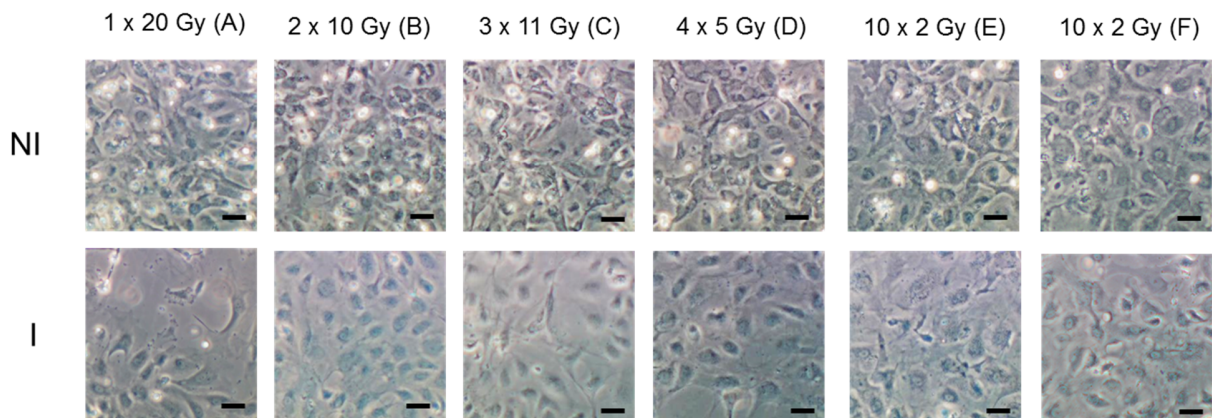
Annexe 3 : Morphologie cellulaire des HUVECs à J7 suite à une irradiation fractionnée à deux débits de dose.

Les HUVECs ont été irradiées avec différents protocoles de fractionnement 1 x 20 Gy (A), 2 x 10 Gy (B), 3 x 11 Gy (C), 5 x 4 Gy (D) et 10 x 2 Gy (E et F) soit à 0,63 Gy/min (A) soit à 2,5 Gy/min (B). Les cellules irradiées au protocole E ont un changement de milieu 1 h avant la dernière fraction d'irradiation et le protocole F à 3 jours après la dernière fraction d'irradiation. La barre d'échelle correspond à 50 µm.

A 4 MV - 0,63 Gy/min



B 4 MV - 2,5 Gy/min



Annexe 4 : 1^{er} article supplémentaire « Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness : comparison between 220 kV and 4 MV »

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**

nature research

OPEN

Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness: comparison between 220 kV and 4 MV

Received: 19 June 2019
Accepted: 20 September 2019
Published online: 04 October 2019

Vincent Paget¹, Mariam Ben Kacem¹, Morgane Dos Santos², Mohamed A. Benadjaoud³, Frédéric Soysouvanh¹, Valérie Buard¹, Tarlet Georges¹, Aurélie Vaurijoux², Gaëtan Gruel^{1,2}, Agnès François¹, Olivier Guipaud¹ & Fabien Milliat¹

Based on classic clonogenic assay, it is accepted by the scientific community that, whatever the energy, the relative biological effectiveness of X-rays is equal to 1. However, although X-ray beams are widely used in diagnosis, interventional medicine and radiotherapy, comparisons of their energies are scarce. We therefore assessed *in vitro* the effects of low- and high-energy X-rays using Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by performing clonogenic assay, measuring viability/mortality, counting γ -H2AX foci, studying cell proliferation and cellular senescence by flow cytometry and by performing gene analysis on custom arrays. Taken together, excepted for γ -H2AX foci counts, these experiments systematically show more adverse effects of high energy X-rays, while the relative biological effectiveness of photons is around 1, whatever the quality of the X-ray beam. These results strongly suggest that multiparametric analysis should be considered in support of clonogenic assay.

Relative biological effectiveness (RBE) is the ratio of biological effectiveness of one kind of ionizing radiation relative to another. Several studies have focused on X-rays and their effects upon cells, but few have directly compared two different X-ray beams. Moreover, there is a consensus that the RBE of X-rays (photons; energy from 0.1 to 3 MeV) is equal to 1, whatever the energy of the beam¹. RBE measurements are essentially based on clonogenic assay², which is considered the gold standard. This assay is based on the ability of a single cell to grow into a colony after a stress³⁻⁵. Representation of the survival fraction (SF) as a function of the dose leads to survival curves, which are modeled by the linear-quadratic model (LQ-model)⁶. Despite these considerations, we think that clonogenic assay should be strengthened by other biological measurements to improve the prediction of cellular outcome after exposure to ionizing radiation. Interestingly, some authors also support the fact that this LQ-model is inappropriate for high dose per fraction⁷.

To validate this proof of concept, we exposed human normal endothelial cells (HUVECs) to low- and high-energy X-rays at the same doses and dose rates. HUVECs were chosen as a biological model due to their capability to form clones in dishes^{8,9} and because vascular injury is one of the most common effects of radiotherapy on normal tissues and tumors^{10,11}. Finally, based on work currently in progress in our group (data submitted

¹Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of MEDical Radiobiology (LRMed), Fontenay-aux-Roses, 92260, France. ²Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental exposures (LRAcc), Fontenay-aux-Roses, France. ³Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Fontenay-aux-Roses, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.P. (email: vincent.paget@irsn.fr)

elsewhere in literature), HUVECs are the ones which have the higher response to irradiation among several other human primary endothelial cells (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAEC), Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-D), Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells (HIMEC), Human Lung Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-L) or Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-C)). Irradiation at 220 kV using our Small Animal Radiation Research Platform (SARRP, Xstrahl) was chosen as it is considered as equivalent to the classic beam references such as ^{60}Co γ rays¹². In order to be relevant to beams classically used in radiotherapy, the Linear Accelerator (LINAC) Elekta Synergy Platform (ELEKTA S.A.S. France, Boulogne, France) delivering 4 MV X-rays was chosen to assess the effects of high-energy X-rays *in vitro*.

HUVECs were irradiated with high- (4 MV) or low- (220 kV) energy X-rays in clonal conditions (clonogenic assay) and at confluence for all other assays (viability/mortality, γ -H2AX foci, cell proliferation and senescence). The overall results clearly indicate that, excepted for H2AX foci up to 10 hours post-irradiation, high-energy X-rays significantly induce more adverse effects in HUVECs than low-energy X-rays. Our findings clearly show that the RBE of X-rays (energy from 0.1 to 3 MeV) is not equal to 1.

Results

Clonogenic assay and cell viability. Cell survival curves show a classic dose-dependent decrease of the survival fraction for both irradiations (Fig. 1A). Furthermore, the statistical analysis method used⁹ and the RBE calculation (ratio of doses 220 kV/4 MV for a given SF) has shown a significant difference between the two kinds of irradiation (green curve in right panel on Fig. 1A), numerical values of calculated RBE being reported on Supplementary Table S1. These results were corroborated by cell viability counting using the trypan blue method (Fig. 1B), showing higher cell viability after irradiation at 220 kV compared to 4 MV. A statistical representation of 220 kV/4 MV cell viability is shown in Fig. 1C, showing that, whatever the time or the dose, cell viability was significantly higher at 220 kV compared to 4 MV irradiation. A “RBE” calculation (ratios for a given dose and time between the two beams) is reported on Supplementary Fig. S1, showing a wide range of values depending on the end-point.

DNA double-strand break measurements (γ -H2AX foci). We ensured that HUVECs were at around 80% in G1 phase (Supplementary Fig. S2) before 4 MV or 220 kV irradiation. Whatever the modality of irradiation, we observed, from 30 min to 10 h post-irradiation, a classic decrease of the number of γ -H2AX foci per nucleus over time (Fig. 2). Nevertheless, no significant difference in γ -H2AX foci number per nucleus was observed between the two kinds of irradiation for the same end-point/dose (Fig. 2).

Proliferation (Click-iT Technology) (Flow Cytometry). Analysis set-up for Click-iT EdU experiments are described in Supplementary Figs S3 and S4. Proliferation experiments (Fig. 3A.) showed that, at 24 hours (D1) post-irradiation, whatever the dose, a significantly ($p < 0.0001$) higher percentage of EdU-positive cells was obtained at 220 kV compared to 4 MV (Fig. 3B). At 48 (D2) and 72 (D3) hours post-irradiation (Fig. 3C,D), the percentage of EdU-positive cells was not significantly different between the two energies, except at the dose of 2 Gy.

Cell Division (CellTrace Technology)/ Senescence (C_{12} FDG) (flow cytometry). 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL) staining of HUVECs 7 days after 20 Gy irradiation at 4 MV was performed to ensure that senescence was induced after irradiation (Supplementary Fig. S5). Thus, analysis set-up for flow cytometry CellTrace/ C_{12} FDG experiments is described in Supplementary Fig. S6. This bi-parametric approach was chosen, as senescent cells are metabolically active but unable to divide. Our experiments demonstrate that when the dose increases, the number of senescent cells increases (Fig. 4A,B) compared to control and the number of divided cells decreases as well (Fig. 4C), whatever the energy of the beam. Nevertheless, our results systematically show, for each dose, a significant difference between 4 MV and 220 kV irradiations. Indeed, whatever the dose, more senescent cells (Fig. 4B) and fewer divided cells (Fig. 4C) were obtained after 4 MV than 220 kV irradiation.

RT-qPCR (customized Taqman Low-Density Assay [TLDA]). Unsupervised hierarchic clustering showed significant differences between the two kinds of irradiations (Fig. 5). Two big clusters were identified. The first one, named “cluster 1”, contains all controls and 2 Gy plus 4 Gy at 220 kV. Within this “cluster 1”, we also have two sub-groups, both controls on the one hand (“sub-group 1a”), and on the other hand both 2 Gy plus 4 Gy at 220 kV (“sub-group 1b”). The second big cluster, called “cluster 2”, hosts all other conditions and is also divided in two sub-groups: “sub-group 2a” which contains 4 Gy at 4 MV and both 6 Gy conditions, and “sub-group 2b” which hosts both 20 Gy conditions. As an example of genes analysis, IL-8, IL-6 and MMP10 which are ones of the key markers of the SASP, were significantly increased with the dose 7 days post-irradiation (Supplementary Fig. S7) for both beams.

Discussion

To date, no extensive study has compared two beams of X-rays with high and low energy at the same dose rate or has combined a wide range of biological outputs. Only few studies have reported a higher RBE for X-rays compared to the reference beam (200–250 kV)^{12–15}. Nevertheless, these studies were performed on very low energy X-rays (below 50 kV) and not necessarily at the same dose rate than the reference X-rays beam. Furthermore, RBE can be determined by using different endpoints such as clinical outcomes but are essentially based on proton beams in hadron therapy^{16–18}. Thus, our study focused on cellular outcome up to 7 days after 220 kV and 4 MV X-ray irradiation, using the same dose rate (2.5 Gy/min), and covering a wide range of doses (0, 2, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy).

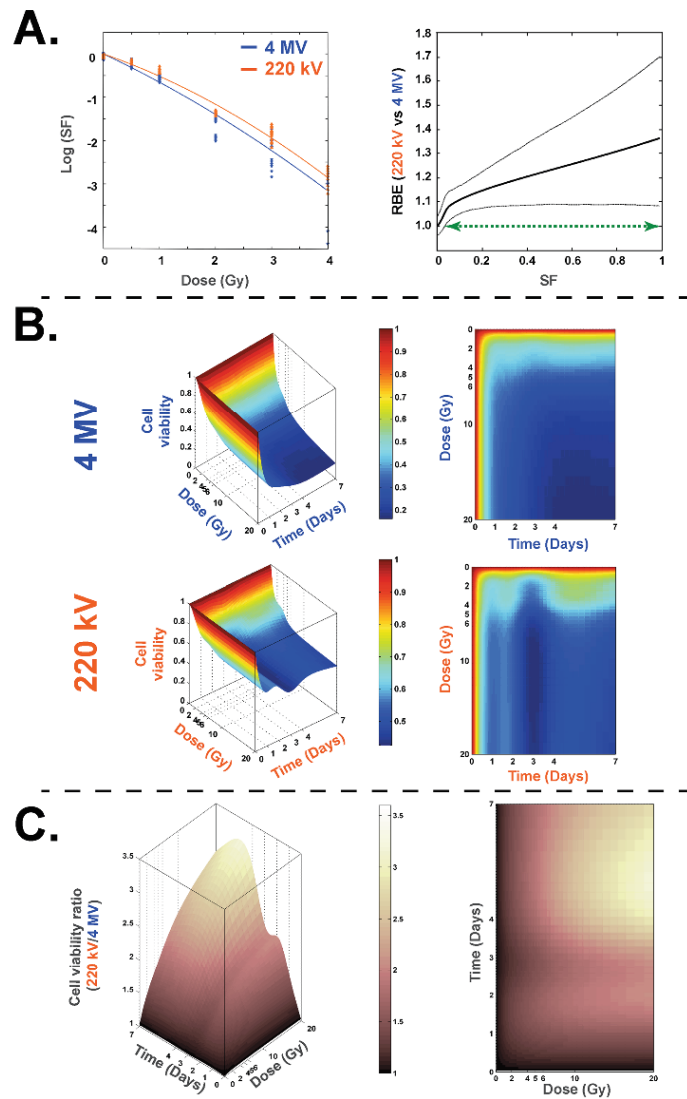


Figure 1. Clonogenic assay and cell survival at 220 kV and 4 MV. (A) left panel: Survival fraction (SF) of HUVECs irradiated at 220 kV (orange curve) and 4 MV (blue curve). Right panel: the associated RBE curve defined as a ratio of doses for a given SF (solid line) and its associated bootstrap confidence intervals (dotted lines). The green arrow representing the range of SF wherein the value of RBE is significantly different from 1. (B) Representations of 3D and 2D curves of cell survival measures with trypan blue counting method for 220 kV and 4 MV. (C) Representations of 3D and 2D curves of cell viability ratio [220 kV/4 MV].

Our statistical analysis of the clonogenic assay shows that for the whole range of doses tested (0 to 4 Gy) the two survival curves are significantly different (indicated by green arrow in Fig. 1A, right panel). Referring to the classic SF 2 Gy¹⁹, we obtained an RBE around 1.246 (220 kV/4 MV). When irradiation was performed on a

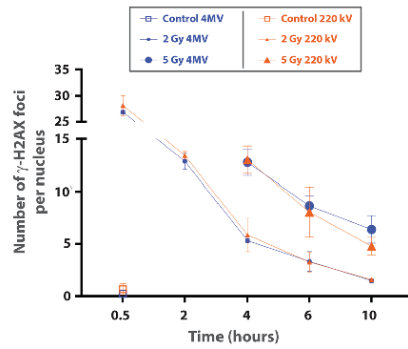


Figure 2. DNA double-strand break measurements (γ -H2AX foci). Number of γ -H2AX foci in G0/G1 primary HUVECs as a function of time since exposure. The analyses were performed on cells exposed to irradiation with 4 MV (blue curves) and 220 kV (orange curves) beams. Mean number of γ -H2AX foci per nucleus for non-irradiated cells at 30 min are represented by squares, small symbols correspond to the mean number of γ -H2AX foci per nucleus for the 2 Gy dose and large symbols correspond to 5 Gy irradiation. The mean \pm standard deviation (s.d.) was calculated from 2 independent experiments. For each condition, the average number of analyzed cells was around 600.

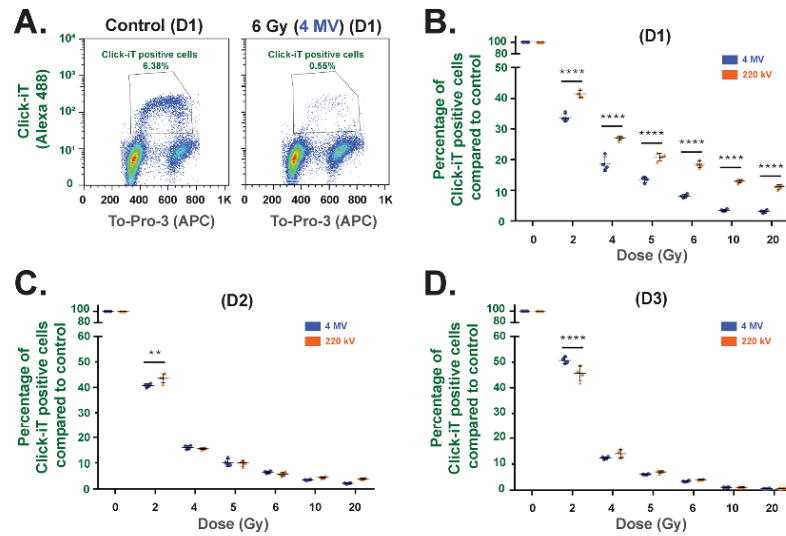


Figure 3. Proliferation measurements using Click-iT technology. (A) Example of flow cytometry measurements obtained at day 1 for control and 6 Gy irradiation at 4 MV. (B to D) Percentage of Click-iT positive cells for 220 kV and 4 MV irradiations at day 1 (B), day 2 (C) and day 3 (D) post-exposure. Each dot represents one independent experiment (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, two-way Anova).

confluent HUVEC monolayer, the modelling of cell survival (Fig. 1B) differed significantly over time and over the whole range of doses between the two modalities of irradiation, testifying to the greater deleterious effect in the cell population when the X-ray energy increases (Fig. 1C). Interestingly, it is now known that exposure to very low-energy X-rays (25–30 kV) leads to high levels of DNA damage¹² or micronuclei¹⁵. But, surprisingly, our two beams are within the range of energy from 0.1 to 3 MeV for which an RBE of 1 is classically ascribed¹.

In order to validate these findings, we extended the work to other biological output measurements. DNA damage was measured at the same time according to the distribution of the number of γ -H2AX foci per nucleus

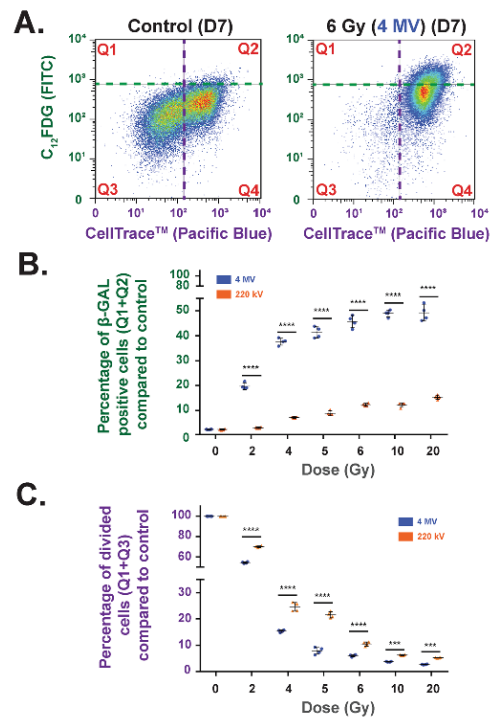


Figure 4. Cell Division (CellTrace Technology)/ Senescence (C₁₂FDG) (Flow Cytometry) bi-parametric analysis (A) Example of flow cytometry measurements obtained at D7 for control and 6 Gy irradiation at 4 MV. (B) Percentage of β-GAL-positive cells (Q1 + Q2) compared to control at 4 MV (blue dots) and 220 kV (orange dots) irradiations. Each dot represents one independent experiment (****p < 0.001, one-way Anova). (C) Percentage of divided cells (Q1 + Q3) compared to control for 220 kV (orange dots) and 4 MV (blue dots). Each dot represents one independent experiment (****p < 0.001, ****p < 0.001, one-way Anova).

(Fig. 2). The H2AX method was chosen as it is very sensitive in detecting DNA double-strand breaks²⁰ and predicts *in vivo* genotoxicity²¹. As the cell cycle phase can strongly affect the results after irradiation²², we ensured that HUVECs were at around 80% in G1 phase (Supplementary Fig. S2) before 4 MV or 220 kV irradiation. This state of confluency mimics a synchronized cell population without performing serum depletion, which is known to induce cell death, depending on the cell type. Regarding the number of γ-H2AX foci per nucleus from 30 min to 10 h post-irradiation at the doses of 2 and 5 Gy, we found no significant difference between the two kinds of beams (Fig. 2). Even though the mean number of γ-H2AX foci per nucleus classically decreases over time, Click-iT experiments 6 hours post-irradiation at 4 MV (Supplementary Fig. S4) showed that incorporation of EdU is strongly altered for doses above 6 Gy. This may suggest that complex damage is induced and is not only based on DNA double-strand breaks. Moreover, it would be interesting to further investigate oxidative stress induced by both beams by measuring reactive oxygen species (ROS) with a CM-H₂DCFDA probe²³ or by glutathione depletion. Also, mitochondrial dysfunction could be another trail to investigate, in order potentially to shed light on differences between the two kinds of beams. Such a phenomenon has been reported after exposure to ionizing radiation²⁴ and, more particularly, in human endothelial cells from lung²⁵.

Radiation-induced senescence is now well described and is characterized by an increase of cell size and β-galactosidase activity²⁶. It has been hypothesized that induction of senescence by ionizing radiation not only mediates the ignition of pulmonary fibrosis, but also plays a critical role in the progression of this disease²⁷. To verify radiation-induced senescence *in vitro* in HUVECs, we performed staining with X-GAL, a widely used biomarker^{28,29}. As reported by Debacq-Chainaux²⁹, we used bafilomycin A1 pre-treatment of the samples to be more specific to β-galactosidase activity linked with stress-induced senescence. X-GAL staining of HUVECs 7 days after 20 Gy irradiation at 4 MV (Supplementary Fig. S5) was strong, corroborating the literature data³⁰. Furthermore, staining was localized on accumulated lysosomes within enlarged cells with more flattened morphology, which are characteristics of senescent cells as already reported in the literature²⁶. To compare

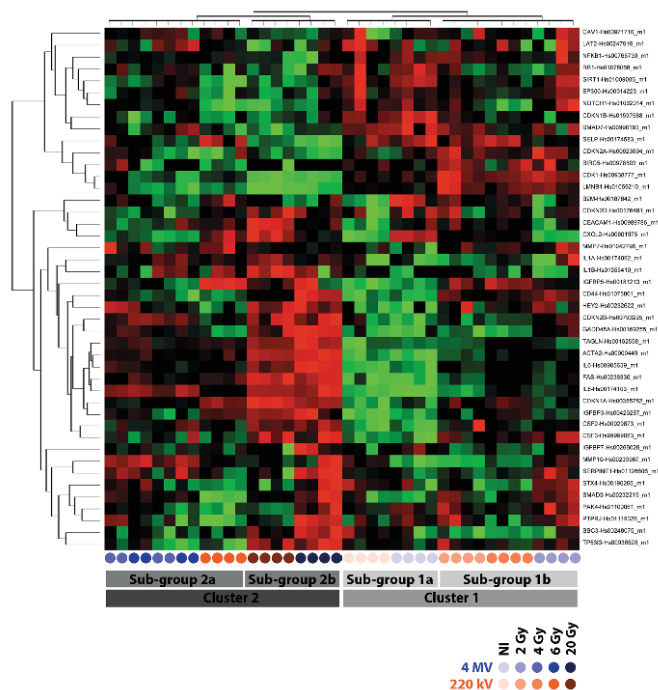


Figure 5. RT-qPCR. Assay heat map illustrating differentially expressed genes among 44 genes measured at day 7 post-irradiation. For one gene considered, red dots represent overexpression and green dots represent downregulation. Corrected p-values using the Benjamini-Hochberg method, $p < 0.05$. ($n = 4$ independent experiments per condition). Blue rounds correspond to 4 MV and orange rounds to 220 kV, the color gradient indicating the dose.

radiation-induced senescence for the two beams, we used flow cytometry with C_{12} FDG instead of X-GAL staining. By fluorescence measurement within the cell, C_{12} FDG staining i) is very sensitive for a very large number of events, and ii) is a representative response of the whole cell monolayer²⁹. Moreover, senescent cells are blocked in the cell cycle³¹, but remain metabolically active. Interestingly, we have observed that at higher doses, fewer cells are able to re-enter division after irradiation (Fig. 3). Thus, our data fully corroborate the phenomenon recently reported by Reyes *et al.*³², who have demonstrated that fluctuations in p53 signaling allow escape from cell-cycle arrest, which we also observed 7 days after irradiation when the population of “divided cells” (Q1 + Q3) decreased according to the dose (Fig. 4). With these two approaches, we have shown that after irradiation the cellular outcome is driven to undivided and positive β -galactosidase cells, two markers of senescence. Whatever the beam, the percentage of senescent cells increases according to the dose, but remains significantly higher after 4 MV irradiation compared to 220 kV.

Finally, we performed gene analysis by custom TLDA of 44 genes reported to be involved in the senescence process and the senescence-associated secretory phenotype (SASP)^{26,31,33}. The unsupervised hierarchical clustering performed on custom TLDA showed a macroscopic clustering on the dose rather than the energy (Fig. 5). Indeed, several genes (such as p16 (CDKN1A) or p21 (CDKN2A)) are very well-known to be deregulated by irradiation at delayed times. This could partly explain the macroscopic clustering according to the dose only seven days post-irradiation (Supplementary Fig. S7A) for both beams. Furthermore, this upregulation was systematically higher at 4 MV than at 220 kV (Supplementary Fig. S7A), fully corroborating our C_{12} FDG results. Furthermore, BIRC5, which encodes for survivin, an inhibitor of apoptosis, was not detected at 4 MV since the dose of 6 Gy (on 3 of 4 experiments) (Supplementary Fig. S7B). This perfectly corroborates our results on cell viability (Fig. 1), which reported a significant higher mortality at 4 MV compared to 220 kV. Finally, Cdk-1, a cyclin involved in the progression of phases S and G2 within cell cycle, was logically found decreased according to the dose for both

beams; but this downregulation was systematically higher at 4 MV than at 220 kV (Supplementary Fig. S7C), fully corroborating our results of proliferation and senescence (Figs 3 and 4).

From a clinical point of view, modern radiotherapy also uses modifications of energy electron beam i.e. flattening-filter-free (FFF), thus assuming that biological effects are the same for a flattened beam. However, our current work using multiparametric biologic readouts is the proof of concept that the RBE of X-rays depends on the energy of the beam. This clearly raises the question as to whether or not, in radiotherapy, the biological effects of X-rays for normal tissues and/or tumors are the same, whatever the energy of the beam.

In conclusion, we observed more adverse effects in HUVECs after 4 MV compared to 220 kV X-rays, clearly establishing that the RBE for X-rays of different energies is not equal to 1 and can vary strongly depending on the assay. Furthermore, these multiparametric assays can provide an answer in the comparison of two beams in the case of high doses (i.e. doses for which a clonogenic assay cannot be performed). Such an approach could also be useful in comparing the RBE with dose rate modifications (in connection or not with energy modification), as conventional radiobiological models also fix the RBE at 1.

Methods and Materials

Irradiation facilities: SARRP and LINAC. Irradiation dosimetry and the 220 kV protocol are already described in the literature⁹. To avoid dosimetry errors and to keep X-ray field homogeneity, only 4 of 6 wells were used for *in vitro* experiments on the SARRP platform². Sterile thin films were used to replace plastic cover on plates during irradiation, to avoid any attenuation of the X-ray spectrum⁹. Irradiation with high-energy X-rays was performed using an Elekta Synergy Platform (ELEKTA S.A.S. France, Boulogne, France) delivering 4 MV X-rays. With both facilities (SARRP and LINAC), irradiations were performed under similar conditions: plate, cell culture medium and a dose rate of about 2.5 Gy/min in air kerma free in air. The uncertainty in the dose rate measurement was about 5% and 7% for SARRP and LINAC irradiations, respectively at $k=2$.

Cell culture. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, C2519A) from LONZA were cultured in EGM-2 MV culture medium (LONZA) according to the manufacturer's instructions and placed in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity. For all the experiments, HUVECs at passage 2 were seeded at 3×10^3 cells/cm² and routinely cultured for 5 days to reach confluent monolayers. HUVECs were then detached and seeded (3×10^3 cells/cm², passage 3), and cultured for 5 days to reach confluent monolayers for all experiments (excluding the clonogenic assay where specific conditions are detailed in the corresponding section).

Clonogenic assay. Cells were irradiated on LINAC or SARRP (0 (control), 0.5, 1, 2, 3 and 4 Gy) by following a protocol already described in the literature⁹. Briefly, cells were seeded in 6-well culture plates (1×10^3 cells/well for doses below 2 Gy, 2×10^3 cells/well for doses above 2 Gy) and, three hours after plating, were irradiated at different doses (0 (control), 0.5, 1, 2, 3 and 4 Gy). After this adhesion interval, microplates were irradiated on the SARRP at 220 kV (using additional 0.15 mm copper filtration) or at LINAC at 4 MV, both at the same dose rate of 2.5 Gy/min. Nine days after irradiation, cells were fixed for 15 min with 4% final (v/v) paraformaldehyde (in Phosphate-Buffered Saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺) and then stained for 30 min with Giemsa (SIGMA ALDRICH) at a final concentration of 10% (v/v) (in milliQ water). Colonies containing more than 60 cells (corresponding to at least 6 doubling times)^{4,9} were counted.

Viability/Mortality (trypan blue). At each endpoint, supernatant was collected; cells were trypsinized and added to the respective supernatant. Each sample was centrifuged for 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS. Cells were manually counted under the microscope by using trypan blue (145-0013, BIO-RAD Laboratories S.A.) and 10-chambered slides with a hemocytometer-type grid (87144, KOVA Glasstic Slide 10 with Grids).

DNA double-strand break measurements (γ -H2AX foci). *Immunofluorescence staining.* Cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution (199431LT, AFFYMETRIX), washed with 1X PBS (14190-094, THERMO FISHER SCIENTIFIC), permeabilized with 0.5% Triton X-100 (T8787, SIGMA ALDRICH) and then washed with 1X PBS. Antibodies were diluted in 1X PBS with 2% (w/v) BSA (bovine serum albumin; A9418, SIGMA ALDRICH). IgG1 monoclonal anti-phospho-histone H2AX (Ser139) antibody (dilution of 1/800; 05-636, clone JBW301, UPSTATE) was incubated with cells for 1 hour at room temperature (RT). Cells were then washed and incubated for 1 hour at RT with the secondary antibody goat anti-mouse IgG1 (γ 1) coupled to Alexa Fluor 488 (2 mg.mL⁻¹; A21121, THERMO FISHER SCIENTIFIC). After washing, DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.2 μ g.mL⁻¹; 1050 A, EUROMEDEX) and mounted with ProLong Antifade Reagents (P36930, THERMO FISHER SCIENTIFIC).

Image acquisition and analysis. Images were acquired and analyzed with the Scan[^]R platform (OLYMPUS), as described previously^{34,35}. 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 R² CCD camera (HAMAMATSU) and a motorized SCAN IM IX2 stage (MARZHAUSER). An edge segmentation algorithm based on Canny's method³⁶ was used to detect nuclei in the DAPI channel (main object) and γ -H2AX foci in the FITC channel (sub-object 1). A first selection based on the area and circularity of the nuclei excluded clusters of cells and cellular debris. Cells were then selected in G0-G1 phase of the cell cycle by assessing the integrated intensity of the DAPI signal (DNA content) combined with the integrated intensity of the γ -H2AX signal in the entire nucleus, which increased dramatically in S phase^{34,37}. Gamma-H2AX foci in the objects within the gate formed by the intersection of the two regions were then analyzed.

Proliferation (Click-iT Technology) (Flow Cytometry). Aphidicolin (5 μ M final, SIGMA ALDRICH, ref A0781) was added to negative control conditions 3 hours before the endpoint. Then, two hour before the endpoint (24; 48 or 72 hours post-irradiation), EdU from Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit (C10420, THERMO FISHER SCIENTIFIC) was added to the cell culture medium at 10 μ M final concentration. The monolayers of HUVECs were rinsed twice with PBS, cells were trypsinized, fixed/permeabilized and the Click-iT EdU Alexa Fluor 488 reaction was performed according to the manufacturer's protocol. Finally, the pellet was resuspended in 1 mL of PBS before acquisition on a FACS Canto II. In order to avoid compensation, DNA was stained for 30 min at RT using To-Pro-3 (0.5 μ g/mL final) and was recorded on the APC channel³⁸. Acquisition of data was performed on a FACS Canto II (3-laser, 4-2-2 configuration) using FACS Diva software. Four independent experiments were performed for each condition. Data analysis was performed post-acquisition using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC). A first analysis was done on size (FSC: Forward scatter)/granulometry (SSC: Side scatter) parameters, to collect cells (gate G1) and to remove fragmented cells and debris (Supplementary Fig. S3, left row). The gated events (gate G1) were then plotted on an APC-A (intensity)/APC-W (size) graph in order to remove doublets and to perform analysis on the single events population determined by the gate G2 (Supplementary Fig. S3, middle row). Finally, events on gate G2 were plotted on an Alexa 488/APC-A dot plot to determine the percentage of EdU-positive cells (gate G3) (Supplementary Fig. S3, right row). Analysis was performed on 4 independent experiments, where at least 5×10^4 single cells per replica were recorded on gate G2. Acquisitions were performed using the following settings: DNA content was recorded on the APC channel (filters λ_{em} : 660/20 nm) after 633 nm HeNe solid state (17 mW output) laser excitation, while EdU-positive cells were detected on the Alexa Fluor 488 channel (filters λ_{em} : 530/30 nm) after air-cooled 488 nm solid state (20 mW output) laser excitation.

Senescence (C12FDG)/Generation (CellTrace) (Flow Cytometry). Before irradiation, confluent monolayers of HUVECs were stained using CellTrace violet (Ref C34557, THERMO FISHER SCIENTIFIC). Cells were rinsed twice with PBS $1 \times$ (with Ca^{2+} and Mg^{2+}), and then stained for 20 min with 7.5 μ M final of CellTrace violet in PBS $1 \times$ (with Ca^{2+} and Mg^{2+}). After staining, the staining solution was removed and the monolayers were rinsed twice with fresh cell culture medium to neutralize excess CellTrace violet. Cells were then irradiated at 2, 4, 5, 6, 10 or 20 Gy + control (non-irradiated). Seven days after irradiation, senescence experiments were performed by following Debacq-Chainiaux *et al.*²⁹ using 1-hour pre-treatment with bafilomycin A1 (100 nM final), followed by addition of C_{12} FDG (33 μ M final) for 2 hours. Supernatant was removed, monolayers were rinsed twice with PBS $1 \times$ (without Ca^{2+} and Mg^{2+}), cells were trypsinized and centrifuged for 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS before acquisition on a FACS Canto II. To increase the robustness of the results, a cell viability reporter was added to each sample: the To-Pro-3³⁸ before the acquisition of the data on a FACS Canto II (3-laser, 4-2-2 configuration) using FACS Diva software, 4 independent experiments were performed for each condition. Data analysis was performed post-acquisition using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC). A first analysis was done on size (FSC: Forward scatter)/granulometry (SSC: Side scatter) parameters, to collect cells (gate G1) and to remove fragmented cells and debris. Triton 0.06X final was instantly used as positive control (Supplementary Fig. S6A) to ensure good detection of dead cells. This first step allowed us to assess cell viability (on the APC channel (filters λ_{em} : 660/20 nm) after 633 nm HeNe solid state (17 mW output) laser excitation) and to determine the gate (G2) where at least 5×10^4 living cells per replica were recorded (Supplementary Fig. S6B,C). Then, upon this gated event (Supplementary Fig. S6B,C), the C_{12} FDG signal was collected on the FITC channel (filters λ_{em} : 530/30 nm) after air-cooled 488 nm solid state (20 mW output) laser excitation, while the CellTrace violet signal was collected on the Pacific Blue channel (filters λ_{em} : 450/50 nm) after 405 nm solid state (30 mW fiber power output) diode excitation. Combining CellTrace violet and C_{12} FDG measurements, a bi-parametric representation was then possible and distinguished two kinds of populations: senescent cells called β -GAL+ cells (Q1 + Q2) where a cut-off was set at 2% in control cells (Supplementary Fig. S6D), and "divided cells" called CellTrace- cells where the cut-off was set between the two peaks in control cells (Supplementary Fig. S5D). Strictly the same cut-offs were applied for each irradiated condition. An example for a 6 Gy irradiation at 4 MV is reported in Supplementary Fig. S6E.

RT-qPCR (custom TLDA). Seven days after irradiation, HUVECs were harvested with 600 μ L per sample of mirVana miRNA Isolation Kit lysis buffer (THERMO FISHER SCIENTIFIC, AM1560). Total RNA was quantified on an ND-100 NanoDrop and samples were stored at -80°C . Total RNA was diluted to 50 ng/ μ L (final concentration) and 500 ng was used to perform RT-PCR. cDNAs were loaded on customized TLDA. The PCR protocol was as follows: a preparation step (50 $^\circ\text{C}$ for two minutes followed by 10 min at 94.5 $^\circ\text{C}$), then 40 cycles including denaturation (97 $^\circ\text{C}$, 3 min), hybridization of primers and elongation (60 $^\circ\text{C}$, 1 min). The Taqman Low Density Assay (TLDA) includes the following list of genes: Hs00909449_m1 (ACTA2), Hs00248075_m1 (BBC3), Hs00978503_m1 (BIRC5), Hs01075861_m1 (CD44), Hs00938777_m1 (CDK1), Hs00355782_m1 (CDKN1A), Hs00923894_m1 (CDKN2A), Hs00929873_m1 (CSF2), Hs99999083_m1 (CSF3), Hs00236330_m1 (FAS), Hs00169255_m1 (GADD45A), Hs00232622_m1 (HEY2), Hs01555410_m1 (IL1B), Hs00985639_m1 (IL6), Hs00174103_m1 (IL8), Hs00765730_m1 (NFKB1), Hs01126606_m1 (SERPINE1), Hs00998193_m1 (SMAD7), Hs00162558_m1 (TAGLN), Hs00936520_m1 (TP53I3), Hs00426287_m1 (IGFBP3), Hs00181213_m1 (IGFBP5), Hs00266026_m1 (IGFBP7), Hs01042796_m1 (MMP7), Hs00233987_m1 (MMP10), Hs00176481_m1 (CDKN2D), Hs00971716_m1 (CAV1), Hs01597588_m1 (CDKN1B), Hs00793225_m1 (CDKN2B), Hs00914223_m1 (EP300), Hs01059210_m1 (LMNB1), Hs01062014_m1 (NOTCH1), Hs01100061_m1 (PAK4), Hs01078066_m1 (RB1), Hs01009006_m1 (SIRT1), Hs00187842_m1 (B2M), Hs01119326_m1 (PTPRJ), Hs00190266_m1 (STX4), Hs00247916_m1 (LAT2), Hs00601975_m1 (CXCL2), Hs00174092_m1 (IL1A), Hs00989786_m1 (CEACAM1), Hs00174583_m1 (SELP), Hs00232219_m1 (SMAD3), Hs99999903_m1 (ACTB), Hs99999906_m1 (PGK1), Hs00177083_m1 (MAPK8) et Hs99999901_s1 (18S). Analysis of data was performed using ExpressionSuite software (THERMO FISHER SCIENTIFIC), while representation and statistical analysis of the data were performed using DataAssist software (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

Statistical analysis. *Clonogenic assay.* The number of scored colonies $y_i(d)$ at each dose d and plate i , was modeled as a Bernoulli trial³⁹:

$$y_i(d) \sim \mathfrak{B}(N_i(d), S(d))$$

$N_i(d)$ is the number of seeded cells and $S(d) = PE \times \exp(-\alpha d - \beta d^2)$ the “success” probability for a cell to grow into a colony. Here PE , α and β are the model parameters, and PE represents the plating efficiency, i.e. the surviving fraction of non-irradiated cells. After inverting the fitted survival curves for each energy (200 kV and 4 MV), the relative biological effect (RBE) was computed as a ratio of physical doses that generate the same survival fraction and its associated confidence intervals were calculated by bootstrapping⁴⁰.

Cell viability. Let n_{ij} designate the number of viable cells remaining t_i days after exposure to d_j Gy and n_{i0} the number of viable cells in the control sample at the same time point. We modeled the log ratio $LR_{ij} = \log\left(\frac{n_{ij}}{n_{i0}}\right)$ as a bivariate function of time t_i and dose d_j through the regression:

$$LR_{ij} = \beta_{(4\text{ MV})}(t_i, d_j) + \chi_{S(220\text{ kV})} \times \beta_{(4\text{ MV})\text{ vs } (220\text{ kV})}(t_i, d_j) + \varepsilon_{ij}$$

Where $\beta_{(4\text{ MV})}$ and $\beta_{(4\text{ MV})\text{ vs } (220\text{ kV})}$ represent two bivariate penalized B-spline functions, $\chi_{(220\text{ kV})}$ is a dummy variable indicating cell irradiation by the 220 kV irradiator and ε_{ij} is the error term. Thus, by considering the 220 kV beam as reference, the comparison in time and dose between the viable cells with the two energies is driven by the function β_1

$$\frac{\text{Cell Viability (220 kV)}}{\text{Cell Viability (4 MV)}} = \exp(\beta_1(t, d))$$

Computations for this study were carried out using the MATLAB Software, version 8.2.0.701 (Mathworks R2013b) and the REFUND package of R software.

Flow cytometry. One-way Anova using GraphPad Prism software was performed for all flow cytometry experiments (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

RT-qPCR. RT-qPCR statistical analysis was automatically performed by ExpressionSuite and DataAssist software (corrected p -value by Benjamini-Hochberg False Discovery Rate test, $p < 0.05$).

References

- Valentin, J. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR):ICRP publication 92: Approved by the Commission in January 2003. *Annals of the ICRP* **33**, 1–121, [https://doi.org/10.1016/s0146-6453\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/s0146-6453(03)00024-1) (2003).
- Puck, T. T. & Marcus, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* **103**, 653–666 (1956).
- Munshi, A., Hobbs, M. & Meyn, R. E. Clonogenic cell survival assay. *Methods in molecular medicine* **110**, 21–28, <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021> (2005).
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature protocols* **1**, 2315–2319, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339> (2006).
- Rafehi, H. *et al.* Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*. <https://doi.org/10.3791/2573> (2011).
- Chadwick, K. H. & Leenhouts, H. P. *The molecular theory of radiation biology / XVII*, 377 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1981).
- Kirkpatrick, J. P., Brenner, D. J. & Orton, C. G. Point/Counterpoint. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Medical physics* **36**, 3381–3384, <https://doi.org/10.1118/1.3157095> (2009).
- Abderrahmani, R. *et al.* PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS one* **7**, e35740, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035740> (2012).
- Dos Santos, M. *et al.* Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response. *International journal of radiation biology*, 1–29, <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466205> (2018).
- Guipaud, O. *et al.* The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *The British journal of radiology*, 20170762, <https://doi.org/10.1259/bjr.20170762> (2018).
- Korpela, E. & Liu, S. K. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat Oncol* **9**, 266, <https://doi.org/10.1186/s13014-014-0266-7> (2014).
- Gomolka, M. *et al.* Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays. *Radiation research* **163**, 510–519 (2005).
- Hill, M. A. The variation in biological effectiveness of X-rays and gamma rays with energy. *Radiation protection dosimetry* **112**, 471–481, <https://doi.org/10.1093/rpd/nch091> (2004).
- Kashino, G. *et al.* Evidence for induction of DNA double strand breaks in the bystander response to targeted soft X-rays in CHO cells. *Mutation research* **556**, 209–215, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.009> (2004).
- Slonina, D. *et al.* Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiation and environmental biophysics* **42**, 55–61, <https://doi.org/10.1007/s00411-003-0177-8> (2003).
- Jones, B. Clinical radiobiology of proton therapy: modeling of RBE. *Acta Oncol* **56**, 1374–1378, <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1343496> (2017).
- Makita, C. *et al.* Clinical outcomes and toxicity of proton beam therapy for advanced cholangiocarcinoma. *Radiat Oncol* **9**, 26, <https://doi.org/10.1186/1748-717X-9-26> (2014).
- Wambersie, A. RBE, reference RBE and clinical RBE: applications of these concepts in hadron therapy. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft... [et al.]* **175**(Suppl 2), 39–43 (1999).
- Bjork-Eriksson, T., West, C., Karlsson, E. & Mercke, C. Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **46**, 13–19 (2000).
- Redon, C. E. *et al.* Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging* **3**, 168–174, <https://doi.org/10.18632/aging.100284> (2011).
- Tsamou, M. *et al.* Performance of *in vitro* gammaH2AX assay in HepG2 cells to predict *in vivo* genotoxicity. *Mutagenesis* **27**, 645–652, <https://doi.org/10.1093/mutage/ges030> (2012).

22. Mori, R., Matsuya, Y., Yoshii, Y. & Date, H. Estimation of the radiation-induced DNA double-strand breaks number by considering cell cycle and absorbed dose per cell nucleus. *Journal of radiation research* **59**, 253–260, <https://doi.org/10.1093/jrr/trx097> (2018).
23. Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L. & Wang, Y. 2,7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free radical research* **44**, 587–604, <https://doi.org/10.3109/10715761003709802> (2010).
24. Morales, A., Miranda, M., Sanchez-Reyes, A., Bieta, A. & Fernandez-Checa, J. C. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **42**, 191–203 (1998).
25. Lafargue, A. *et al.* Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free radical biology & medicine* **108**, 750–759, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019> (2017).
26. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology* **28**, 436–453, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001> (2018).
27. Pan, J. *et al.* Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **99**, 353–361, <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.02.216> (2017).
28. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G. P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* **371**, 21–31 (2007).
29. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nature protocols* **4**, 1798–1806, <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191> (2009).
30. Dong, X. *et al.* NEMO modulates radiation-induced endothelial senescence of human umbilical veins through NF-kappaB signal pathway. *Radiation research* **183**, 82–93, <https://doi.org/10.1667/RR13682.1> (2015).
31. Campisi, J. & d'Adda di Fagnana, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 729–740, <https://doi.org/10.1038/nrm2233> (2007).
32. Reyes, J. *et al.* Fluctuations in p53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest. *Molecular cell* **71**(581–591), e585, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.031> (2018).
33. Burton, D. G. & Krizhanovsky, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **71**, 4373–4386, <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3> (2014).
34. Gruel, G. *et al.* Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition. *PLoS one* **11**, e0145786, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145786> (2016).
35. Vaurijoux, A., Voisin, P., Freneau, A., Barquinerio, J. F. & Gruel, G. 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> (2017).
36. Canny, J. A computational approach to edge detection. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* **8**, 679–698 (1986).
37. Lobrich, M. *et al.* gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662–669, <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10764> (2010).
38. Van Hooijdonk, C. A., Glade, C. P. & Van Erp, P. E. TO-PRO-3 iodide: a novel HeNe laser-excitable DNA stain as an alternative for propidium iodide in multiparameter flow cytometry. *Cytometry* **17**, 185–189, <https://doi.org/10.1002/cyto.990170212> (1994).
39. Shuryak, I., Sun, Y. & Balajee, A. S. Advantages of Binomial Likelihood Maximization for Analyzing and Modeling Cell Survival Curves. *Radiation research* **185**, 246–256, <https://doi.org/10.1667/RR14195.1> (2016).
40. Good, P. I. *Permutation, Parametric, and Bootstrap Tests of Hypotheses*. 3 edn, XX, 316 (Springer New York, 2005).

Acknowledgements

The authors would like to thank Y. Ristic for his help in irradiation on the Elekta Synergy Platform (ELEKTA S.A.S. France, Boulogne, France). This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and is included in the IRSN program ROSIRIS. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions


V.P., M.B.K., M.D.S., F.S., V.B. and G.T.: Acquisition, analyses and interpretation of data. M.A.B.: statistical analyses, help writing the manuscript. A.V. and G.G.: Acquisition, analyses and interpretation of data in γ -H2AX experiments, help writing the manuscript. A.F. and O.G.: Critical review of the manuscript. V.P.: Conception and design, acquisition, analyses and interpretation of the data, writing of the manuscript. V.P. and F.M.: Supervising the project.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50908-4>.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection). This does not alter the authors' adherence to all the Scientific Reports policies on sharing data and materials.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

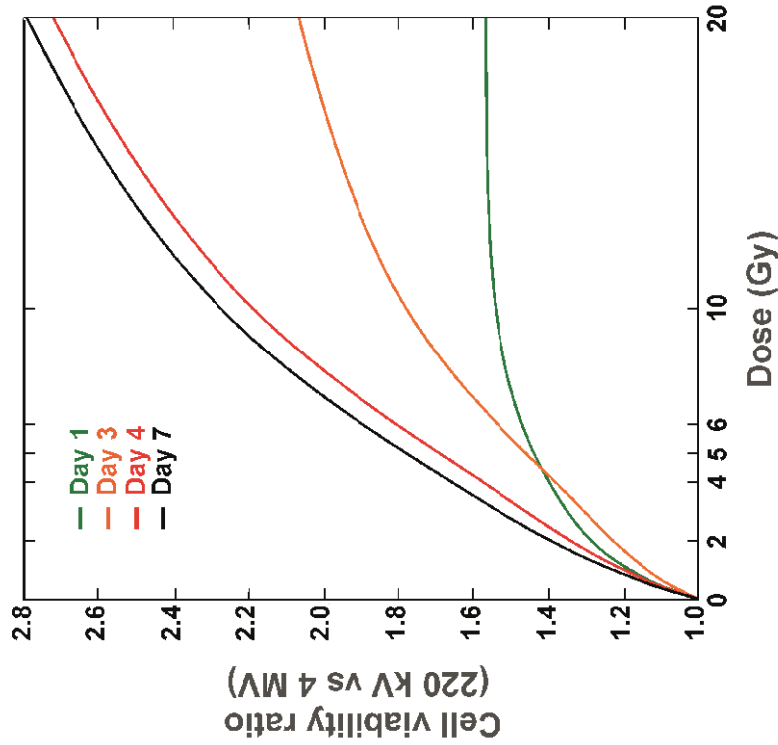
SF	RBE (220 kV vs 4MV)	95% CI*
0.01	1.01	[0.97;1.06] ¹ #
0.02	1.03	[0.98;1.08] #
0.05	1.08	[1.02;1.14]
0.10	1.11	[1.06;1.17]
0.15	1.13	[1.07;1.20]
0.20	1.15	[1.08;1.22]
0.25	1.16	[1.08;1.25]
0.30	1.18	[1.09;1.28]
0.35	1.19	[1.09;1.31]
0.40	1.21	[1.09;1.34]
0.45	1.22	[1.09;1.37]
0.50	1.23	[1.09;1.40]
0.55	1.25	[1.09;1.43]
0.60	1.26	[1.09;1.46]
0.65	1.27	[1.09;1.49]
0.70	1.29	[1.09;1.52]
0.75	1.30	[1.10;1.55]
0.80	1.31	[1.10;1.58]
0.85	1.33	[1.10;1.62]
0.90	1.34	[1.10;1.66]
0.95	1.36	[1.10;1.69]

Supplementary Table S1: Clonogenic assay RBE values (Ratio of doses for a given SF). * 95% CI = 95% confidence interval. # Not significant (CI including 1).

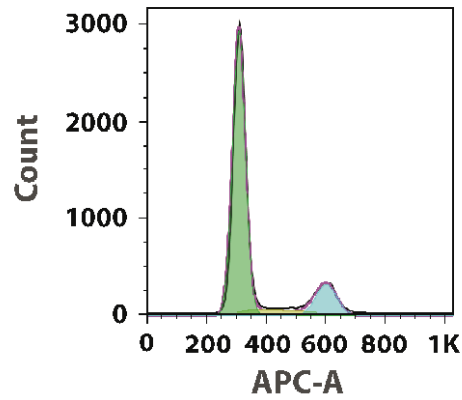
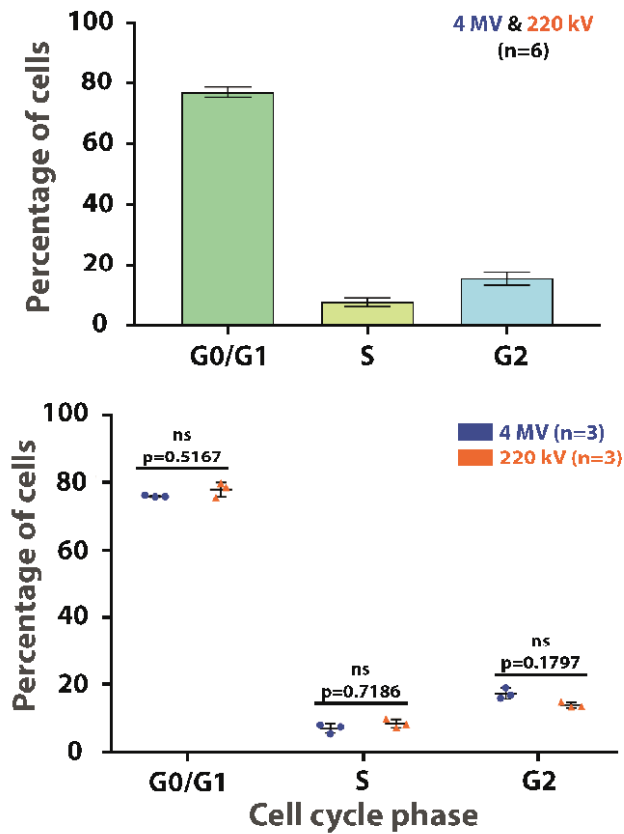
B.

Dose (Gy)	Time (Days)	RBE	95% CI*
2.00	1.00	1.28	[1.21;1.34]
2.00	2.00	1.35	[1.26;1.59]
2.00	3.00	1.22	[1.17;1.27]
2.00	4.00	1.33	[1.27;1.38]
2.00	7.00	1.38	[1.30;1.46]
4.00	1.00	1.38	[1.32;1.45]
4.00	2.00	1.49	[1.43;1.55]
4.00	3.00	1.36	[1.31;1.41]
4.00	4.00	1.54	[1.49;1.60]
4.00	7.00	1.62	[1.55;1.69]
5.00	1.00	1.43	[1.36;1.49]
5.00	2.00	1.57	[1.50;1.63]
5.00	3.00	1.43	[1.38;1.49]
5.00	4.00	1.65	[1.59;1.72]
5.00	7.00	1.74	[1.67;1.81]
6.00	1.00	1.47	[1.40;1.53]
6.00	2.00	1.65	[1.58;1.72]
6.00	3.00	1.53	[1.47;1.59]
6.00	4.00	1.79	[1.72;1.86]
6.00	7.00	1.88	[1.80;1.96]
10.00	1.00	1.54	[1.46;1.62]
10.00	2.00	1.84	[1.75;1.94]
10.00	3.00	1.76	[1.68;1.84]
10.00	4.00	2.16	[2.07;2.25]
10.00	7.00	2.24	[2.14;2.36]
20.00	1.00	1.57	[1.45;1.70]
20.00	2.00	2.05	[1.90;2.20]
20.00	3.00	2.07	[1.93;2.21]
20.00	4.00	2.72	[2.55;2.91]
20.00	7.00	2.79	[2.59;3.01]

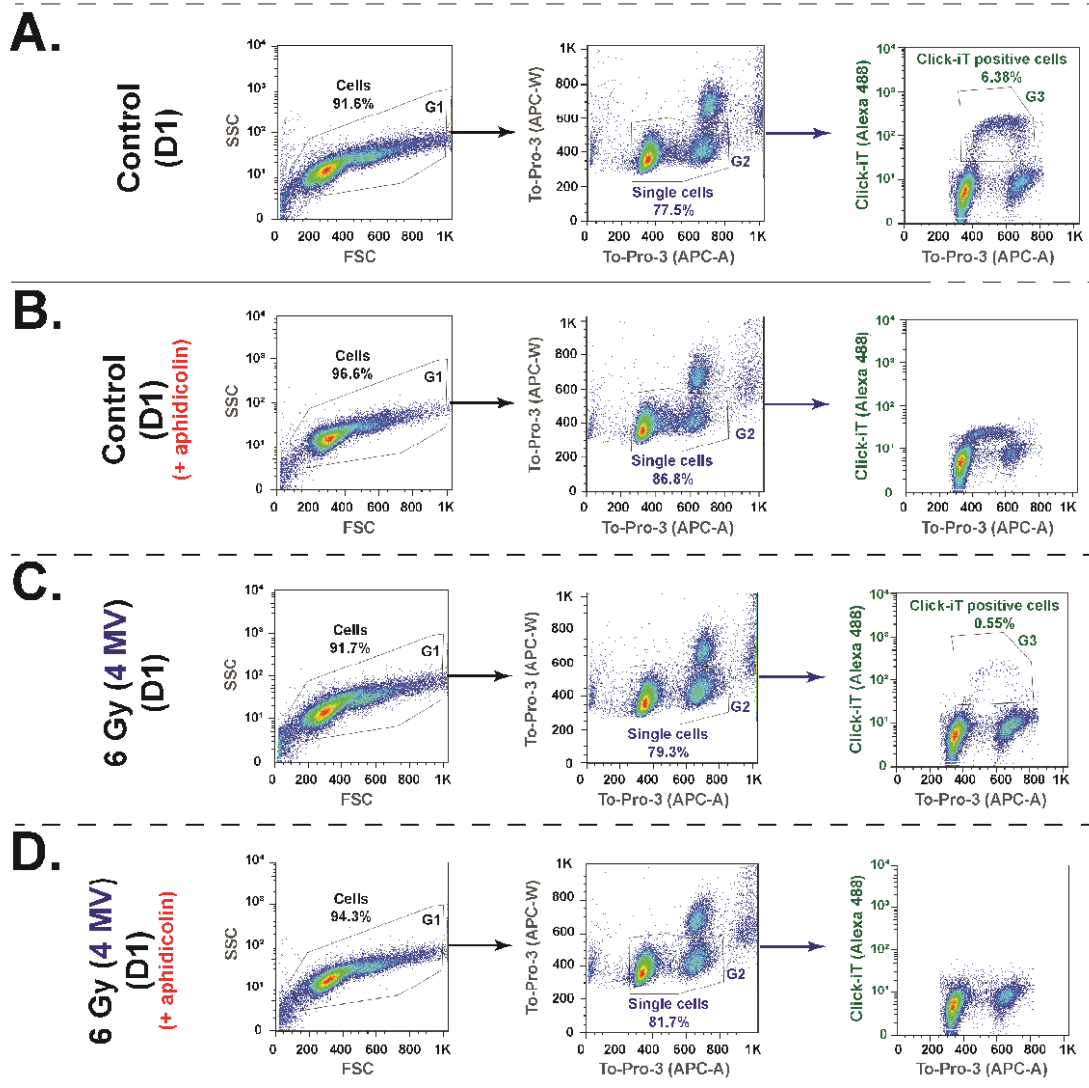
A.



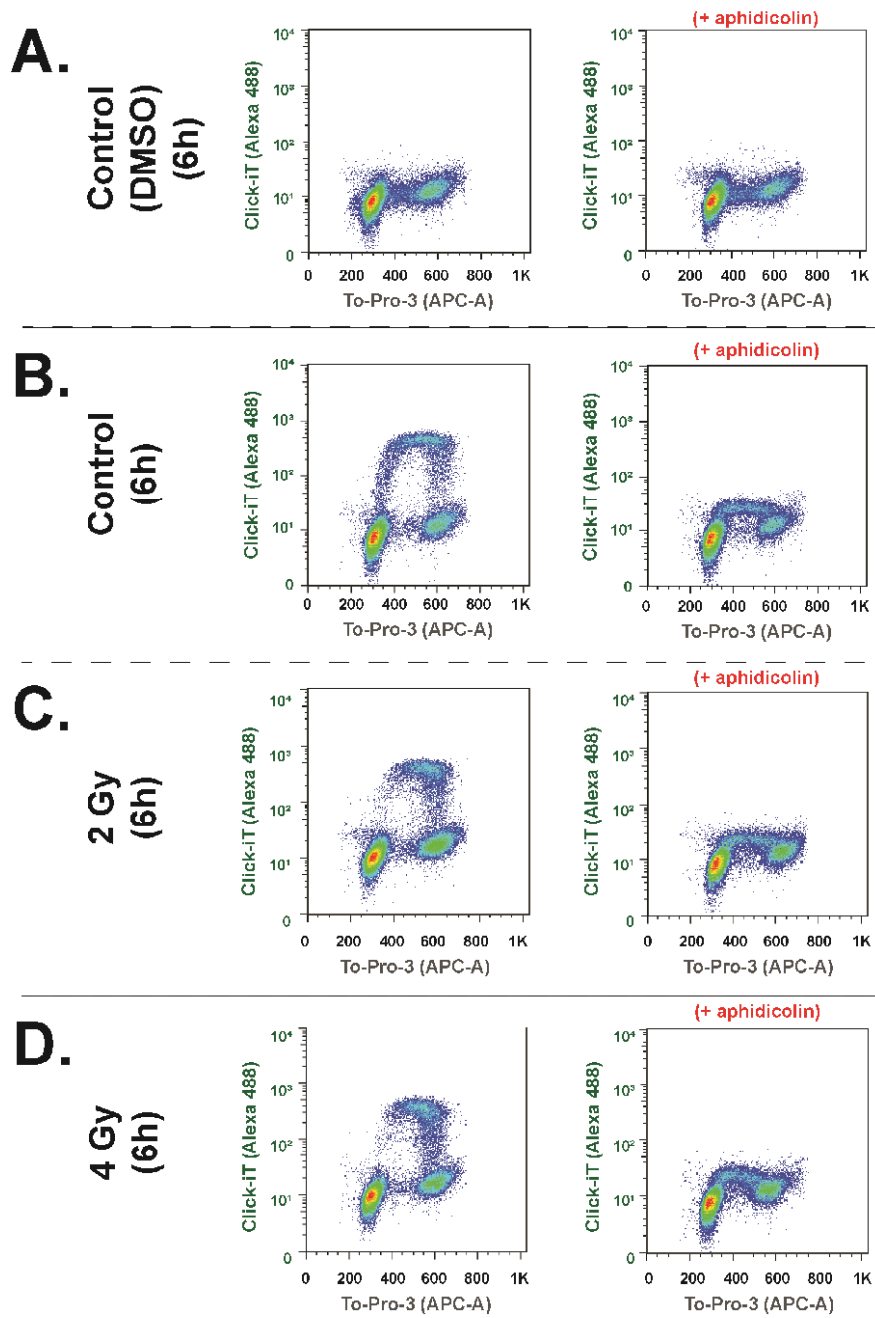
Supplementary Figure S1. “RBE” based on cell viability (ratios for a given dose and time). (A) “RBE” representation at day 1 (green curve), day 3 (orange curve), day 4 (red curve) and day 7 (black curve) depending on the dose (Gy) (B) Numerical values of RBE extracted from experimental data. 95% CI = 95% confidence interval.

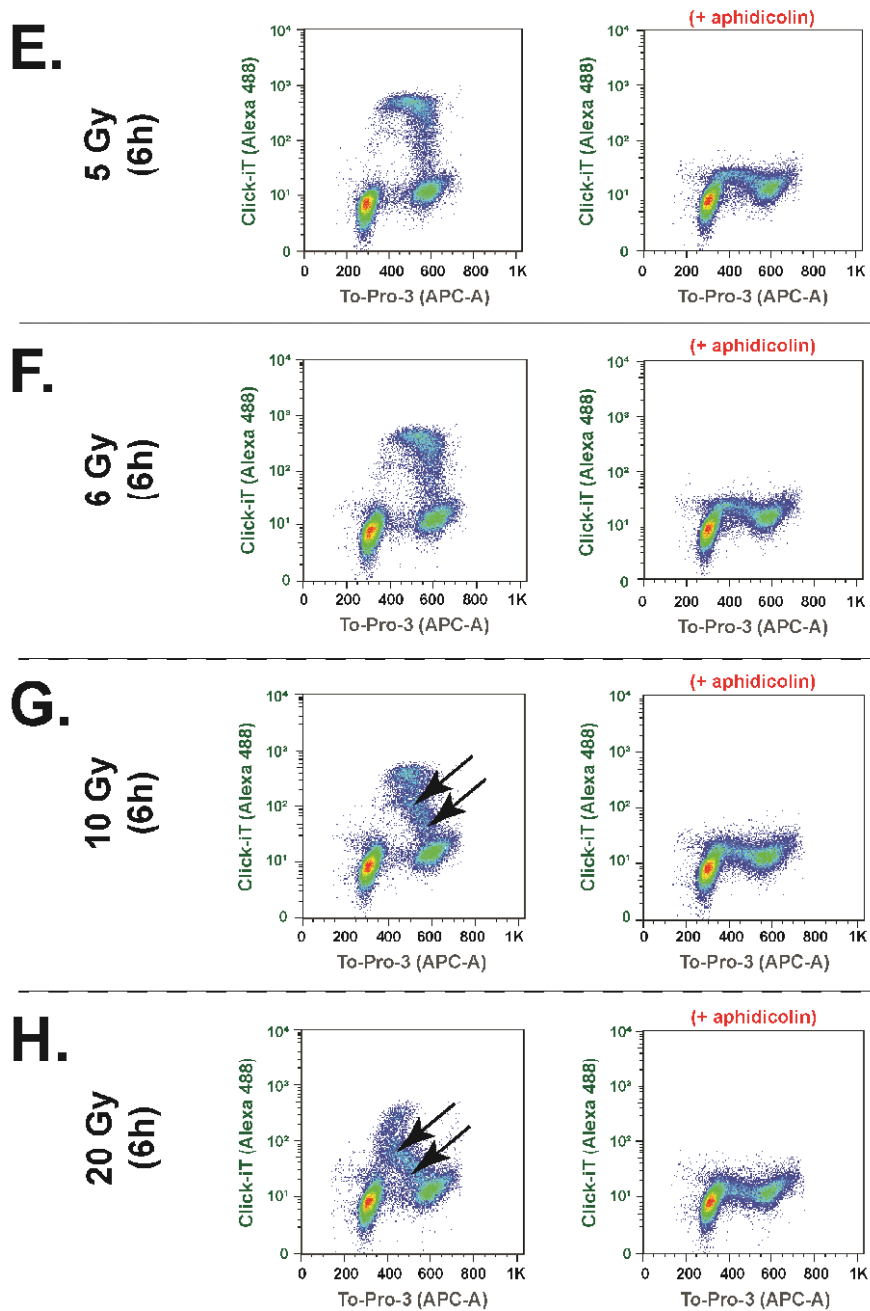
A.**B.**

Supplementary Figure S2. Cell cycle analysis performed on controls just before irradiation. (A) Example of one representative cell cycle analysis performed using the FlowJo cell cycle tool on single cells (set-up to remove debris first, then by using size (APC-W)/intensity (APC-A) bi-parametric analysis to remove doublets) (B) Mean of cell cycle proportions for controls at T0 (n=6 total, upper panel); n=3 for 220 kV plus n=3 for 4 MV (bottom panel); 5×10^4 cells were analyzed per n).

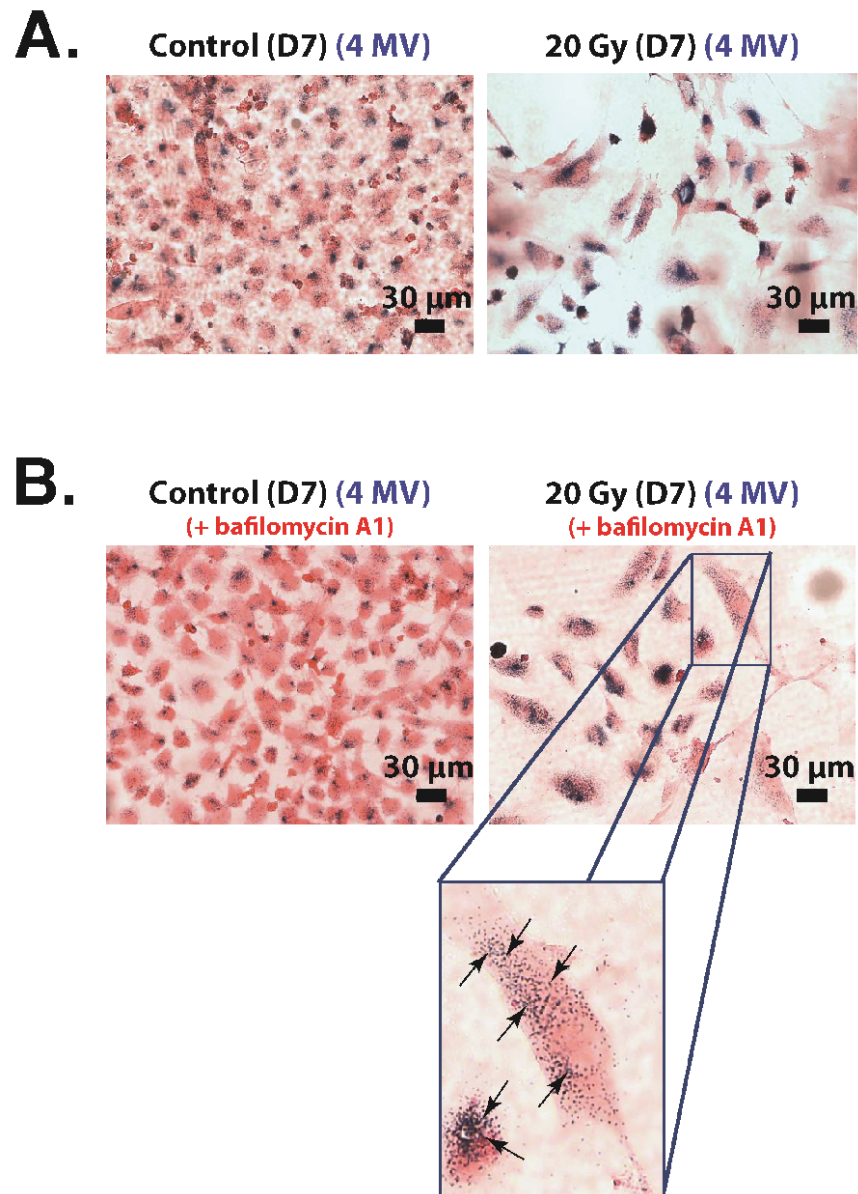


Supplementary Figure S3. Analysis set-up for Click-iT[®] EdU experiments. (A) Gating set-up to remove debris (gate G1) and to assess the correct detection of single events (gate G2) by using size (APC-W)/intensity (APC-A) bi-parametric analysis in negative control (DMSO) (B) Same analysis set-up allowing detection of positive Click-iT[®] positive cells (Gate G3) on the Alexa 488 channel (C and D) Represent rigorously same analysis set-up at day 1 for 6 Gy irradiation at 4 MV.

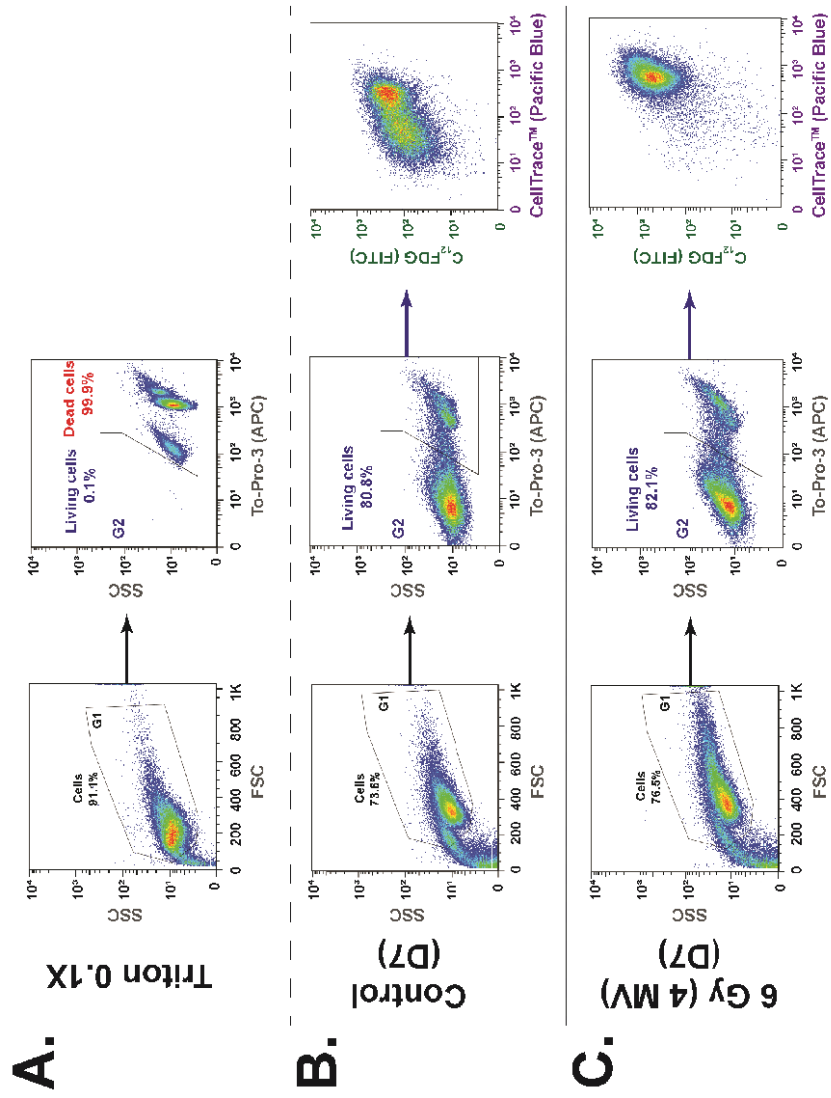


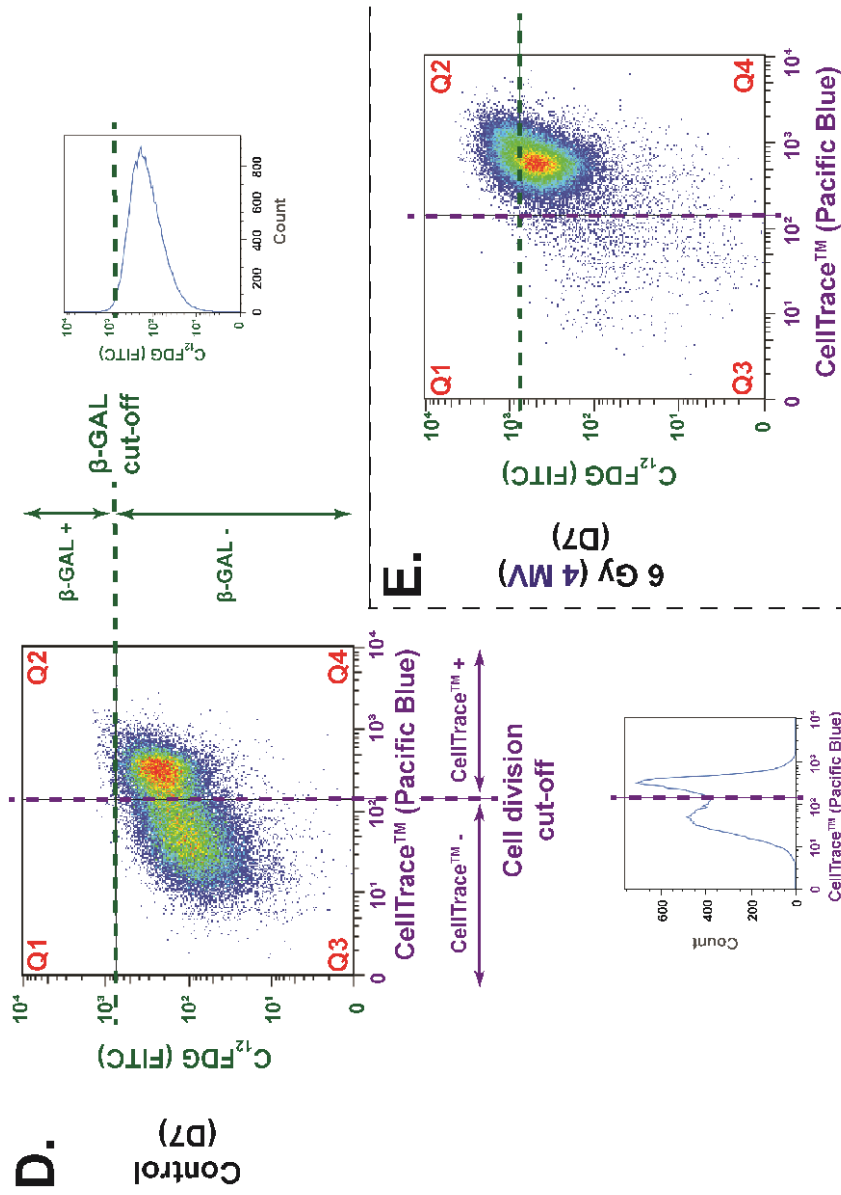


Supplementary Figure S4. Analysis of Click-iT[®] EdU experiments 6 hours after irradiation (4 MV). (A) Represents negative control with DMSO of Click-iT[®] detection for non-irradiated cells (B) Represents Click-iT[®] detection for non-irradiated cells (C to H) Represents Click-iT[®] detection for irradiated cells to 4 MV at 2, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy, respectively. For each condition, right panel correspond to negative control for Click-iT[®] staining by the use of aphidicolin (A to H). Black arrows indicate altered incorporation of EdU (panels G and H).

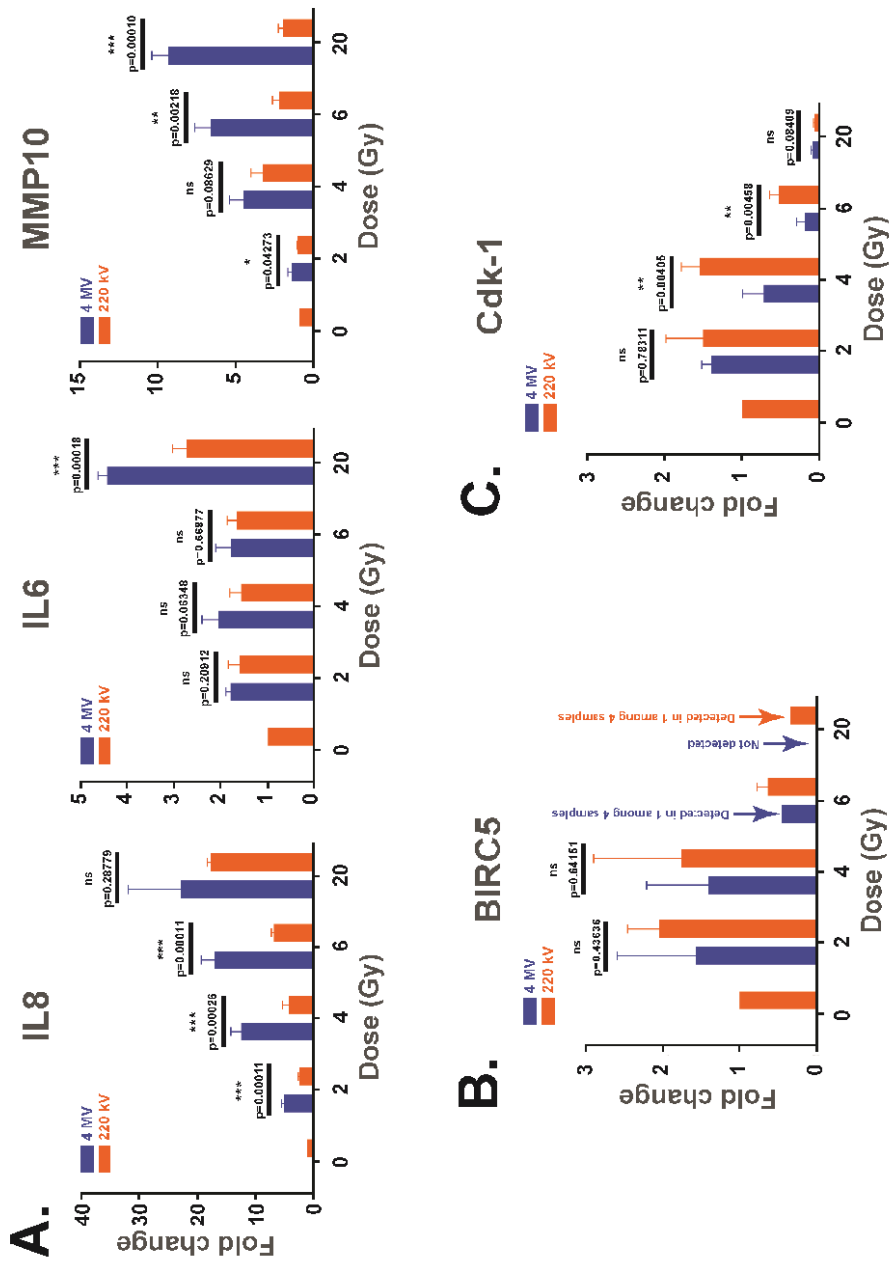


Supplementary Figure S5. X-GAL staining 7 days after irradiation by 20 Gy at 4 MV. (A) Represents staining obtained for conventional protocol (B) Represents staining obtained for modified protocol, consisting in 1-hour pre-treatment with bafilomycin A1. The dark arrows indicate X-GAL staining corresponding to lysosomes. Scale bar corresponds to 30 μm .





Supplementary Figure S6. Bi-parametric analysis set-up for $C_{12}FDG/CellTrace$. (A) Gating set-up to remove debris (gate G1) and to assess the correct detection on the APC channel of living (Gate G2) and dead cells by the use of positive control (Triton 0.X). (B) Bi-parametric representation of $C_{12}FDG/CellTrace$ for control condition (C) Bi-parametric representation of $C_{12}FDG/CellTrace$ at day 7 after 6 Gy irradiation at 4 MV (D) cut-off settings set on control condition for $C_{12}FDG$ and CellTrace (E) and applied to all other conditions, here at day 7 after 6 Gy irradiation at 4 MV for $C_{12}FDG$ and CellTrace.



Supplementary Figure S7. IL-8, IL-6, MMP10, BIRC5 and Cdk-1 genes analysis from TLDA custom array at 7 days post-irradiation. Fold change compared to control at 4 MV (blue bars) and at 220 kV (orange bars) irradiations for IL-8 (A, left panel), IL-6 (A, middle panel), MMP10 (A, right panel), BIRC5 (B) and Cdk-1 (C) genes. Each bar represents the mean of 4 independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's t test), excepted for BIRC5 (B) where signal was not detected in all samples (for 6 and 20 Gy doses).

Annexe 5 : 2^{ème} article supplémentaire « Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response »

INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY
2018, VOL. 94, NO. 6, 597–606
<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466205>



ORIGINAL ARTICLE



Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response

Morgane Dos Santos^{a*}, Vincent Paget^{b*}, Mariam Ben Kacem^b, François Tromprier^c, Mohamed Amine Benadjaoud^d, Agnès François^b, Olivier Guipaud^b, Marc Benderitter^d and Fabien Milliat^b

^aDepartment of Radiobiology and Regenerative Medicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental Exposures (LRACc), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France; ^bDepartment of Radiobiology and Regenerative Medicine (SERAMED), Laboratory of Medical Radiobiology (LRMed), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France; ^cDepartment of Dosimetry (SDOS), Ionizing Radiation Dosimetry Laboratory (LDRI), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France; ^dDepartment of Radiobiology and Regenerative Medicine (SERAMED), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France

ABSTRACT

Purpose: The main objective of radiobiology is to establish links between doses and radiation-induced biological effects. In this context, well-defined dosimetry protocols are crucial to the determination of experimental protocols. This work proposes a new dosimetry protocol for cell irradiation in a SARRP and shows the importance of the modification of some parameters defined in dosimetry protocol for physical dose and biological outcomes.

Materials and methods: Once all parameters of the configuration were defined, dosimetry measurements with ionization chambers and EBT3 films were performed to evaluate the dose rate and the attenuation due to the cell culture medium. To evaluate the influence of changes in cell culture volume and/or additional filtration, 6-well plates containing EBT3 films with water were used to determine the impact on the physical dose at 80 kV. Then, experiments with the same irradiation conditions were performed by replacing EBT3 films by HUVECs. The biological response was assessed using clonogenic assay.

Results: Using a 0.15 mm copper filter lead to a variation of +1% using medium thickness of 0.104 cm to –8% using a medium thickness of 0.936 cm on the physical dose compare to the reference condition (0.313 cm). For the 1 mm aluminum filter, a variation of +8 to –40% for the same medium thickness conditions has been observed. Cells irradiated in the same conditions showed significant differences in survival fraction, corroborating the effects of dosimetric changes on physical dose.

Conclusions: This work shows the importance of dosimetry in radiobiology studies and the need of an accurate description of the dosimetry protocol used for irradiation.

ARTICLE HISTORY

Received 13 October 2017
Revised 29 March 2018
Accepted 12 April 2018

KEYWORDS

Clonogenic assay;
dosimetry; HUVECs;
low-energy X-rays; SARRP

Introduction

During the last three decades, the importance of dosimetry in radiobiology studies and the standardization and harmonization of dosimetry formalism have been highlighted (Zoetelief et al. 1985; Zoetelief and Jansen 1997; Zoetelief et al. 2001; Coleman et al. 2003; Desrosiers et al. 2013; Tromprier et al. 2016). As radiobiology aims to establish a relationship between delivered doses and biological effects, dosimetry is an essential part of experimental designs. Different dosimetry protocols have been established to define a reference dose rate in low-energy X-rays facilities. At least six different protocols can be used to establish a reference dose rate (DIN 1988, 1996; NCS 1997; IAEA 2000; Ma et al. 2001). The difference in terms of reference dose rate values between these protocols can reach 7% according to Peixoto and Andreo (2000), depending on the dosimetric

approach (air kerma [K_{air}] versus dose to water). Moreover, the reference dose rate, because evaluated in air or in a water equivalent phantom, does not always allow estimating accurately the real dose delivered to the biological system considered. The non-representativeness of the reference dose rate has been specially highlighted in the past for small animal irradiations (Zoetelief and Jansen 1997; Peixoto and Andreo 2000; Zoetelief et al. 2001; Yoshizumi et al. 2011; Noblet et al. 2014; Pedersen et al. 2016), even if nowadays treatment planning system coupled with imaging system allows overcoming this difficulty for most of irradiation configurations. However, cell culture irradiation was never identified as being possibly problematic regarding the representativeness of the reference dose rate. In this article, we show that even for cell culture irradiation, the use of the established protocols of dosimetry do not always allow

CONTACT Morgane Dos Santos morgane.dossantos@irsn.fr Department of Radiobiology and Regenerative Medicine (SERAMED), Laboratory of Radiobiology of Accidental exposures (LRACc), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France

*Equally contributed to this work.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at www.tandfonline.com/irab.

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

Copyright © 2018 Taylor & Francis Group LLC.

estimating the real dose delivered to the cells and that the dose difference is sufficient to generate observable biological difference. For example difference in set-up as volume of cell culture media or in the type of container may generate significant dose differences, especially for voltage below 100 kV. Thus, we propose a new protocol for dosimetry that takes into account the influence of the set-up and allows estimating accurately and reproducibly the real dose delivered to cell.

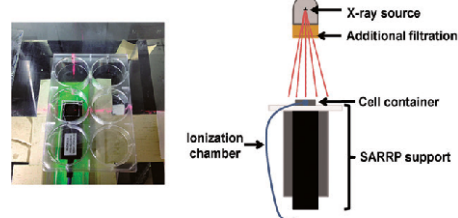
The aim of this work was to define a new dosimetry protocol for cell irradiation in a low X-ray irradiation facility in order to have robust and reproducible protocols and to be able to compare and interpret experiments. With existing dosimetry protocols, reference dose rate are determined free in air on in a water phantom depending on the selected protocol. But with low X-ray energy, a second step is necessary to take into account the influence of the irradiation set-up (container, cell culture volume, number of containers...), to estimate the real dose delivered to cells. We demonstrate in this article, that the difference, in terms of dose rate between the actual dose rate to the cells and the reference dose rate is not always negligible, especially for light additional filtrations. At IRSN, a dedicated dosimetry is performed for each set-up, even for identical beam conditions. Moreover, to highlight the importance of maintaining identical conditions of irradiations (as cell culture volume for example); we assessed the impact of manual errors/protocol changes in terms of biological effects on cell populations. To show this, cells were irradiated at 80 kV with different cell culture volume and/or filtrations (aluminum or copper) and the impact of these parameters on the surviving cell fraction was experimentally verified using the clonogenic assay.

Material and methods

X-rays irradiation facility

All irradiations described in this article were performed at the Small Animal Radiation Research Platform (SARRP) from XSTRAHL (XSTRAHL Ltd., Camberley, UK) at IRSN (Fontenay-aux-Roses, France). SARRP is an image-guided micro irradiator composed of a Varian X-ray tube (NDI-225-22, NDI, Washington, DC) attached to a gantry that can be rotated between -180 and 180 degrees (Deng et al. 2007; Wong et al. 2008). The X-ray tube specifications are an inherent filtration of 0.8 mm of Beryllium, a large focal spot size about 3 mm, a high voltage (HV) range about 30–225 kV and a maximum current of the machine can reach 30 mA (depending on the HV applied). This device has been originally designed for small animal irradiation, but it could be also used for other applications, such as cell irradiations, even if its limited beam size is not optimum for that type of application. The irradiation field is limited to roughly 20 by 20 cm² at the isocenter (Source-detector distance about 35 cm) including the penumbra region (see section *Homogeneity of irradiation field*). At IRSN, the SARRP is also used in routine for irradiation of cell culture at doses at HV below 100 kV. In this work, cells were irradiated at doses ranging from 0 to 4 Gy at 80 kV and at a dose rate of 0.63 Gy.min⁻¹ in terms of K_{air}

Step 1: Dose rate measurement in cell container with ionization chamber calibrated in Air Kerma



Step 2: Quantification of attenuation due to cell culture medium with EBT3 films

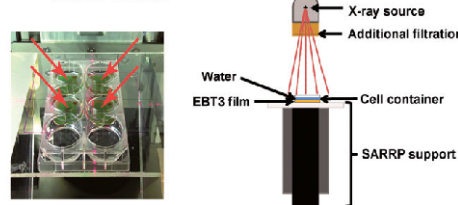


Figure 1. Dosimetry protocol takes in place on the SARRP irradiator.

(using copper or aluminum additional filtration, named configurations 1 and 2, respectively).

Protocols used for implementation of dosimetry on SARRP

In implementing dosimetry protocols on SARRP at IRSN and in ensuring the reproducibility of irradiation conditions from one experiment to another, some parameters have to be fixed for each case. These parameters are: HV of the X-rays tube (30–220 kV), additional filtration (0.15 mm copper or 1 mm aluminum), detectors used, source-sample distance, field size, shape and geometry, dosimetry method/protocol, dose quantity (K_{air} , K_{water} and D_{water}), cell containers, type and volume of medium, and uncertainties.

The dosimetry protocol was carried out in two steps as illustrated in the schema reported in Figure 1. The first step consisted of the measurement of absolute dosimetry with an ionization chamber, calibrated in K_{air} free in air conditions. As the quantity of cell culture medium was small in the containers, we chose to perform the measurements of absolute dosimetry not on a phantom but on the different cell culture supports used for biological experiments, as illustrated in Figure 1 in terms of K_{air} . To avoid the effect of the attenuation due to the base of microplate, a little square having the dimension of the detection surface of the ionization chamber was removed within the center of the well. The measured K_{air} was converted to water kerma free in air, using the ratio of mean mass energy transfer coefficients for water to air, with respect to the photon fluence spectrum considered. Thanks to these measurements, we were able to determine the dose rate for each irradiation configurations and determine the time needed to administer a certain dose.

Then, the second step consists in the quantification of the attenuation due to cell culture medium. For this, EBT3 radiochromic films were placed inside cell container and irradiation with and without the exact quantity of the cell culture medium for each configuration were performed. For this, small pieces of radiochromic film were placed inside the support used for cell irradiation: T25, T75, 6- to 24-well plates, Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System. At least three pieces of radiochromic films were irradiated for each condition. Finally, the radiochromic films were analyzed by the method described in the section called *Relative dosimetry with radiochromic films*. From these results, attenuation of the cell culture medium was taken into account in calculating dosimetry.

Absolute dosimetry with ionization chamber

Absolute dosimetry was performed by using a calibrated ionization chamber, which confers various advantages, especially high precision, accuracy, and reproducibility. Two types of ionization chamber were used in this work: the semiflex 31002 and the soft X-ray 23342. The semiflex ionization chamber 31002 is cylindrical with a cavity volume of 0.125 cm³ calibrated here in the range of 100–300 kV X-rays. The second ionization chamber was a TM 23342 plane parallel chamber with a cavity volume of 0.02 cm³ calibrated here in the range of 30–100 kV. These two ionization chambers were calibrated in K_{air} free in air at the IRSN reference facility FP-15-142 for the soft X-ray 23342 (H30, H60, and H100 beams) and FP-15-126 for the semiflex 31002 (H60, H100, and H200 beams). The characteristics of these X-ray beams are given in ISO standard 4037-1 (ISO 1996). For measurements, the two ionization chambers were connected to a UNIDOS^{webline} Universal Dosimeter/Electrometer and a high voltage supply of 300 or 400 V depending on calibrations.

The measurements were performed by following as closely as possible the recommendations compiled in the AAPM protocol for 40–300 kV X-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology (Ma et al. 2001) and the TRS398 (IAEA 2000).

Determination of the dose in K_{air} free in air conditions is given by:

$$K_{\text{air}} = M \times N_{K_{\text{air}}} \times K_Q.$$

where: $N_{K_{\text{air}}}$ is the calibration factor in terms of K_{air} provided by the calibration laboratory.

M is the reading of the dosimeters corrected for temperature and pressure, polarity effect, ion recombination, and electrometer calibration.

K_Q is the correction factor for the radiation quality Q depending on the beam quality specification.

Concerning determination of the beam quality specification, so of the K_Q factor, it has long been known that the usual quantities are the kilovoltage (kV) generating potential and the half-value layer (HVL) determined in copper or aluminum (mm) (IAEA 2000). For each HV used with our SARRP, the corresponding HVL value was measured by following as closely as possible the method described in *Protocols used for implementation of dosimetry on SARRP* of the AAPM protocol

(Ma et al. 2001). As the distance of 1 meter between the irradiation source and the detector cannot be achieved with the SARRP, we chose a distance of 70 cm for the measurements, thanks to which we are able to determine with accuracy the calibrated factor for each HT and filtration used on the SARRP. Calibration factors of each ionization chamber were also measured following the AAPM protocol.

Uncertainty in the ionization chamber measurements is mainly related to the calibration factor, which ranged between 1.64 and 2.10% at a 66% confidence level (2.7–4.4% at a 95% confidence level), depending on the ionization chamber used and calibration. Other sources of uncertainty were: measurements (from 0.01 to 0.1%), warm-up effect and the correction factors k_{pol} , k_{elec} and $k_{\text{T,P}}$ (from 0.01 to 0.1%). The maximum overall uncertainty ranged from 2.8 to 4.5% at a 95% confidence level. To incorporate other possible sources of uncertainty, a conservative value from 3 to 5% was considered ($k = 2$).

The measured K_{air} was converted to water kerma, free in air, using the ratio of mean mass energy transfer coefficients for water to air, evaluated over the photon fluence spectrum free in air calculated with SpekCalc software (REAL software, Inc., Woodland Hills, CA) (Poludniowski et al. 2009), in the absence of a phantom. This coefficient was calculated for each configuration from the energy spectrum and the NIST table (Hubbell and Seltzer 2004).

$$K_{\text{water}} = K_{\text{air}} \times \left[\left(\frac{\overline{H_{\text{tr}}}}{\rho} \right)_{\text{air}}^w \right]$$

Relative dosimetry with radiochromic films

To quantify the attenuation due to cell culture medium, relative dose measurements were performed with EBT3 self-developing Gafchromic® film (Ashland ISP Advanced Materials, Parlin, NJ) composed of an active radiochromic layer 28 μm thick laminated between two polyester layers 125 μm thick (Devic et al. 2005). EBT3 films were scanned in a 48 bit red-green-blue TIFF format using an Epson Perfection V700 scanner (Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan) at 150 dpi in transmission mode with no image correction. For each scan, the films were placed at the same position at the center of the bed scanned and in the same orientation. Pieces of film were cut at least 24 h before irradiation in order to allow mechanically created disturbances to relax and were read at least 24 h after irradiation. Images were converted to optical density (OD) and then to doses using a homemade C program using the red channel method (Devic et al. 2005; Micke et al. 2011). EBT3 films were calibrated between 0 and 5 Gy by steps of 0.5 Gy, and the points of the calibration curve were fitted with a 4th-degree polynomial curve.

Uncertainties in film dose measurements were evaluated and the main contribution to the overall uncertainty was due to the absolute dose measurement with the ionization chamber and ranged from 2.1 to 3.5% at a 95% confidence level, depending on the ionization chambers and calibration. The other sources of uncertainties were: warm-up effect and

reproducibility of the scanner (around 0.05% after at least 25 pre-scans), measurement of the film OD (around 0.5%) and film calibration (around 1.5%). The maximum overall uncertainty was 3.81% at a 95% confidence level. To incorporate other possible sources of uncertainty, a conservative value of 4% was considered ($k=2$).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, C2519A) from Lonza were cultured in EGM-2MV culture medium (Lonza, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions and placed in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity. For all the experiments, HUVECs at passage 2 were routinely seeded in 6-well microplates 3 h before irradiation. This interval before irradiation was previously determined to be sufficient to allow cell adhesion and at the same time to avoid a restart in proliferation, i.e. avoiding cell division just before irradiation (Abderrahmani et al. 2012).

Clonogenic assays

The radiosensitivity of HUVECs was assessed by clonogenic assay (Franken et al. 2006). Briefly, cells were seeded in 6-well culture plates (1000 cells/well for doses from 0 to 1 Gy and 2000 cells/well for doses from 2 to 4 Gy) and, 3 h after plating (adhesion step), microplates containing adherent HUVECs were irradiated at different doses (0 (control), 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 Gy) on the SARRP at 80 kV and 0.63 Gy.min⁻¹ (using additional copper or aluminum filtration, named configurations 1 and 2, respectively). Nine days after irradiation, cells were fixed for 15 min with 4% final (v/v) paraformaldehyde (in PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺) and then stained for 30 min with Giemsa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) at a final concentration of 10% (v/v) (in Milli Q water, Millipore Corporation, Burlington, MA). Colonies containing more than 60 cells (corresponding to at least six doubling times) (Franken et al. 2006) were counted using an automatic counting 'colony counter pen' while clone size was checked under microscope.

Statistical analysis

The number of scored colonies $y_i(d)$ at each dose d and plate i was modeled using the following binomial distribution:

$$y_i(d) \sim \mathfrak{B}(N_i(d), S(d)).$$

Where $N_i(d)$ is the number of seeded cells and $S(d)$ the 'success' probability for a cell to grow into a colony.

More precisely, the survival fraction $S(d)$ is modeled according to the linear-quadratic model (LQ-model):

$$S(d) = \exp(-c - \alpha d - \beta d^2) = PE \times \exp(-\alpha d - \beta d^2) \quad (1)$$

or equivalently in a log scale:

$$\log(S(d)) = -c - \alpha d - \beta d^2 = \log(PE) - \alpha d - \beta d^2.$$

where c , α , and β are the model parameters and $PE = S(0) = \exp(-c)$ represents the plating efficiency, i.e. the

surviving fraction of unirradiated cells. This Bernoulli trials representation was recently shown to be suitable for modeling clonogenic survival data (Shuryak et al. 2016).

According to filtrations and volumes, the survival fractions among two experimental groups G_0 (reference) and G_1 were compared using a likelihood ratio test (LRT) for generalized linear models (here a binomial regression). With the same notations as above, the idea is to test the hypothesis:

$$H_0 : S_0(d) = S_1(d) \text{ for all doses } d \text{ against its alternative:}$$

$$H_1 : S_0(d) \neq S_1(d) \text{ for some dose } d.$$

In the pooled G_0 and G_1 data and under H_0 , the parameters in model (1) are estimated in a 'free-group' way:

$$\log(S^{H_0}(d)) = -c_0 - \alpha_0 d - \beta_0 d^2.$$

In the pooled G_0 and G_1 data and under H_1 , the radiation-related parameters α and β can be different in the two groups, and this can be formulated by introducing an 'interaction' covariate χ_i equal to 0 in group 0 and 1 in group 1:

$$\begin{aligned} \log(S^{H_1}(d)) &= -c_0 - (\alpha_0 + \alpha_i \chi_i) d - (\beta_0 + \beta_i \chi_i) d^2 \\ &= -c_0 - \alpha_0 d - \alpha_i \chi_i d - \beta_0 d^2 - \beta_i \chi_i d^2 \end{aligned}$$

Where c_0 , α_0 , and β_0 are the reference group parameters and α_i , β_i are interaction parameters.

We reject H_0 in favor of H_1 for large values of the LRT-statistic,

$$T = -2(LL_{H_0} - LL_{H_1}).$$

Where LL denotes the logarithm of binomial regression likelihood:

$$LL = \sum_d \sum_i [y_i(d) \log(S(d)) + (N_i(d) - y_i(d)) \log(1 - S(d))].$$

The null distribution (under H_0) of the test statistics T is approximated using a permutation method (Good 2005; Pesarin and Salmaso 2010) where a permutation sample is generated by randomly partitioning the clonogenic survival data within each dose into groups of the same size as G_0 and G_1 .

Computations for this study were carried out using MATLAB Software version 8.2.0.701 (MathWorks R2013b, MathWorks Inc., Natick, MA).

Results

Dosimetry measurements on the SARRP irradiator

Measurements of beam quality index: HVL

For the measurements of beam quality index, the procedure described in the AAPM protocol (Ma et al. 2001) was followed. Nevertheless, as the distance between the irradiation source and the floor of the irradiator is limited, it was not possible to achieve a distance of 1 m between the source and the ionization chamber as recommended (Ma et al. 2001). Due to this limitation, we chose a detector-source distance of 70 cm. HVL value was measured for HV between 40 and 220 kV for the two additional filtrations available on the SARRP (Supplementary data II). On the following of this work,

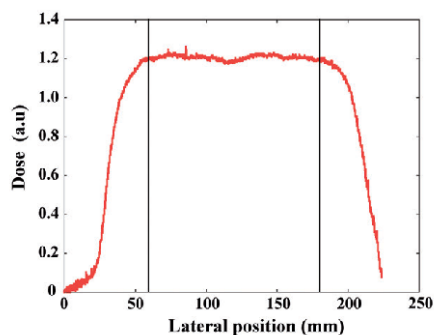


Figure 2. Dose profile obtained with the SARRP irradiator without a collimator at the reference position.

where irradiations were performed at 80 kV, HVL values about 0.056 and 0.138 mm of copper were measured for 1 or 0.15 mm of aluminum or copper additional filtrations, respectively.

Homogeneity of irradiation field

As the SARRP irradiator is mainly used for small animal irradiation with very small irradiation fields (less than $10 \times 10 \text{ mm}^2$), the irradiation field at the reference position (source-sample distance 35 cm) in open field conditions, is limited to roughly $20 \times 20 \text{ cm}^2$ including penumbra regions and roughly $12 \times 12 \text{ cm}^2$ without penumbra regions, and by taking into account margins to avoid errors induced by plate positioning. In order to have the same dose in all our cells, we decided to limit the efficient irradiation field at the central region materialized by black lines in Figure 2.

One way to increase the irradiation field is to increase the source-sample distance, but because of dose rate limitations for some configurations, we had to irradiate at the reference position. For small containers like Nunc™ Lab-Tek™ or T25, the irradiation field is much larger than the cell culture support. Nevertheless, for 6-, 12-, 24-, or 96-well plates, it is not possible to irradiate the whole cell culture support at the same dose as the dimensions of the plate are about $12.7 \times 8.5 \text{ cm}^2$. Thus, in order to deliver the same dose to all cells, we removed columns that were not completely covered by the irradiation field, as illustrated in Figure 3 for the 6-plate well. The wells outside our irradiation field were filled with water to maintain humidity and scattered radiation compare with fully irradiated plates. Thanks to these considerations, we are able to irradiate cells at 98% isodose. The same procedure was followed for the 12-, 24-, and 96-well plates.

Dose rate measurement

As previously mentioned, absolute dose rate measurements were performed with two ionization chambers. The specificity of our protocol is that K_{air} dose rate is measured in each experiment in the container used for cell irradiation in order to take into account the container effect. In order to

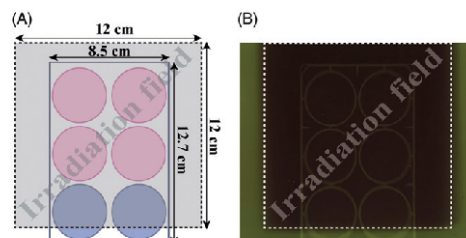


Figure 3. (A) Irradiation field at the reference position for the 6-well microplate configuration. (B) Irradiation field at the reference position measured with EBT3 radiochromic film. To avoid errors induced by plate positioning, only 4 wells have been considered for irradiation. The two remaining wells are filled with water.

determine the dose rate on cells, this value is converted into water kerma using the ratio of mean mass energy transfer coefficients for water to air for the energy spectrum considered and by also taking into account the attenuation of the cell culture medium. On the following of this work, for irradiations at 80 kV, dose rate was measured in six-well plate, where lids were replaced by sterile films (Breathe-EASIER™ Diversified Biotech, ref BERM-2000, Dedham, MA), with the TM23342 ionization chamber at the isocenter (source-sample distance = 35 cm). The dose rate obtained is $0.63 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ in K_{air} . In order to have the same dose rate for each filtration, the current of the SARRP platform was 6.8 mA for the 1 mm aluminum filtration and 20.7 mA for the 0.15 mm copper filtration.

Here, we propose a protocol that differs somewhat from the reference dosimetry protocol. We performed dosimetry measurements under conditions as close as those of irradiations in order to take into account all parameters that may influence the physical dose to cells, especially at low X-ray energy, like material of containers or the quantity of cell culture medium. Measurements free in air without the container were also performed to evaluate its influence. As an example in relation with results presented after, at 80 kV with copper filtration, the presence of the container increases the dose rate by 4.3%. Therefore, for this type of configuration, the representativeness of a free in air measurements could be questioned.

Influence of the variation of parameters on the physical dose

To highlight the importance of accurate dosimetry protocols and irradiation conditions, two experiments at 80 kV were performed with the two additional filtrations available with the SARRP (0.15 mm copper and 1 mm aluminum), and by varying the quantity of media on the container. All our results are compared to our reference irradiation condition which is a 6-well microplate filled with 3 mL of cell culture medium, thus taking into account the attenuation due to the cell culture medium.

In both cases, dosimetry was performed using ionization chamber TM23342 and radiochromic EBT3 films. Twelve pieces of radiochromic film were irradiated with 3, 9, and

Table 1. Variation of the dose measured on radiochromic films for three conditions of irradiation.

Additional filtration	1 mL per well (%)	3 mL per well	9 mL per well (%)
Configuration 1: 0.15 mm Cu	+1	Reference	-8
Configuration 2: 1 mm Al	+8	Reference	-39,6

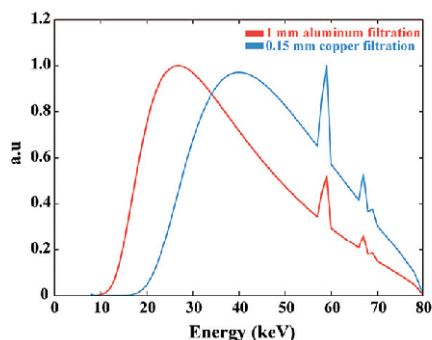


Figure 4. Simulated energy spectra obtained at 80 kV with SpekCalc software for the two additional filtrations available on the SARRP, 1 mm aluminum (red curve) and 0.15 mm copper (blue curve).

1 mL per well corresponding, respectively, to 0.313, 0.936, and 0.104 cm of thickness. As our reference condition is 3 mL per well, all well plates were irradiated for the same time, corresponding to a dose of 2 Gy received by cell for the reference configuration. These films were analyzed by following the method explained in section *Relative dosimetry with radiochromic films* and the results are reported in Table 1.

As expected, these results show that dose increases when medium volume decreases. These variations with respect to the reference configuration were greater in the case of aluminum filtration due to a higher proportion of very low-energy X-rays. If we compare the energy spectrum obtained with the two additional filtrations, a greater proportion of very low-energy X-rays pass through the aluminum filtration (Figure 4). These very low-energy X-rays are quickly attenuated and stopped in the media, so as the quantity of media increases, less X-ray energy reaches the radiochromic films, leading to dose diminution. For a given dose rate determined with a reference protocol (AAPM and IAEA), the dose really delivered to cells can significantly vary depending of the cell container and the volume of cell culture medium used by the experimenter. These data questioned again the representatives of reference measurements performed free in air. Therefore, especially for the irradiation with HV below 100 kV, we have implemented a protocol to take into account the influence of the container and of the cell culture medium to provide a reference dose closer to the dose received by cells.

Influence on the biological response measured by the clonogenic assay

Clonogenic assay was used to evaluate changes in the set-up parameters in cell irradiation configuration (filtration and/or

volume of cell culture medium). HUVECs were irradiated from 0 to 4 Gy at 80 kV and $0.63 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ (using copper or aluminum additional filtration, named configurations 1 and 2, respectively). Cell survival fractions were calculated for each dose of irradiation. The two reference conditions (3 mL/well in configurations 1 and 2) are depicted by green curves (Figure 5(A,B)). Strictly, similar experiments were conducted with 1 or 9 mL/well for configurations 1 and 2 (Figure 5(A,B), respectively). These modified volumes (1 and 9 mL) were used only during the irradiation step. Indeed each well contains 3 mL during the 3 h adhesion step prior irradiation. Just before irradiation step, 2 mL were removed on wells which will contain 1 and 6 mL were added into wells which will contain 9 mL. Then, just after irradiation step, 2 mL was added on wells containing 1 and 6 mL were removed from wells containing 9 mL. Thus, during the next 9 d, each condition is performed with the same amount of medium per well.

We observed that only the 9 mL condition significantly impacted the survival fraction curve in configuration 1 ($p < .001$) (Figure 5(A)). The 1 mL condition (red dotted curve, Figure 5(A)) was still significantly different ($p = .03$) from the reference condition (green curve, Figure 5(A)) at the highest doses, in the neighborhood of 4 Gy. On the other hand, in configuration 2, the survival curves for 1 and 9 mL were significantly different from the reference condition ($p < .001$ both) (Figure 5(B)). These observations are in accordance regarding the dose variations measured on EBT3 radiochromic films (refer to Table 1) for two conditions of irradiation (configurations 1 and 2).

Based on these measured variations compared to the reference condition, we corrected the 'wrong dose' to the 'right deposited dose' by taking into account the attenuation of the cell culture medium to visualize more easily the impact of such variations (Figure 6), where the green curve represents the reference condition, the red curve represents the biological response measured with the 'wrong dose' and the blue curve represents the same data as the red curve but after correction of the abscissa (dose) with the 'right deposited dose' values according to the results in Table 1.

We observed that compared to the reference condition (3 mL/well), volume errors in configuration 2 strongly impact the survival fraction curves (Figure 6(C,D)), decreasing the survival fraction for 1 mL/well (Figure 6(C)) and increasing the survival fraction in the case of 9 mL/well (Figure 6(D)). Finally, we also observed an atypical curve for the 9 mL condition in configuration 2 (Figure 6(D)). In this condition, the survival curve has a negative β factor instead of being positive and fitting an LQ-model (red and blue curves, Figure 6(D)). An example of clones obtained at 2 Gy for this particular condition (9 mL/well in configuration 2) is depicted in Supplementary data III.

Discussion

This work was initiated in the framework of the implementation of dosimetry protocols for cell irradiation on the SARRP platform. With the development and democratization of the

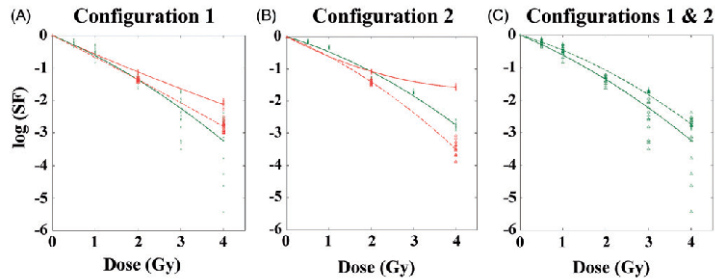


Figure 5. (A) Survival curves of HUVECs irradiated from 0 to 4 Gy at the SARRP (80 kV, $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ and copper filtration: configuration 1). (B) Survival curves of HUVECs irradiated from 0 to 4 Gy at the SARRP (80 kV, $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ and aluminum filtration: configuration 2). For A and B, green curves correspond to the reference condition (3 mL/well), dotted red curves to 1 mL/well and plain red curves to 9 mL/well. (C) Plain green curve represents the reference condition (3 mL/well) for configuration 1, dotted green curve represent the reference condition (3 mL/well) for configuration 2. For A–C, each curve represents data from four independent experiments, each experiment including 4 wells per dose.

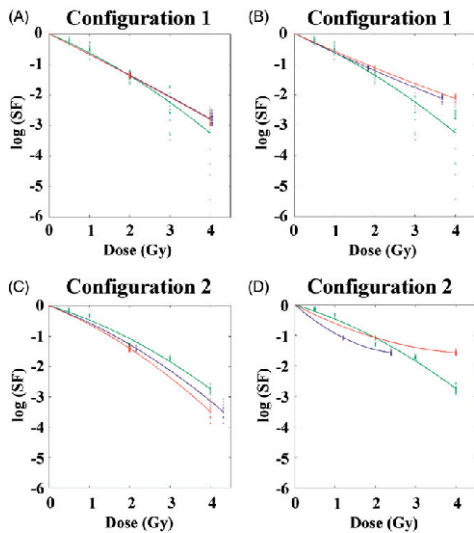


Figure 6. (A,B) Survival curves of HUVECs irradiated from 0 to 4 Gy at the SARRP (80 kV, $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ and copper filtration: configuration 1). For A and B, green curves represent the reference condition (3 mL/well). Red curves represent data measured for 1 mL/well (A) or 9 mL/well (B) while blue curves represent the same data as red curves but taking into account the error in the physical dose for 1 mL/well (A) or 9 mL/well (B). (C,D) Survival curves of HUVECs irradiated from 0 to 4 Gy at the SARRP (80 kV, $0.63 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, and aluminum filtration: configuration 2). For C and D, green curves represent the reference condition (3 mL/well). Red curves represent data measured for 1 mL/well (A) or 9 mL/well (B) while blue curves represent the same data as red curves but taking into account the correction of the physical dose for 1 mL/well (C) or 9 mL/well (D). Each curve represents data from four independent experiments, each experiment including 4 wells per dose.

use of cost-effective equipment like small X-ray irradiators, which are easy to use, self-protected and have fewer radio-protection constraints than cesium, or cobalt sources, adapted dosimetry protocols are needed. Several studies have highlighted the importance of the description and formalism of dosimetry protocols, and well-defined dosimetry protocols, especially at low-energy, appear to be crucial in

establishing links between doses and radiation-induced biological effects (Zoetelief et al. 2001; Desrosiers et al. 2013; Trompier et al. 2016). Nevertheless, although some protocols have already been described in the literature for this type of irradiation (Zoetelief et al. 1985; Desrosiers et al. 2013), where dosimetry measurements are performed with ionization chambers and calibrated in dose to water or in K_{air} , at the surface of a solid water phantom or free in air, we implemented a new protocol in order to perform dosimetry measurements as close as possible to real cell irradiation conditions. For this, measurements were made of absolute dosimetry with an ionization chamber and relative dosimetry with EBT3 radiochromic films in each cell container, to evaluate dose rate and attenuation due to the cell culture medium. Especially with low-energy X-rays, the quantity of cell culture medium (attenuation), containers, and the use of a phantom (quantity of secondary electrons created) can influence the physical dose (Noblet et al. 2014).

To highlight the importance of all parameters of a dosimetry protocol, we evaluated the impact of change in the quantity of cell culture medium on the physical dose at 80 kV for aluminum and copper filtration. Change in volume and/or filtration led to significant variations in the physical doses measured by EBT3 films, which illustrates the importance of rigorous adhesion to the protocol to avoid introducing errors in the dose delivered to cells. To verify the possible effects on the biological response, we measured the survival fraction of HUVECs using the clonogenic assay. HUVECs were chosen as a biological model due to their capability to form clones in dishes (Abderrahmani et al. 2012). Moreover, we currently use these cells as biological model to evaluate the effects of ionizing radiations since many years in several of our research project, vascular injury being one of the most common effects of radiotherapy on normal tissues (Corre et al. 2013; Korpela and Liu 2014). The clonogenic assay was chosen since the evaluation of radiosensitivity is historically linked to the survival fraction measured by the clonogenic assay, which is the gold standard in such evaluations (Puck and Marcus 1956). This assay is based on the ability of a single cell to grow into a colony after a stress (Munshi et al. 2005; Franken et al. 2006; Rafehi et al. 2011). The

representation of the survival fraction as a function of the dose leads to survival curves, which are modeled by the LQ-model (Chadwick and Leenhouts 1981). Based on this approach, we used the LQ-model to fit our cell survival curves in each set of irradiation conditions (Figure 5). The results indicate that the survival fractions for cells exposed to X-ray at 80 kV for 1 mm aluminum filtration are higher than for the 0.15 mm copper filtration at a same dose (Figure 5(C)). Referring to the energy spectra of these two configurations of irradiation, we observed a shift of the energy spectrum toward low-energy X-rays for aluminum filtration, leading to a lower mean energy of the energy spectrum of about 37.8 versus 47 keV for copper filtration. This could explain why photons are more easily attenuated by the medium with aluminum filtration than with copper filtration, thus leading to more clones in aluminum filtration compared to copper filtration (Figure 5).

Filtration mistakes are possible as they are manually set-up by the experimenter at SARRP, but this is not the only potential source of error when performing an experiment on such irradiator device. The volumes used in cell culture dishes vary greatly in the literature, but also handling errors in cell culture volumes can occur when performing the experiment. We, therefore, decided to change the volume for the two conditions of irradiation to demonstrate by proof of concept the importance of dosimetry formalism for cell irradiation on a SARRP platform and the effects on the biological response. The dose variation measurements performed with EBT3 films when the cell culture volume was changed were perfectly verified by clonogenic assay. Using additional copper filtration, when the reference volume 3 mL/well was replaced by 1 or 9 mL/well, EBT3 films indicated dose variations of +1 and -8%, respectively. The clonogenic assay for 1 mL/well showed a significant difference ($p = .03$) mainly for the 4 Gy data, which could be partly explained by the higher distribution of the survival fraction values obtained at 4 Gy in the reference conditions. Moreover, we detected a significant difference for the 9 mL/well condition, the survival fraction being significantly greater ($p < .001$) than in the reference condition from 0 to 4 Gy. These biological data fully corroborate the dosimetric measures of EBT3 films when considering the 9 mL/well condition. Concerning the configuration using additional aluminum filtration, the physical doses measured by EBT3 indicated an increase of around 8% when 3 mL/well was replaced by 1 mL of cell culture medium. These differences were confirmed at the biological level. Clonogenic assay performed with 1 mL/well led to a decrease of the survival fraction compared to the reference condition. Cells received a higher dose than expected, leading to the shift observed in the survival fraction curve. On the other hand, we obtained an atypical curve for the 9 mL/well condition (compared to the reference curve). Even though we observed a higher cell survival fraction, the linear quadratic part of the curve had a negative β coefficient. A possible explanation is provided in Supplementary data III. According to the literature, the colony size cut-off is set to 60 cells per clone in our clonogenic assay experiments (Franken et al. 2006). When we carefully observed the wells in the 2 Gy condition, there were higher numbers of small clones (below 60 cells per clone) in the

9 mL condition than in the reference condition and even more than in the 1 mL condition. This could explain why the survival fraction at 2 Gy was lower than that expected for a more classic dose-response curve, fitting with the conventional LQ-model or at least a linear one. Indeed, 9 mL instead of the 3 mL per well leads to a lower dose received by the cells and possibly changing the adverse effects on exposed cells, e.g. changing the nature of damages induced within cell population allowing more survey along the cell divisions even though these clones remain below the 'size' cut-off at the end of the experiment. To verify this hypothesis, it should be interesting to characterize the phenotype of surviving cells within these 'smaller clones' for both conditions (1, 3, and 9 mL). Finally, this observation is quite disturbing in terms of biological response. Moreover, it emphasizes the importance of correct and accurate physical/biological set-ups for irradiation in order to avoid inappropriate results and a lack of robustness and reproducibility of the data.

Our findings highlighted the importance of the dosimetry formalism for cell irradiations and show that a variation on set-up parameters, like cell culture medium, or cell container, is sufficient to induce observable biological difference, especially for experimentations performed with low X-rays facility. Aware of this problem, recommendations have been made to the experimenter do not change the cell container or the volume of cell culture medium in order to avoid incorrect dose delivered to cell. Obviously on SARRP facility, one could propose in order to limit the influence of volume cell culture media, the X-ray tube could be rotated by 180 degrees in order to irradiate the cell from below. This is not done at IRSN to avoid problem with the tube in case of leakage of flask and tube. Moreover, in a more general way, for classical X-rays cabinet dedicated to cell irradiation, irradiations are always performed from the top. Therefore, for this kind of facility, which is much more widely used than SARRP for cell irradiation, the recommendations proposed for the SARRP by IRSN are fully relevant.

Conclusions

Taken together, these results strongly support the fact that a dosimetry is needed for each irradiation set-up and that all the parameters defined for one set of irradiation conditions should be monitored to avoid errors in the dose delivered to the sample, e.g. do not change the volume of cell culture medium, and use the correct filtration. For low HV (<100 kV), a single kerma-rate measurement in air in the center of the irradiation volume does not allow estimating the actual delivered dose to the biological target: each irradiation configuration necessitates a specific dosimetry. This work highlights the importance of the dosimetry formalism and description for radiobiology studies to be able to compare and interpret experiments, particularly when important resources are put in place for inter-laboratory comparison programs. Thus, a new formalism, applicable to many low X-rays facilities, is proposed to take into account parameters influencing the delivered dose.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (ROSIRIS program).

Notes on contributors

Morgane Dos Santos is a physics researcher who focus her work on dosimetry and in charge of the SARRP platform at IRSN.

Vincent Paget is a researcher radiobiologist who focus his work on radiobiological effects for several kinds and qualities of ionizing radiation exposure.

Mariam Ben Kacem is a PhD student in the field of radiation biology at IRSN. Ben Kacem focuses on studying biological effects of endothelial cells exposed to radiation of different modalities.

François Trompier is a physics researcher with focus his work on dosimetry and EPR spectroscopy.

Mohamed Amine Benadjaoud, PhD in Biostatistics and MSc in medical physics, Researcher at the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN). His main activities include the development of multiscale risk models through radiobiological data integration.

Agnès François is a researcher radiobiologist with an expertise in the field of radiation-induced normal tissue damages.

Olivier Guipaud is a researcher in the field of radiobiology of the vascular endothelium at IRSN. Guipaud focuses on endothelial factors involved in the recruitment of immune cells into tumours and normal tissues following radiotherapy.

Marc Benderitter is a radiopathologist and the head of the Department of Radiobiology and regenerative Medicine (SERAMED) at IRSN.


Fabien Milliat is a researcher and the head of the Laboratory of Medical Radiobiology at IRSN. Milliat is an expert in the field of radiobiological effects and on the role of the vascular compartment in radiation-induced normal tissue damages.

Funding

This work was supported by Electricité de France EDF (Groupe Gestion Projet Radioprotection) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (ROSIRIS program).

ORCID

Vincent Paget  <https://orcid.org/0000-0002-3335-7386>

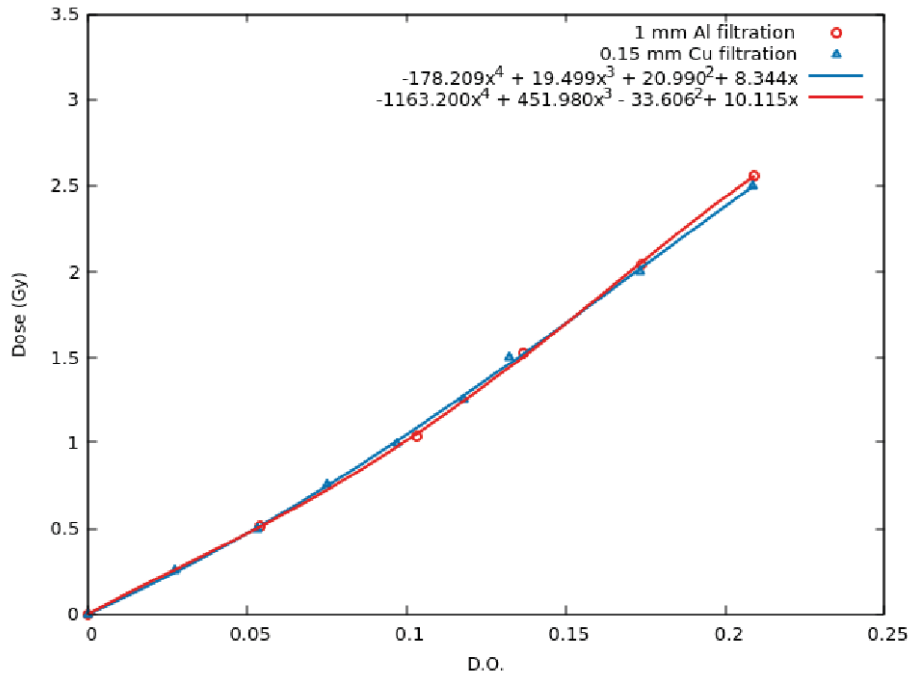
François Trompier  <http://orcid.org/0000-0002-8776-6572>

References

- Abderrahmani R, Francois A, Buard V, Tarlet G, Bliando K, Hneino M, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F. 2012. PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS One*. 7:e35740.
- Chadwick KH, Leenhouts HP. 1981. The molecular theory of radiation biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Coleman CN, Stone HB, Alexander GA, Barcellos-Hoff MH, Bedford JS, Bristow RG, Dynlacht JR, Fuks Z, Gorelic LS, Hill RP, et al. 2003. Education and training for radiation scientists: radiation research program and American Society of Therapeutic Radiology and Oncology Workshop, Bethesda, Maryland, May 12–14. *Radiat Res*. 160:729–737.
- Corre I, Guillonneau M, Paris F. 2013. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int J Mol Sci*. 14:22678–22696.
- Deng H, Kennedy CW, Armour E, Tryggstad E, Ford E, McNutt T, Jiang L, Wong J. 2007. The small-animal radiation research platform (SARRP): dosimetry of a focused lens system. *Phys Med Biol*. 52:2729–2740.
- Desrosiers M, DeWerd L, Deye J, Lindsay P, Murphy MK, Mitch M, Macchiarini F, Stojadinovic S, Stone H. 2013. The importance of dosimetry standardization in radiobiology. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 118:403–418.
- Devic S, Seuntjens J, Sham E, Podgorsak EB, Schmidlein CR, Kirov AS, Soares CG. 2005. Precise radiochromic film dosimetry using a flat-bed document scanner. *Med Phys*. 32:2245–2253.
- DIN (DIN). 1988. Klinische dosimetrie: teil 4. Anwendung von röntgenstrahlen mit röhrenspannungen von 10 bis 100 kV in der strahlentherapie und in der weichteildagnostik DIN 6809/DIN 6809. Berlin: DIN.
- DIN (DIN). 1996. Klinische dosimetrie: teil 5: anwendung von röntgenstrahlen mit röhrenspannungen von 100 bis 400 kV in der strahlentherapie DIN 6809-5/DIN 6809-5. Berlin: DIN.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 1:2315–2319.
- Good PI. 2005. Permutation, parametric, and bootstrap tests of hypotheses. New York: Springer.
- Hubbell JH, Seltzer SM. 2004. Tables of X-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients (version 1.4). Gaithersburg (MD): National Institute of Standards and Technology.
- IAEA. 2000. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy Vienna: International Atomic Energy Agency.
- IOFS (ISO). 1996. X and gamma reference radiation for calibrating doseimeters and dose rate meters and for determining their response as a function of photon energy – part 1: radiation characteristics and production methods ISO/TC 85/SC 2/ISO/TC 85/SC 2. Geneva, Switzerland: ISO.
- Korpela E, Liu SK. 2014. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat Oncol*. 9:266.
- Ma CM, Coffey CW, DeWerd LA, Liu C, Nath R, Seltzer SM, Seuntjens JP. 2001. AAPM protocol for 40–300 kV X-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med Phys*. 28:868–893.
- Micke A, Lewis DF, Yu X. 2011. Multichannel film dosimetry with nonuniformity correction. *Med Phys*. 38:2523–2534.
- Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. 2005. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*. 110:21–28.
- NCV5 (NCS). 1997. Dosimetry of low and medium energy X-rays: a code of practice for use in radiotherapy and radiobiology. Netherlands: Nederlandse Commissie voor Stralingsdosimetrie. Report No. 10.
- Noblet C, Chiavassa S, Paris F, Supiot S, Lisbona A, Delpon G. 2014. Underestimation of dose delivery in preclinical irradiation due to scattering conditions. *Phys Med*. 30:63–68.
- Peixoto JG, Andreo P. 2000. Determination of absorbed dose to water in reference conditions for radiotherapy kilovoltage X-rays between 10 and 300 kV: a comparison of the data in the IAEA, IPEMB, DIN and NCS dosimetry protocols. *Phys Med Biol*. 45:563–575.
- Pedersen KH, Kunugi KA, Hammer CG, Culberson WS, DeWerd LA. 2016. Radiation biology irradiator dose verification survey. *Radiat Res*. 185:163–168.
- Pesarin F, Salmaso L. 2010. Permutation tests for complex data: theory, applications and software. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, Ltd.
- Poludniowski G, Landry G, DeBlois F, Evans PM, Verhaegen F. 2009. SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes. *Phys Med Biol*. 54:N433–N438.
- Puck TT, Marcus PI. 1956. Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med*. 103:653–666.
- Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. 2011. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp*. 49:2573.

- Shuryak I, Sun Y, Balajee AS. 2016. Advantages of binomial likelihood maximization for analyzing and modeling cell survival curves. *Radiat Res.* 185:246–256.
- Trompier F, Baumann M, Barrios L, Gregoire E, Abend M, Ainsbury E, Barnard S, Barquintero JF, Bautista JA, Brzozowska B, et al. 2016. Investigation of the influence of calibration practices on cytogenetic laboratory performance for dose estimation. *Int J Radiat Biol.* 93:118–126.
- Wong J, Armour E, Kazanzides P, Iordachita I, Tryggstad E, Deng H, Matinfar M, Kennedy C, Liu Z, Chan T, et al. 2008. High-resolution, small animal radiation research platform with X-ray tomographic guidance capabilities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 71:1591–1599.
- Yoshizumi T, Brady SL, Robbins ME, Bourland JD. 2011. Specific issues in small animal dosimetry and irradiator calibration. *Int J Radiat Biol.* 87:1001–1010.
- Zoetelief J, Broerse JJ, Davies RW, Octave-Prignot M, Rezvani M, Vergara JC, Toni MP. 2001. Protocol for X-ray dosimetry in radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 77:817–835.
- Zoetelief J, Broerse JJ, Davies RW. 1985. Protocol for X-ray dosimetry EULEP. Report EUR 9507, Luxembourg: Euratom.
- Zoetelief J, Jansen JT. 1997. Calculated energy response correction factors for LiF thermoluminescent dosimeters employed in the seventh EULEP dosimetry intercomparison. *Phys Med Biol.* 42:1491–1504.

Supplementary data I:



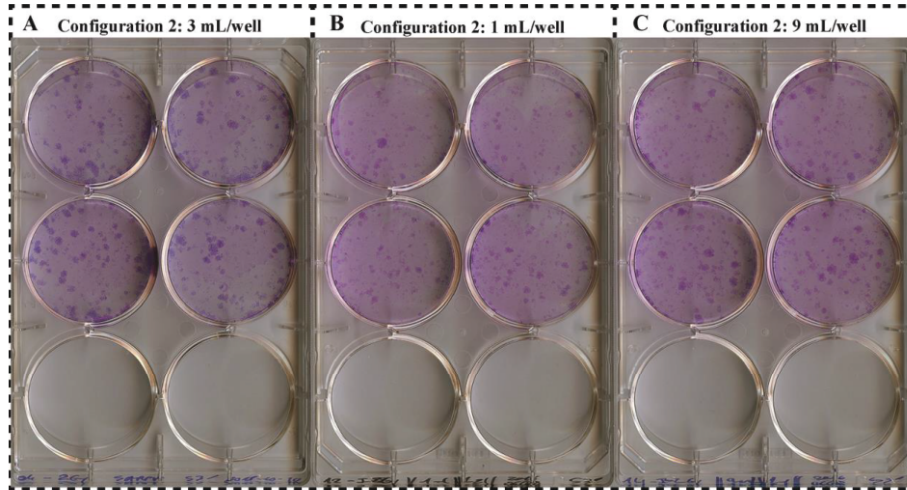
Calibration curves obtained with EBT3 films for aluminum and copper filtration.

Supplementary data II:

HVL values obtained on the SARRP irradiator for the two additional filtrations for different HT.

High Voltage (HV)	Additional filtration: 1 mm aluminum		Additional filtration: 0.15 mm copper	
	HVL mm Cu	HVL mm Al	HVL mm Cu	HVL mm Al
40	0.028	0.852	0.055	1.344
70	0.044	1.339	-	3.218
80	0.056	1.520	0.138	3.724
100	0.070	1.908	0.198	4.748
120	0.103	2.525	0.276	5.852
150	0.128	3.302	0.366	-
180	0.187	4.173	0.461	-
220	0.282	5.420	0.667	-

Supplementary data III:



Example of HUVEC clones obtained after irradiation at 2 Gy with configuration 2 in reference condition at 3 mL/well (Panel A), with 1 mL/well (Panel B) and 9 mL/well (Panel C). Microplates represent one representative experiment among four independent experiences

Bibliographie

- Aboudaram, A., J. Khalifa, C. Massabeau, L. Simon, A. Hadj Henni and S. Thureau (2018). "[Image-guided radiotherapy in lung cancer]." *Cancer Radiother* **22**(6-7): 602-607.
- Acheva, A., S. Haghdoost, A. Sollazzo, V. Launonen and M. Kamarainen (2019). "Presence of Stromal Cells Enhances Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Induction in Lung Bronchial Epithelium after Protracted Exposure to Oxidative Stress of Gamma Radiation." *Oxid Med Cell Longev* **2019**: 4120379.
- Alderson, N. L., Y. Wang, M. Blatnik, N. Frizzell, M. D. Walla, T. J. Lyons, N. Alt, J. A. Carson, R. Nagai, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (2006). "S-(2-Succinyl)cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate." *Arch Biochem Biophys* **450**(1): 1-8.
- Alexander, J. S. and J. W. Elrod (2002). "Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation." *J Anat* **200**(6): 561-574.
- Almeida, C., D. Nagarajan, J. Tian, S. W. Leal, K. Wheeler, M. Munley, W. Blackstock and W. Zhao (2013). "The role of alveolar epithelium in radiation-induced lung injury." *PLoS One* **8**(1): e53628.
- Ammerich, M. (2015). Approche généraliste d'une notice d'information pour les personnes exposées entrant en zone contrôlée - Les risques d'exposition aux rayonnements ionisants. Sakura.
- Ando, K. and Y. Kase (2009). "Biological characteristics of carbon-ion therapy." *Int J Radiat Biol* **85**(9): 715-728.
- Andreyev, H. J., A. Wotherspoon, J. W. Denham and M. Hauer-Jensen (2011). "'Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship." *Scand J Gastroenterol* **46**(4): 389-397.
- Andreyev, J. (2007). "Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients." *Lancet Oncol* **8**(11): 1007-1017.
- Antipova, V. N., L. V. Malakhova and V. G. Bezlepkin (2011). "[Detection of large deletions of mitochondrial DNA in tissues of mice exposed to X-rays]." *Biofizika* **56**(3): 439-445.
- Aratani, S., M. Tagawa, S. Nagasaka, Y. Sakai, A. Shimizu and S. Tsuruoka (2018). "Radiation-induced premature cellular senescence involved in glomerular diseases in rats." *Sci Rep* **8**(1): 16812.
- Ashcroft, T., J. M. Simpson and V. Timbrell (1988). "Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale." *J Clin Pathol* **41**(4): 467-470.
- ASN. "Lexique : Radiologie conventionnelle." from <https://www.asn.fr/Lexique/R/Radiologie-conventionnelle>.
- ASN (2010). Les utilisations médicales des rayonnements ionisants, Autorité de sûreté nucléaire. **Chapitre 9**.
- ASN. (2017). "Les activités contrôlées dans le domaine médical." from <https://www.asn.fr/Informer/Dossiers-pedagogiques/Les-activites-controlees-dans-le-domaine-medical/La-radiologie-interventionnelle>.
- Astrahan, M. (2008). "Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation." *Med Phys* **35**(9): 4161-4172.

- Azzam, E. I., J. P. Jay-Gerin and D. Pain (2012). "Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury." *Cancer Lett* **327**(1-2): 48-60.
- Baillet, F., M. Housset, C. Maylin, G. Boisserie, R. Bettahar, S. Delanian and F. Habib (1990). "The use of a specific hypofractionated radiation therapy regimen versus classical fractionation in the treatment of breast cancer: a randomized study of 230 patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **19**(5): 1131-1133.
- Baker, J. E., B. L. Fish, J. Su, S. T. Haworth, J. L. Strande, R. A. Komorowski, R. Q. Migrino, A. Doppalapudi, L. Harmann, X. Allen Li, J. W. Hopewell and J. E. Moulder (2009). "10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model." *Int J Radiat Biol* **85**(12): 1089-1100.
- Barendsen, G. W. (1982). "Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **8**(11): 1981-1997.
- Barendsen, G. W., T. L. Beusker, A. J. Vergroesen and L. Budke (1960). "Effects of different radiations on human cells in tissue culture. II. Biological experiments." *Radiat Res* **13**: 841-849.
- Barnett, G. C., C. M. West, A. M. Dunning, R. M. Elliott, C. E. Coles, P. D. Pharoah and N. G. Burnet (2009). "Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype." *Nat Rev Cancer* **9**(2): 134-142.
- Bartling, B. (2013). "Cellular senescence in normal and premature lung aging." *Z Gerontol Geriatr* **46**(7): 613-622.
- Baselet, B., O. Azimzadeh, N. Erbedinger, M. V. Bakshi, T. Dettmering, A. Janssen, S. Ktitareva, D. J. Lowe, A. Michaux, R. Quintens, K. Raj, M. Durante, C. Fournier, M. A. Benotmane, S. Baatout, P. Sonveaux, S. Tapio and A. Aerts (2017). "Differential Impact of Single-Dose Fe Ion and X-Ray Irradiation on Endothelial Cell Transcriptomic and Proteomic Responses." *Front Pharmacol* **8**: 570.
- Baselet, B., N. Belmans, E. Coninx, D. Lowe, A. Janssen, A. Michaux, K. Tabury, K. Raj, R. Quintens, M. A. Benotmane, S. Baatout, P. Sonveaux and A. Aerts (2017). "Functional Gene Analysis Reveals Cell Cycle Changes and Inflammation in Endothelial Cells Irradiated with a Single X-ray Dose." *Front Pharmacol* **8**: 213.
- Beaton, L., S. Bandula, M. N. Gaze and R. A. Sharma (2019). "How rapid advances in imaging are defining the future of precision radiation oncology." *Br J Cancer* **120**(8): 779-790.
- Beckta, J. M., J. D. Nosrati and J. B. Yu (2019). "Moderate hypofractionation and stereotactic body radiation therapy in the treatment of prostate cancer." *Urol Oncol*.
- Bedford, J. S. and J. B. Mitchell (1973). "Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture." *Radiat Res* **54**(2): 316-327.
- Ben Kacem, M., M. A. Benadjaoud, M. Dos Santos, F. Soysouvanh, V. Buard, G. Tarlet, B. Le Guen, A. Francois, O. Guipaud, F. Milliat and V. Paget "Variation of 4 MV X-ray dose rate strongly impacts biological response both in vitro and in vivo." *En révision, Scientific Reports*.
- Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 702-713.
- Bertho, A., M. Dos Santos, V. Buard, V. Paget, O. Guipaud, G. Tarlet, F. Milliat and A. Francois "Preclinical model of arc therapy stereotactic ablative lung irradiation in the mouse : volume and dose effects." *En révision, Scientific Reports*.

- Bertoli, C., J. M. Skotheim and R. A. de Bruin (2013). "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(8): 518-528.
- Billena, C. and A. J. Khan (2019). "A Current Review of Spatial Fractionation: Back to the Future?" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **104**(1): 177-187.
- Bladier, C., E. J. Wolvetang, P. Hutchinson, J. B. de Haan and I. Kola (1997). "Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis?" *Cell Growth Differ* **8**(5): 589-598.
- Blais, E., B. Pichon, A. Mampuya, M. Antoine, P. Lagarde, G. Kantor, C. Breton-Callu, C. Lefebvre, M. Gerard, A. Aamarcha, M. Ozsahin, J. Bourhis, P. Maingon, I. Troussier and N. Pourel (2017). "[Lung dose constraints for normo-fractionated radiotherapy and for stereotactic body radiation therapy]." *Cancer Radiother* **21**(6-7): 584-596.
- Bledsoe, T. J., S. K. Nath and R. H. Decker (2017). "Radiation Pneumonitis." *Clin Chest Med* **38**(2): 201-208.
- Boerma, M., C. I. Schutte-Bart, L. E. Wedekind, H. Beekhuizen and J. Wondergem (2003). "Effects of multiple doses of ionizing radiation on cytokine expression in rat and human cells." *Int J Radiat Biol* **79**(11): 889-896.
- Booth, C., G. Tudor, J. Tudor, B. P. Katz and T. J. MacVittie (2012). "Acute gastrointestinal syndrome in high-dose irradiated mice." *Health Phys* **103**(4): 383-399.
- Boreham, D. R., J. A. Dolling, S. R. Maves, N. Siwarungsun and R. E. Mitchel (2000). "Dose-rate effects for apoptosis and micronucleus formation in gamma-irradiated human lymphocytes." *Radiat Res* **153**(5 Pt 1): 579-586.
- Bortfeld, T. (2006). "IMRT: a review and preview." *Phys Med Biol* **51**(13): R363-379.
- Bourge, N. (2005). "Principe de l'accélérateur de particules ", from <http://www.technologies-biomedicales.com/index.php?mod=articles&ac=commentaires&id=17>.
- Bourhis, J., W. J. Sozzi, P. G. Jorge, O. Gaide, C. Bailat, F. Duclos, D. Patin, M. Ozsahin, F. Bochud, J. F. Germond, R. Moeckli and M. C. Vozenin (2019). "Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy." *Radiother Oncol* **139**: 18-22.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* **134**(3): 707-716.
- Brenner, D. J. (2008). "The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction." *Semin Radiat Oncol* **18**(4): 234-239.
- Broens, P., E. Van Limbergen, F. Penninckx and R. Kerremans (1998). "Clinical and manometric effects of combined external beam irradiation and brachytherapy for anal cancer." *Int J Colorectal Dis* **13**(2): 68-72.
- Buffa, F. M., S. E. Davidson, R. D. Hunter, A. E. Nahum and C. M. West (2001). "Incorporating biologic measurements (SF₂, CFE) into a tumor control probability model increases their prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiation therapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**(5): 1113-1122.
- Burton, D. G. and V. Krizhanovsky (2014). "Physiological and pathological consequences of cellular senescence." *Cell Mol Life Sci* **71**(22): 4373-4386.
- Butler, L. E., K. M. Forster, C. W. Stevens, C. Bloch, H. H. Liu, S. L. Tucker, R. Komaki, Z. Liao and G. Starkschall (2004). "Dosimetric benefits of respiratory gating: a preliminary study." *J Appl Clin Med Phys* **5**(1): 16-24.

- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." *Free Radic Biol Med* **29**(3-4): 222-230.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 729-740.
- Cappuccini, F., T. Eldh, D. Bruder, M. Gereke, H. Jastrow, K. Schulze-Osthoff, U. Fischer, D. Kohler, M. Stuschke and V. Jendrossek (2011). "New insights into the molecular pathology of radiation-induced pneumopathy." *Radiother Oncol* **101**(1): 86-92.
- Castellon, X. and V. Bogdanova (2016). "Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction." *Aging Dis* **7**(1): 81-89.
- Cayrol, C., M. Knibiehler and B. Ducommun (1998). "p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells." *Oncogene* **16**(3): 311-320.
- CEA. (2014). "Le fonctionnement d'un scanner X." from <http://www.cea.fr/multimedia/pages/videos/culture-scientifique/sante-sciences-du-vivant/fonctionnement-scanner-x.aspx>.
- Centre Georges François Leclerc. (2019). "Dijon : 2ème ville de France à traiter sur MRIDIAN®." from <https://www.cgfl.fr/2019/07/02/dijon-2eme-ville-de-france-a-traiter-sur-mridian/>.
- Cervelli, T., D. Panetta, T. Navarra, M. G. Andreassi, G. Basta, A. Galli, P. A. Salvadori, E. Picano and S. Del Turco (2014). "Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells." *Atherosclerosis* **235**(2): 510-518.
- Chang, P. Y., X. Jin, Y. Y. Jiang, L. X. Wang, Y. J. Liu and J. Wang (2016). "Mensenchymal stem cells can delay radiation-induced crypt death: impact on intestinal CD44(+) fragments." *Cell Tissue Res* **364**(2): 331-344.
- Chapman, K., F. Sewell, L. Allais, J. L. Delongea, E. Donald, M. Festag, S. Kervyn, D. Ockert, V. Nogues, H. Palmer, M. Popovic, W. Roosen, A. Schoenmakers, K. Somers, C. Stark, P. Stei and S. Robinson (2013). "A global pharmaceutical company initiative: an evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies." *Regul Toxicol Pharmacol* **67**(1): 27-38.
- Chargari, C., F. Riet, M. Mazevet, E. Morel, C. Lepechoux and E. Deutsch (2013). "Complications of thoracic radiotherapy." *Presse Med* **42**(9 Pt 2): e342-351.
- Chateil, J. F., B. Aubert and H. Brisse (2010). "[Typical patient radiation doses in diagnostic imaging]." *J Radiol* **91**(11 Pt 2): 1192-1198; quiz 1199-1200.
- Chater, C., A. Saudemont and P. Zerbib (2019). "Chronic radiation enteritis." *J Visc Surg* **156**(2): 175-176.
- Chaudhary, P., T. I. Marshall, F. M. Perozziello, L. Manti, F. J. Currell, F. Hanton, S. J. McMahon, J. N. Kavanagh, G. A. Cirrone, F. Romano, K. M. Prise and G. Schettino (2014). "Relative biological effectiveness variation along monoenergetic and modulated Bragg peaks of a 62-MeV therapeutic proton beam: a preclinical assessment." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **90**(1): 27-35.
- Chavaudra, J. and A. Bridier (2001). "[Definition of volumes in external radiotherapy: ICRU reports 50 and 62]." *Cancer Radiother* **5**(5): 472-478.
- Chen, S., Y. Zhao, G. Zhao, W. Han, L. Bao, K. N. Yu and L. Wu (2009). "Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects." *Mutat Res* **666**(1-2): 68-73.

- Chen, X., Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen and Y. Wang (2010). "2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy." *Free Radic Res* **44**(6): 587-604.
- Chen, Z., Z. Wu and W. Ning (2019). "Advances in Molecular Mechanisms and Treatment of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis." *Transl Oncol* **12**(1): 162-169.
- Chiang, C. S., W. C. Liu, S. M. Jung, F. H. Chen, C. R. Wu, W. H. McBride, C. C. Lee and J. H. Hong (2005). "Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: strain differences." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **62**(3): 862-871.
- Cho, B. (2018). "Intensity-modulated radiation therapy: a review with a physics perspective." *Radiat Oncol J* **36**(1): 1-10.
- Cho, J. G., A. Lee, W. Chang, M. S. Lee and J. Kim (2018). "Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction." *Front Immunol* **9**: 294.
- Choi, J. and J. O. Kang (2012). "Basics of particle therapy II: relative biological effectiveness." *Radiat Oncol J* **30**(1): 1-13.
- Choi, S. H., M. Kim, H. J. Lee, E. H. Kim, C. H. Kim and Y. J. Lee (2016). "Effects of NOX1 on fibroblastic changes of endothelial cells in radiation-induced pulmonary fibrosis." *Mol Med Rep* **13**(5): 4135-4142.
- Ciorba, M. A. and W. F. Stenson (2009). "Probiotic therapy in radiation-induced intestinal injury and repair." *Ann N Y Acad Sci* **1165**: 190-194.
- CIRSE (2011). *Radiologie Interventionnelle: Votre alternative à la chirurgie. Oncologie Interventionnelle, Information pour les patients, Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe.*
- Citrin, D. E., P. G. S. Prasanna, A. J. Walker, M. L. Freeman, I. Eke, M. H. Barcellos-Hoff, M. J. Arankalayil, E. P. Cohen, R. C. Wilkins, M. M. Ahmed, M. S. Anscher, B. Movsas, J. C. Buchsbaum, M. S. Mendonca, T. A. Wynn and C. N. Coleman (2017). "Radiation-Induced Fibrosis: Mechanisms and Opportunities to Mitigate. Report of an NCI Workshop, September 19, 2016." *Radiat Res* **188**(1): 1-20.
- Citrin, D. E., U. Shankavaram, J. A. Horton, W. Shield, 3rd, S. Zhao, H. Asano, A. White, A. Sowers, A. Thetford and E. J. Chung (2013). "Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis." *J Natl Cancer Inst* **105**(19): 1474-1484.
- Coia, L. R., R. J. Myerson and J. E. Tepper (1995). "Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**(5): 1213-1236.
- Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." *Annu Rev Pathol* **5**: 99-118.
- Corre, I., M. Guillonneau and F. Paris (2013). "Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity." *Int J Mol Sci* **14**(11): 22678-22696.
- Crawford, P. A. and J. I. Gordon (2005). "Microbial regulation of intestinal radiosensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(37): 13254-13259.
- Cross, M. J. and L. Claesson-Welsh (2001). "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition." *Trends Pharmacol Sci* **22**(4): 201-207.

- Dale, R. G. (1985). "The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy." *Br J Radiol* **58**(690): 515-528.
- Davey, K. M., J. S. Parboosingh, D. R. McLeod, A. Chan, R. Casey, P. Ferreira, F. F. Snyder, P. J. Bridge and F. P. Bernier (2006). "Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition." *J Med Genet* **43**(5): 385-393.
- Dearnaley, D., I. Syndikus, H. Mossop, V. Khoo, A. Birtle, D. Bloomfield, J. Graham, P. Kirkbride, J. Logue, Z. Malik, J. Money-Kyrle, J. M. O'Sullivan, M. Panades, C. Parker, H. Patterson, C. Scrase, J. Staffurth, A. Stockdale, J. Tremlett, M. Bidmead, et al. (2016). "Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial." *Lancet Oncol* **17**(8): 1047-1060.
- Dearnaley, D. P., V. S. Khoo, A. R. Norman, L. Meyer, A. Nahum, D. Tait, J. Yarnold and A. Horwich (1999). "Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial." *Lancet* **353**(9149): 267-272.
- Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." *Nat Protoc* **4**(12): 1798-1806.
- Dejean, C., A. Lemosquet, D. Lefkopoulos and E. Touboul (2001). "[Comparison of biological functional assessment in intensity-modulated radiotherapy: two-dimensional study]." *Cancer Radiother* **5**(6): 750-758.
- Delaney, G. P., S. Gandhidasan, R. Walton, F. Terlich, D. Baker and D. Currow (2016). "The Pattern of Use of Hypofractionated Radiation Therapy for Early-Stage Breast Cancer in New South Wales, Australia, 2008 to 2012." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **96**(2): 266-272.
- Dendale, R., J. Thariat, J. Doyen, J. Balosso, D. Stefan, S. Bolle, L. Feuvret, P. Poortmans, J. M. Hannoun-Levi, P. Y. Bondiau, M. Micaud, C. Alapetite, V. Calugaru, J. L. Habrand and M. A. Mahe (2019). "[Proton therapy in France in 2019]." *Cancer Radiother* **23**(6-7): 617-624.
- DenOtter, T. D. and J. Schubert (2019). Hounsfield Unit. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Deschavanne, P. J. and B. Fertil (1996). "A review of human cell radiosensitivity in vitro." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **34**(1): 251-266.
- Dey, S., P. M. Spring, S. Arnold, J. Valentino, D. Chendil, W. F. Regine, M. Mohiuddin and M. M. Ahmed (2003). "Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of Paclitaxel in wild-type and mutant p53 head and neck tumor cell lines." *Clin Cancer Res* **9**(4): 1557-1565.
- Dizdaroglu, M. (2015). "Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer." *Mutat Res Rev Mutat Res* **763**: 212-245.
- Dong, P., P. Lee, D. Ruan, T. Long, E. Romeijn, D. A. Low, P. Kupelian, J. Abraham, Y. Yang and K. Sheng (2013). "4pi noncoplanar stereotactic body radiation therapy for centrally located or larger lung tumors." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **86**(3): 407-413.
- Dong, P., P. Lee, D. Ruan, T. Long, E. Romeijn, Y. Yang, D. Low, P. Kupelian and K. Sheng (2013). "4pi non-coplanar liver SBRT: a novel delivery technique." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**(5): 1360-1366.

- Dong, Y., Y. Cheng, Q. Hou, J. Wu, D. Li and H. Tian (2018). "The Protective Effect of New Compound XH-103 on Radiation-Induced GI Syndrome." *Oxid Med Cell Longev* **2018**: 3920147.
- Dos Santos, M., V. Paget, M. Ben Kacem, F. Trompier, M. A. Benadjaoud, A. Francois, O. Guipaud, M. Benderitter and F. Milliat (2018). "Importance of dosimetry protocol for cell irradiation on a low X-rays facility and consequences for the biological response." *Int J Radiat Biol* **94**(6): 597-606.
- Down, J. D., D. Nicholas and G. G. Steel (1986). "Lung damage after hemithoracic irradiation: dependence on mouse strain." *Radiother Oncol* **6**(1): 43-50.
- Downing, L., K. E. Sawarynski, J. Li, M. McGonagle, M. D. Sims and B. Marples (2010). "A simple quantitative method for assessing pulmonary damage after x irradiation." *Radiat Res* **173**(4): 536-544.
- Dupin, C., F. Vilotte, P. Lagarde, A. Petit and C. Breton-Callu (2016). "[Practice evolution of hypofractionation in breast radiation therapy and medical impact]." *Cancer Radiother* **20**(4): 299-303.
- Ebrahimian, T., C. Le Gallic, J. Stefani, I. Dublineau, R. Yentrapalli, M. Harms-Ringdahl and S. Haghdoost (2015). "Chronic Gamma-Irradiation Induces a Dose-Rate-Dependent Pro-inflammatory Response and Associated Loss of Function in Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Radiat Res* **183**(4): 447-454.
- Ebrahimian, T. G., F. Pouzoulet, C. Squiban, V. Buard, M. Andre, B. Cousin, P. Gourmelon, M. Benderitter, L. Casteilla and R. Tamarat (2009). "Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(4): 503-510.
- Eldh, T., F. Heinzelmann, A. Velalakan, W. Budach, C. Belka and V. Jendrossek (2012). "Radiation-induced changes in breathing frequency and lung histology of C57BL/6J mice are time- and dose-dependent." *Strahlenther Onkol* **188**(3): 274-281.
- Eliason, J. F., M. S. Aapro, D. Decrey and M. Brink-Petersen (1985). "Non-linearity of colony formation by human tumour cells from biopsy samples." *Br J Cancer* **52**(3): 311-318.
- Epah, J., K. Palfi, F. L. Dienst, P. F. Malacarne, R. Bremer, M. Salamon, S. Kumar, H. Jo, C. Schurmann and R. P. Brandes (2018). "3D Imaging and Quantitative Analysis of Vascular Networks: A Comparison of Ultramicroscopy and Micro-Computed Tomography." *Theranostics* **8**(8): 2117-2133.
- Eren, M., A. E. Boe, S. B. Murphy, A. T. Place, V. Nagpal, L. Morales-Nebreda, D. Urich, S. E. Quaggin, G. R. Budinger, G. M. Mutlu, T. Miyata and D. E. Vaughan (2014). "PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): 7090-7095.
- Erusalimsky, J. D. (2009). "Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology." *J Appl Physiol* (1985) **106**(1): 326-332.
- Esmon, C. T. (2000). "Regulation of blood coagulation." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 349-360.
- Evangelou, K. and V. G. Gorgoulis (2017). "Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells." *Methods Mol Biol* **1534**: 111-119.
- Evangelou, K., N. Lougiakis, S. V. Rizou, A. Kotsinas, D. Kletsas, D. Munoz-Espin, N. G. Kastrinakis, N. Pouli, P. Marakos, P. Townsend, M. Serrano, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2017).

- "Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens." *Aging Cell* **16**(1): 192-197.
- Farrero, M., I. Blanco, M. Batlle, E. Santiago, M. Cardona, B. Vidal, M. A. Castel, M. Sitges, J. A. Barbera and F. Perez-Villa (2014). "Pulmonary hypertension is related to peripheral endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction." *Circ Heart Fail* **7**(5): 791-798.
- Favaudon, V., L. Caplier, V. Monceau, F. Pouzoulet, M. Sayarath, C. Fouillade, M. F. Poupon, I. Brito, P. Hupe, J. Bourhis, J. Hall, J. J. Fontaine and M. C. Vozenin (2014). "Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice." *Sci Transl Med* **6**(245): 245ra293.
- Favaudon, V., C. Fouillade and M. C. Vozenin (2015). "[Ultrahigh dose-rate, "flash" irradiation minimizes the side-effects of radiotherapy]." *Cancer Radiother* **19**(6-7): 526-531.
- Fertil, B. and P. J. Deschavanne (1999). "Relationships between colony forming efficiency and parameters of intrinsic radiosensitivity." *Int J Radiat Biol* **75**(10): 1275-1282.
- Fertil, B. and E. P. Malaise (1981). "Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **7**(5): 621-629.
- Figlia, V., R. Mazzola, F. Cuccia, F. Alongi, G. Mortellaro, D. Cespuglio, T. Cucchiara, G. Iacoviello, V. Valenti, M. Molino, F. Verderame, D. Matranga, A. L. Casto and G. Ferrera (2018). "Hypo-fractionated stereotactic radiation therapy for lung malignancies by means of helical tomotherapy: report of feasibility by a single-center experience." *Radiol Med* **123**(6): 406-414.
- Fischer-Valuck, B. W., Y. J. Rao and J. M. Michalski (2018). "Intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer." *Transl Androl Urol* **7**(3): 297-307.
- Fonteyne, V., G. Soete, S. Arcangeli, W. De Neve, B. Rappe, G. Storme, L. Strigari, G. Arcangeli and G. De Meerleer (2012). "Hypofractionated high-dose radiation therapy for prostate cancer: long-term results of a multi-institutional phase II trial." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**(4): e483-490.
- Fouillade, C., S. Curras-Alonso, L. Giuranno, E. Quelennec, S. Heinrich, S. Bonnet-Boissinot, A. Beddok, S. Leboucher, H. U. Karakurt, M. Bohec, S. Baulande, M. Vooijs, P. Verrelle, M. Dutreix, A. Londono-Vallejo and V. Favaudon (2019). "FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence." *Clin Cancer Res*.
- Fouillade, C., V. Favaudon, M. C. Vozenin, P. H. Romeo, J. Bourhis, P. Verrelle, P. Devauchelle, A. Patriarca, S. Heinrich, A. Mazal and M. Dutreix (2017). "[Hopes of high dose-rate radiotherapy]." *Bull Cancer* **104**(4): 380-384.
- Fowler, J. F. (2010). "21 years of biologically effective dose." *Br J Radiol* **83**(991): 554-568.
- Francois, A., F. Milliat, M. C. Vozenin-Brotans, D. Mathe and N. M. Griffiths (2003). "'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat." *Int J Radiat Biol* **79**(6): 437-450.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." *Nat Protoc* **1**(5): 2315-2319.
- Franko, A. J., J. Sharplin, W. F. Ward and J. M. Hinz (1991). "The genetic basis of strain-dependent differences in the early phase of radiation injury in mouse lung." *Radiat Res* **126**(3): 349-356.

- Frid, M. G., V. A. Kale and K. R. Stenmark (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." *Circ Res* **90**(11): 1189-1196.
- Frippiat, C., Q. M. Chen, S. Zdanov, J. P. Magalhaes, J. Remacle and O. Toussaint (2001). "Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts." *J Biol Chem* **276**(4): 2531-2537.
- Galluzzi, L., I. Vitale, E. Vacchelli and G. Kroemer (2011). "Cell death signaling and anticancer therapy." *Front Oncol* **1**: 5.
- Gambini, D.-J. and R. Granier (2007). *Manuel pratique de radioprotection*.
- Gandara, R. M., Y. R. Mahida and C. S. Potten (2012). "Regional differences in stem and transit cell proliferation and apoptosis in the terminal ileum and colon of mice after 12 Gy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **82**(3): e521-528.
- GANIL. (2019). "L'accélération des ions." from <https://www.ganil-spiral2.eu/fr/le-ganil/la-recherche/le-fonctionnement-du-ganil/laceleration-des-ions/>.
- Garcia-Barros, M., F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. Kolesnick (2003). "Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis." *Science* **300**(5622): 1155-1159.
- Georgakopoulou, E. A., K. Tsimaratou, K. Evangelou, P. J. Fernandez Marcos, V. Zoumpourlis, I. P. Trougakos, D. Kletsas, J. Bartek, M. Serrano and V. G. Gorgoulis (2013). "Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues." *Aging (Albany NY)* **5**(1): 37-50.
- Gimbrone, M. A., Jr. and G. Garcia-Cardena (2016). "Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis." *Circ Res* **118**(4): 620-636.
- Giusti, C., M. F. Luciani, G. Klein, L. Aubry, E. Tresse, A. Kosta and P. Golstein (2009). "Necrotic cell death: From reversible mitochondrial uncoupling to irreversible lysosomal permeabilization." *Exp Cell Res* **315**(1): 26-38.
- Gocheva, L. (2004). "Total body irradiation prior to bone marrow transplantation; some aspects of fifty year experience." *J BUON* **9**(2): 147-160.
- Golias, C. H., A. Charalabopoulos and K. Charalabopoulos (2004). "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review." *Int J Clin Pract* **58**(12): 1134-1141.
- Gomolka, M., U. Rossler, S. Hornhardt, L. Walsh, W. Panzer and E. Schmid (2005). "Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays." *Radiat Res* **163**(5): 510-519.
- Gonzalez, S. J. and D. G. Carando (2008). "A general tumour control probability model for non-uniform dose distributions." *Math Med Biol* **25**(2): 171-184.
- Gottlieb, T. M. and M. Oren (1996). "p53 in growth control and neoplasia." *Biochim Biophys Acta* **1287**(2-3): 77-102.
- Goy, A., A. Forero, N. Wagner-Johnston, W. Christopher Ehmann, M. Tsai, K. Hatake, R. Ananthakrishnan, A. Volkert, E. Vandendries and M. Ogura (2016). "A phase 2 study of inotuzumab ozogamicin in patients with indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma refractory to rituximab alone, rituximab and chemotherapy, or radioimmunotherapy." *Br J Haematol* **174**(4): 571-581.

- Graupner, A., D. M. Eide, D. A. Brede, M. Ellender, E. Lindbo Hansen, D. H. Oughton, S. D. Bouffler, G. Brunborg and A. K. Olsen (2017). "Genotoxic effects of high dose rate X-ray and low dose rate gamma radiation in Apc(Min/+) mice." *Environ Mol Mutagen* **58**(8): 560-569.
- Gronberg, B. H., T. O. Halvorsen, O. Flotten, O. T. Brustugun, P. F. Brunsvig, U. Aasebo, R. M. Bremnes, T. Tollali, K. Hornslien, B. Y. Aksnessaether, E. D. Liaaen and S. Sundstrom (2016). "Randomized phase II trial comparing twice daily hyperfractionated with once daily hypofractionated thoracic radiotherapy in limited disease small cell lung cancer." *Acta Oncol* **55**(5): 591-597.
- Gueulette, J. (2013). "Courbes de survie cellulaire et modèles mathématiques." from http://www.imre.ucl.ac.be/rpr/Gueulette%20RDTH3131/Modeles_mathem.pdf.
- Guipaud, O., C. Jaillot, K. Clement-Colmou, A. Francois, S. Supiot and F. Milliat (2018). "The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy." *Br J Radiol* **91**(1089): 20170762.
- Gulliford, S. L., A. B. Miah, S. Brennan, D. McQuaid, C. H. Clark, M. Partridge, K. J. Harrington, J. P. Morden, E. Hall and C. M. Nutting (2012). "Dosimetric explanations of fatigue in head and neck radiotherapy: an analysis from the PARSPORT Phase III trial." *Radiother Oncol* **104**(2): 205-212.
- Gupta, S., T. Koru-Sengul, S. M. Arnold, G. R. Devi, M. Mohiuddin and M. M. Ahmed (2011). "Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of cisplatin independent of the hyper-radiation sensitivity in human lung cancer cells." *Mol Cancer Ther* **10**(2): 292-302.
- Haff, R., E. Jackson, J. Gomez, D. Light, P. Follet, G. Simmons and B. Higbee (2016). "Building lab-scale x-ray tube based irradiators." *Radiation Physics and Chemistry* **121**: 43-49.
- Haines, J., R. Dunford, J. Moody, M. Ellender, R. Cox and A. Silver (2000). "Loss of heterozygosity in spontaneous and X-ray-induced intestinal tumors arising in F1 hybrid min mice: evidence for sequential loss of APC(+) and Dpc4 in tumor development." *Genes Chromosomes Cancer* **28**(4): 387-394.
- Harb, A. H., C. Abou Fadel and A. I. Sharara (2014). "Radiation enteritis." *Curr Gastroenterol Rep* **16**(5): 383.
- Harrington, K., P. Jankowska and M. Hingorani (2007). "Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**(8): 561-571.
- HAS (2006). Radiothérapie extracrânienne en conditions stéréotaxiques. Haute Autorité de santé / Service évaluation des actes professionnels.
- HAS (2010). Hadronthérapie par ions carbone.
- HAS (2015). Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité dans le cancer du col de l'utérus.
- Hauer-Jensen, M., L. Poulakos and J. W. Osborne (1988). "Effects of accelerated fractionation on radiation injury of the small intestine: a new rat model." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **14**(6): 1205-1212.
- Haviland, J. S., J. R. Owen, J. A. Dewar, R. K. Agrawal, J. Barrett, P. J. Barrett-Lee, H. J. Dobbs, P. Hopwood, P. A. Lawton, B. J. Magee, J. Mills, S. Simmons, M. A. Sydenham, K. Venables, J. M. Bliss and J. R. Yarnold (2013). "The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials." *Lancet Oncol* **14**(11): 1086-1094.

- He, Y., D. Thummuri, G. Zheng, P. Okunieff, D. E. Citrin, Z. Vujaskovic and D. Zhou (2019). "Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis." *Transl Res* **209**: 14-21.
- Helm, A., R. Lee, M. Durante and S. Ritter (2016). "The Influence of C-Ions and X-rays on Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Front Oncol* **6**: 5.
- Hennequin, C. and B. Dubray (2013). "[Alpha/beta ratio revisited in the era of hypofractionation]." *Cancer Radiother* **17**(5-6): 344-348.
- Henry, T., A. Ureba, A. Valdman and A. Siegbahn (2016). "Proton Grid Therapy." *Technol Cancer Res Treat*: 1533034616681670.
- Heo, J. I., W. Kim, K. J. Choi, S. Bae, J. H. Jeong and K. S. Kim (2016). "XIAP-associating factor 1, a transcriptional target of BRD7, contributes to endothelial cell senescence." *Oncotarget* **7**(5): 5118-5130.
- Hernandez-Segura, A., J. Nehme and M. Demaria (2018). "Hallmarks of Cellular Senescence." *Trends Cell Biol* **28**(6): 436-453.
- Herskind, C., L. Ma, Q. Liu, B. Zhang, F. Schneider, M. R. Veldwijk and F. Wenz (2017). "Biology of high single doses of IORT: RBE, 5 R's, and other biological aspects." *Radiat Oncol* **12**(1): 24.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-374.
- Houtgraaf, J. H., J. Versmissen and W. J. van der Giessen (2006). "A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells." *Cardiovasc Revasc Med* **7**(3): 165-172.
- Hubner, R. H., W. Gitter, N. E. El Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte, S. Freitag-Wolf and B. Bewig (2008). "Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples." *Biotechniques* **44**(4): 507-511, 514-507.
- Huckriede, A., A. Heikema, K. Sjollem, P. Briones and E. Agsteribbe (1995). "Morphology of the mitochondria in heat shock protein 60 deficient fibroblasts from mitochondrial myopathy patients. Effects of stress conditions." *Virchows Arch* **427**(2): 159-165.
- Hur, W. and S. K. Yoon (2017). "Molecular Pathogenesis of Radiation-Induced Cell Toxicity in Stem Cells." *Int J Mol Sci* **18**(12).
- ICRU (2016). "Report 83: Prescribing, Recording, and Reporting Photon-Beam Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT)." *Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements* **10**(1): NP-NP.
- ICRU (2017). Report 91: Prescribing, Recording, and Reporting of Stereotactic Treatments with Small Photon Beams, International Commission on Radiation Units and Measurements. **14**: 1-160.
- Iliakis, G., Y. Wang, J. Guan and H. Wang (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation." *Oncogene* **22**(37): 5834-5847.
- INCa (2010). Les traitements du cancer du rectum. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2011). Les traitements du cancer invasif du col de l'utérus. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2012). Situation de la radiothérapie en 2011. Institut National du Cancer.
- INCa (2013). Les traitements des cancers du sein. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2013). Les traitements du cancer de l'endomètre. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2014). Les traitements des cancers de l'estomac. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2016). Les traitements des cancers de la prostate. Guides patients Cancer Info.
- INCa (2016). Protonthérapie, Indications et capacité de traitement.
- INCa (2017). Les traitements des cancers du poumon. Guides patients Cancer Info.

- INCa (2018). L'essentiel de la radiothérapie en France en 2017.
- INCa. (2019). "La radiothérapie externe." from <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/La-radiotherapie/L-activite-et-les-techniques-de-traitement/La-radiotherapie-externe2>.
- INCa (2019). Les cancers en France, L'essentiel des faits et chiffres Institut National du Cancer.
- INRS. (2019). "Rayonnements ionisants, Ce qu'il faut retenir." from <http://www.inrs.fr/risques/rayonnements-ionisants/ce-qu-il-faut-retenir.html>.
- IRSN. "Les bases de la radioactivité Qu'est ce qu'un rayonnement ionisant ?", from https://www.irsn.fr/fr/connaissances/nucleaire_et_societe/education-radioprotection/bases_radioactivite/pages/8-rayonnement-ionisant.aspx#.XbcBfqPLSUk.
- IRSN (2014). Exposition de la population française aux rayonnements ionisants liée aux actes de diagnostic médical en 2012 IRSN.
- IRSN. (2017). "Les conséquences des rayonnements ionisants au niveau de l'organisme." from <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/rayonnements-ionisants-effets-radioprotection-sante/effets-rayonnements-ionisants/Pages/4-consequences-niveau-cellule.aspx#.Xbgee6PLSUk>.
- Jahrling, N., K. Becker and H. U. Dodt (2009). "3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy." *Organogenesis* **5**(4): 227-230.
- Jaillet, C., W. Morelle, M. C. Slomianny, V. Paget, G. Tarlet, V. Buard, S. Selbonne, F. Caffin, E. Rannou, P. Martinez, A. Francois, F. Foulquier, F. Allain, F. Milliat and O. Guipaud (2017). "Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences." *Sci Rep* **7**(1): 5290.
- Jain, M. R., M. Li, W. Chen, T. Liu, S. M. de Toledo, B. N. Pandey, H. Li, B. M. Rabin and E. I. Azzam (2011). "In vivo space radiation-induced non-targeted responses: late effects on molecular signaling in mitochondria." *Curr Mol Pharmacol* **4**(2): 106-114.
- Jelonek, K., P. Widlak and M. Pietrowska (2016). "The Influence of Ionizing Radiation on Exosome Composition, Secretion and Intercellular Communication." *Protein Pept Lett* **23**(7): 656-663.
- Jensen, M. H., T. Sauer, F. Devik and K. Nygaard (1983). "Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine." *Acta Radiol Oncol* **22**(4): 299-303.
- Joiner, M. and A. Van der Kogel (2009). *Basic Clinical Radiobiology*.
- Jones, B. (2017). "Proton radiobiology and its clinical implications." *Ecancermedalscience* **11**: 777.
- Joubert, A. and N. Foray (2007). "[Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]." *Cancer Radiother* **11**(3): 129-142.
- Kaiser, A., J. G. Eley, N. E. Onyeuku, S. R. Rice, C. C. Wright, N. E. McGovern, M. Sank, M. Zhu, Z. Vujaskovic, C. B. Simone, 2nd and A. Hussain (2019). "Proton Therapy Delivery and Its Clinical Application in Select Solid Tumor Malignancies." *J Vis Exp*(144).
- Kalamida, D., I. V. Karagounis, A. Giatromanolaki and M. I. Koukourakis (2014). "Important role of autophagy in endothelial cell response to ionizing radiation." *PLoS One* **9**(7): e102408.
- Kallman, R. F. and G. Silini (1964). "Recuperation from Lethal Injury by Whole-Body Irradiation. I. Kinetic Aspects and the Relationship with Conditioning Dose in C57bl Mice." *Radiat Res* **22**: 622-642.

- Kaminski, M. S., M. Tuck, J. Estes, A. Kolstad, C. W. Ross, K. Zasadny, D. Regan, P. Kison, S. Fisher, S. Kroll and R. L. Wahl (2005). "¹³¹I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma." *N Engl J Med* **352**(5): 441-449.
- Kanai, T., Y. Furusawa, K. Fukutsu, H. Itsukaichi, K. Eguchi-Kasai and H. Ohara (1997). "Irradiation of mixed beam and design of spread-out Bragg peak for heavy-ion radiotherapy." *Radiat Res* **147**(1): 78-85.
- Kantara, C., S. M. Moya, C. W. Houchen, S. Umar, R. L. Ullrich, P. Singh and D. H. Carney (2015). "Novel regenerative peptide TP508 mitigates radiation-induced gastrointestinal damage by activating stem cells and preserving crypt integrity." *Lab Invest* **95**(11): 1222-1233.
- Karan, T., V. Moiseenko, B. Gill, R. Horwood, A. Kyle and A. I. Minchinton (2013). "Radiobiological effects of altering dose rate in filter-free photon beams." *Phys Med Biol* **58**(4): 1075-1082.
- Kato, T. A., R. Okayasu and J. S. Bedford (2008). "Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells." *Mutat Res* **639**(1-2): 108-112.
- Kavanagh, B. D., C. C. Pan, L. A. Dawson, S. K. Das, X. A. Li, R. K. Ten Haken and M. Miften (2010). "Radiation dose-volume effects in the stomach and small bowel." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**(3 Suppl): S101-107.
- Khodarev, N. N., I. A. Sokolova and A. T. Vaughan (1998). "Mechanisms of induction of apoptotic DNA fragmentation." *Int J Radiat Biol* **73**(5): 455-467.
- Kim, K. S., J. E. Kim, K. J. Choi, S. Bae and D. H. Kim (2014). "Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells." *Int J Radiat Biol* **90**(1): 71-80.
- Kim, M., S. H. Choi, Y. B. Jin, H. J. Lee, Y. H. Ji, J. Kim, Y. S. Lee and Y. J. Lee (2013). "The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition." *Int J Radiat Biol* **89**(5): 356-363.
- King, R. B., W. B. Hyland, A. J. Cole, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, K. M. Redmond, C. Trainer, K. M. Prise, C. K. McGarry and A. R. Hounsell (2013). "An in vitro study of the radiobiological effects of flattening filter free radiotherapy treatments." *Phys Med Biol* **58**(5): N83-94.
- Kirkpatrick, J. P., D. J. Brenner and C. G. Orton (2009). "Point/Counterpoint. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery." *Med Phys* **36**(8): 3381-3384.
- Kirkpatrick, J. P., J. J. Meyer and L. B. Marks (2008). "The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery." *Semin Radiat Oncol* **18**(4): 240-243.
- Kiyohara, H., Y. Ishizaki, Y. Suzuki, H. Katoh, N. Hamada, T. Ohno, T. Takahashi, Y. Kobayashi and T. Nakano (2011). "Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF-beta1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation." *J Radiat Res* **52**(3): 287-292.
- Kong, F. M., C. Pan, A. Eisbruch and R. K. Ten Haken (2007). "Physical models and simpler dosimetric descriptors of radiation late toxicity." *Semin Radiat Oncol* **17**(2): 108-120.
- Korpela, E. and S. K. Liu (2014). "Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage." *Radiat Oncol* **9**: 266.

- Koyama, S., E. Narita, N. Shinohara and J. Miyakoshi (2018). "Recovery kinetics of micronucleus formation by fractionated X-ray irradiation in various types of human cells." *J Radiat Res.*
- Kramer, K., N. Pandit-Taskar, J. L. Humm, P. B. Zanzonico, S. Haque, I. J. Dunkel, S. L. Wolden, M. Donzelli, D. A. Goldman, J. S. Lewis, S. K. Lyashchenko, Y. Khakoo, J. A. Carrasquillo, M. M. Souweidane, J. P. Greenfield, D. Lyden, K. D. De Braganca, S. W. Gilheeneey, S. M. Larson and N. V. Cheung (2018). "A phase II study of radioimmunotherapy with intraventricular (131) I-3F8 for medulloblastoma." *Pediatr Blood Cancer* **65**(1).
- Krishan, A. and R. M. Hamelik (2010). "Click-iT proliferation assay with improved DNA histograms." *Curr Protoc Cytom* **Chapter 7**: Unit7 36.
- Krishnan, E. C., L. Krishnan, B. Jewell, P. Bhatia and W. R. Jewell (1987). "Dose-dependent radiation effect on microvasculature and repair." *J Natl Cancer Inst* **79**(6): 1321-1325.
- Kubota, K., T. Hida, S. Ishikura, J. Mizusawa, M. Nishio, M. Kawahara, A. Yokoyama, F. Imamura, K. Takeda, S. Negoro, M. Harada, H. Okamoto, N. Yamamoto, T. Shinkai, H. Sakai, K. Matsui, K. Nakagawa, T. Shibata, N. Saijo and T. Tamura (2014). "Etoposide and cisplatin versus irinotecan and cisplatin in patients with limited-stage small-cell lung cancer treated with etoposide and cisplatin plus concurrent accelerated hyperfractionated thoracic radiotherapy (JCOG0202): a randomised phase 3 study." *Lancet Oncol* **15**(1): 106-113.
- Kulik, C., J. Mazurier and E. Lartigau (2002). "[Probabilities of controlling tumors and complications (TCP/NTCP) after radiotherapy: methodologic, physical, and biological aspects]." *Cancer Radiother* **6 Suppl 1**: 155s-165s.
- Lafargue, A., C. Degorre, I. Corre, M. C. Alves-Guerra, M. H. Gaugler, F. Vallette, C. Pecqueur and F. Paris (2017). "Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation." *Free Radic Biol Med* **108**: 750-759.
- Laisue, J. A., H. Blattmann and D. N. Slatkin (2012). "[Alban Kohler (1874-1947): Inventor of grid therapy]." *Z Med Phys* **22**(2): 90-99.
- Landberg, T., J. Chavaudra, J. Dobbs, J.-P. Gerard, G. Hanks, J.-C. Horiot, K.-A. Johansson, T. Möller, J. Purdy, N. Suntharalingam and H. Svensson (1999). Report 62: Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50). Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements, International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). **os32**: NP.
- Landberg, T., J. Chavaudra, J. Dobbs, G. Hanks, K.-A. Johansson, T. Möller and J. Purdy (1993). Report 50: Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy. Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements, International Commission on Radiation Units and Measurements. **os26**: NP.
- Langley, R. E., E. A. Bump, S. G. Quartuccio, D. Medeiros and S. J. Braunhut (1997). "Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells." *Br J Cancer* **75**(5): 666-672.
- Lasio, G., M. Guerrero, W. Goetz, F. Lima and J. E. Baulch (2014). "Effect of varying dose-per-pulse and average dose rate in X-ray beam irradiation on cultured cell survival." *Radiat Environ Biophys* **53**(4): 671-676.
- Lavigne, J., F. Soysouvanh, V. Buard, G. Tarlet, O. Guipaud, V. Paget, F. Milliat and A. Francois (2017). "Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Deletion in the Endothelial Compartment Has No Beneficial Effect on Radiation-Induced Whole-Lung Damage in Mice." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **99**(4): 972-982.

- Lavigne, J., A. Suissa, N. Verger, M. Dos Santos, M. Benadjaoud, L. Mille-Hamard, I. Momken, F. Soysouvanh, V. Buard, O. Guipaud, V. Paget, G. Tarlet, F. Milliat and A. Francois (2019). "Lung Stereotactic Arc Therapy in Mice: Development of Radiation Pneumopathy and Influence of HIF-1alpha Endothelial Deletion." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **104**(2): 279-290.
- Lebrun, F., A. Francois, M. Vergnet, L. Lebaron-Jacobs, P. Gourmelon and N. M. Griffiths (1998). "Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function." *Am J Physiol* **275**(6): G1333-1340.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." *Aging Cell* **5**(2): 187-195.
- Lefkopoulos, D., L. Vieilleigne, P. Grandjean, F. Berrez and C. Dejean (1999). "[Inverse planning in intensity modulated radiation therapy]" *Cancer Radiother*: 160-170.
- Lehnert, B. E., L. A. Dethloff, J. N. Finkelstein and A. J. van der Kogel (1991). "Temporal sequence of early alterations in rat lung following thoracic X-irradiation." *Int J Radiat Biol* **60**(4): 657-675.
- Lenti, M. V. and A. Di Sabatino (2019). "Intestinal fibrosis." *Mol Aspects Med* **65**: 100-109.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* **132**(1): 27-42.
- Li, M., L. You, J. Xue and Y. Lu (2018). "Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review." *Front Pharmacol* **9**: 522.
- Liauw, S. L., P. P. Connell and R. R. Weichselbaum (2013). "New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology." *Sci Transl Med* **5**(173): 173sr172.
- Lin, Y. W., K. H. Lin, H. W. Ho, H. M. Lin, L. C. Lin, S. P. Lee and C. S. Chui (2014). "Treatment plan comparison between stereotactic body radiation therapy techniques for prostate cancer: non-isocentric CyberKnife versus isocentric RapidArc." *Phys Med* **30**(6): 654-661.
- Liu, Y., C. Sun, L. Gan, L. Zhang, A. Mao, Y. Du, R. Zhou and H. Zhang (2014). "Carbon ion radiation inhibits glioma and endothelial cell migration induced by secreted VEGF." *PLoS One* **9**(6): e98448.
- Lohse, I., S. Lang, J. Hrbacek, S. Scheidegger, S. Bodis, N. S. Macedo, J. Feng, U. M. Lutolf and K. Zaugg (2011). "Effect of high dose per pulse flattening filter-free beams on cancer cell survival." *Radiother Oncol* **101**(1): 226-232.
- Lomax, A. J. (2008). "Intensity modulated proton therapy and its sensitivity to treatment uncertainties 1: the potential effects of calculational uncertainties." *Phys Med Biol* **53**(4): 1027-1042.
- Luhr, A., C. von Neubeck, M. Krause and E. G. C. Troost (2018). "Relative biological effectiveness in proton beam therapy - Current knowledge and future challenges." *Clin Transl Radiat Oncol* **9**: 35-41.
- Lyman, J. T. (1985). "Complication probability as assessed from dose-volume histograms." *Radiat Res Suppl* **8**: S13-19.
- Maeda, S. (1982). "Pathology of experimental radiation pancarditis. II. Correlation between ultrastructural changes of the myocardial mitochondria and succinic dehydrogenase activity in rabbit heart receiving a single dose of X-ray irradiation." *Acta Pathol Jpn* **32**(2): 199-218.

- Maj, J. G., F. Paris, A. Haimovitz-Friedman, E. Venkatraman, R. Kolesnick and Z. Fuks (2003). "Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation." *Cancer Res* **63**(15): 4338-4341.
- Makita, C., T. Nakamura, A. Takada, K. Takayama, M. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. Azami, T. Kato, I. Tsukiyama, Y. Kikuchi, M. Hareyama, M. Murakami, N. Fuwa, M. Hata and T. Inoue (2014). "Clinical outcomes and toxicity of proton beam therapy for advanced cholangiocarcinoma." *Radiat Oncol* **9**: 26.
- Manichanh, C., E. Varela, C. Martinez, M. Antolin, M. Llopis, J. Dore, J. Giral, F. Guarner and J. R. Malagelada (2008). "The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute postradiotherapy diarrhea." *Am J Gastroenterol* **103**(7): 1754-1761.
- Mannheim, J. G., T. Schlichthaerle, L. Kuebler, L. Quintanilla-Martinez, U. Kohlhof, M. Kneilling and B. J. Pichler (2016). "Comparison of small animal CT contrast agents." *Contrast Media Mol Imaging* **11**(4): 272-284.
- Mavroidis, P., G. A. Plataniotis, M. A. Gorka and B. K. Lind (2006). "Comments on 'Reconsidering the definition of a dose-volume histogram'--dose-mass histogram (DMH) versus dose-volume histogram (DVH) for predicting radiation-induced pneumonitis." *Phys Med Biol* **51**(24): L43-50.
- McNamara, A. L., J. Schuemann and H. Paganetti (2015). "A phenomenological relative biological effectiveness (RBE) model for proton therapy based on all published in vitro cell survival data." *Phys Med Biol* **60**(21): 8399-8416.
- Menager, J., J. B. Gorin, N. Fichou, S. Gouard, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, F. Davodeau, F. Kraeber-Bodere, M. Cherel, J. Gaschet and Y. Guilloux (2016). "[Alpha-Radioimmunotherapy: principle and relevance in anti-tumor immunity]." *Med Sci (Paris)* **32**(4): 362-369.
- Metcalf, C., N. M. Kljavin, R. Ybarra and F. J. de Sauvage (2014). "Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration." *Cell Stem Cell* **14**(2): 149-159.
- Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." *J Cell Physiol* **196**(3): 430-443.
- Milliat, F., A. Francois, M. Isoir, E. Deutsch, R. Tamarat, G. Tarlet, A. Atfi, P. Validire, J. Bourhis, J. C. Sabourin and M. Benderitter (2006). "Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages." *Am J Pathol* **169**(4): 1484-1495.
- Milliat, F., A. Francois, R. Tamarat and M. Benderitter (2008). "[Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]." *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* **57**(3): 139-148.
- Milliat, F., J. C. Sabourin, G. Tarlet, V. Holler, E. Deutsch, V. Buard, R. Tamarat, A. Atfi, M. Benderitter and A. Francois (2008). "Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy." *Am J Pathol* **172**(3): 691-701.
- Mintet, E., J. Lavigne, V. Paget, G. Tarlet, V. Buard, O. Guipaud, J. C. Sabourin, M. L. Iruela-Arispe, F. Milliat and A. Francois (2017). "Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice." *Sci Rep* **7**(1): 4933.
- Mintet, E., E. Rannou, V. Buard, G. West, O. Guipaud, G. Tarlet, J. C. Sabourin, M. Benderitter, C. Fiocchi, F. Milliat and A. Francois (2015). "Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis." *Am J Pathol* **185**(9): 2550-2562.

- Mohan, R. and D. Grosshans (2017). "Proton therapy - Present and future." *Adv Drug Deliv Rev* **109**: 26-44.
- Mohan, R., C. R. Peeler, F. Guan, L. Bronk, W. Cao and D. R. Grosshans (2017). "Radiobiological issues in proton therapy." *Acta Oncol* **56**(11): 1367-1373.
- Mohiuddin, M., D. L. Curtis, W. T. Grizos and L. Komarnicky (1990). "Palliative treatment of advanced cancer using multiple nonconfluent pencil beam radiation. A pilot study." *Cancer* **66**(1): 114-118.
- Mohiuddin, M., M. Fujita, W. F. Regine, A. S. Megooni, G. S. Ibbott and M. M. Ahmed (1999). "High-dose spatially-fractionated radiation (GRID): a new paradigm in the management of advanced cancers." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**(3): 721-727.
- Molla, M. and J. Panes (2007). "Radiation-induced intestinal inflammation." *World J Gastroenterol* **13**(22): 3043-3046.
- Munshi, A., M. Hobbs and R. E. Meyn (2005). "Clonogenic cell survival assay." *Methods Mol Med* **110**: 21-28.
- Navarro-Teulon, I., C. Lozza, A. Pelegrin, E. Vives and J. P. Pouget (2013). "General overview of radioimmunotherapy of solid tumors." *Immunotherapy* **5**(5): 467-487.
- Negrone, A., S. Cucchiara and L. Stronati (2015). "Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis." *Mediators Inflamm* **2015**: 250762.
- Neuner, G., M. M. Mohiuddin, N. Vander Walde, O. Goloubeva, J. Ha, C. X. Yu and W. F. Regine (2012). "High-dose spatially fractionated GRID radiation therapy (SFGRT): a comparison of treatment outcomes with Cerrobend vs. MLC SFGRT." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **82**(5): 1642-1649.
- Nioutsikou, E., S. Webb, N. Panakis, T. Bortfeld and U. Oelfke (2005). "Reconsidering the definition of a dose-volume histogram." *Phys Med Biol* **50**(11): L17-19.
- Nunamaker, E. A., J. E. Artwohl, R. J. Anderson and J. D. Fortman (2013). "Endpoint refinement for total body irradiation of C57BL/6 mice." *Comp Med* **63**(1): 22-28.
- Ogura, A., S. Oowada, Y. Kon, A. Hirayama, H. Yasui, S. Meike, S. Kobayashi, M. Kuwabara and O. Inanami (2009). "Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells." *Cancer Lett* **277**(1): 64-71.
- Oh, C. W., E. A. Bump, J. S. Kim, D. Janigro and M. R. Mayberg (2001). "Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation." *Radiat Res* **156**(3): 232-240.
- Oktaria, S., M. L. F. Lerch, A. B. Rosenfeld, M. Tehei and S. Corde (2017). "In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses." *Appl Radiat Isot* **128**: 114-119.
- Olive, P. L. and R. E. Durand (1997). "Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro?" *Int J Radiat Biol* **71**(6): 695-707.
- Olszewska-Pazdrak, B., S. D. McVicar, K. Rayavara, S. M. Moya, C. Kantara, C. Gammarano, P. Olszewska, G. M. Fuller, L. E. Sower and D. H. Carney (2016). "Nuclear Countermeasure Activity of TP508 Linked to Restoration of Endothelial Function and Acceleration of DNA Repair." *Radiat Res* **186**(2): 162-174.
- Owen, J. R., A. Ashton, J. M. Bliss, J. Homewood, C. Harper, J. Hanson, J. Haviland, S. M. Bentzen and J. R. Yarnold (2006). "Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients

- with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial." *Lancet Oncol* **7**(6): 467-471.
- Paganetti, H. (2014). "Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer." *Phys Med Biol* **59**(22): R419-472.
- Paganetti, H. (2015). "Relating proton treatments to photon treatments via the relative biological effectiveness-should we revise current clinical practice?" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **91**(5): 892-894.
- Paget, V., M. Ben Kacem, M. Dos Santos, M. A. Benadjaoud, F. Soysouvanh, V. Buard, T. Georges, A. Vaurijoux, G. Gruel, A. Francois, O. Guipaud and F. Milliat (2019). "Multiparametric radiobiological assays show that variation of X-ray energy strongly impacts relative biological effectiveness: comparison between 220 kV and 4 MV." *Sci Rep* **9**(1): 14328.
- Pan, J., D. Li, Y. Xu, J. Zhang, Y. Wang, M. Chen, S. Lin, L. Huang, E. J. Chung, D. E. Citrin, M. Hauer-Jensen, D. Zhou and A. Meng (2017). "Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **99**(2): 353-361.
- Panganiban, R. A., O. Mungunsukh and R. M. Day (2013). "X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells." *Int J Radiat Biol* **89**(8): 656-667.
- Paris, F., Z. Fuks, A. Kang, P. Capodiecici, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo and R. Kolesnick (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." *Science* **293**(5528): 293-297.
- Park, K. R., W. L. Monsky, C. G. Lee, C. H. Song, D. H. Kim, R. K. Jain and D. Fukumura (2016). "Mast Cells Contribute to Radiation-Induced Vascular Hyperpermeability." *Radiat Res* **185**(2): 182-189.
- Pawlik, T. M. and K. Keyomarsi (2004). "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**(4): 928-942.
- Petkau, A. (1987). "Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury." *Br J Cancer Suppl* **8**: 87-95.
- Peucelle, C., I. Martinez-Rovira and Y. Prezado (2015). "Spatial fractionation of the dose using neon and heavier ions: A Monte Carlo study." *Med Phys* **42**(10): 5928-5936.
- Pommier, P., Y. Hu, M. H. Baron, O. Chapet and J. Balosso (2010). "[Particle therapy: carbon ions]." *Bull Cancer* **97**(7): 819-829.
- Pomp, J., J. L. Wike, I. J. Ouwerkerk, C. Hoogstraten, J. Davelaar, P. I. Schrier, J. W. Leer, H. D. Thames and W. A. Brock (1996). "Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays." *Radiother Oncol* **40**(2): 121-125.
- Potten, C. S. (2004). "Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine." *Radiat Res* **161**(2): 123-136.
- Pouget, J. P., L. Santoro, L. Raymond, N. Chouin, M. Bardies, C. Bascoul-Mollevi, H. Huguet, D. Azria, P. O. Kotzki, M. Pelegrin, E. Vives and A. Pelegrin (2008). "Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by auger electrons." *Radiat Res* **170**(2): 192-200.

- Prasanna, A., M. M. Ahmed, M. Mohiuddin and C. N. Coleman (2014). "Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy." *J Thorac Dis* **6**(4): 287-302.
- Prezado, Y. and G. R. Fois (2013). "Proton-minibeam radiation therapy: a proof of concept." *Med Phys* **40**(3): 031712.
- Prise, K. M., G. Schettino, M. Folkard and K. D. Held (2005). "New insights on cell death from radiation exposure." *Lancet Oncol* **6**(7): 520-528.
- Puck, T. T. and P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." *J Exp Med* **103**(5): 653-666.
- Purdy, J. A. (2008). "Dose to normal tissues outside the radiation therapy patient's treated volume: a review of different radiation therapy techniques." *Health Phys* **95**(5): 666-676.
- Rafehi, H., C. Orlowski, G. T. Georgiadis, K. Ververis, A. El-Osta and T. C. Karagiannis (2011). "Clonogenic assay: adherent cells." *J Vis Exp*(49).
- Rannou, E., A. Francois, A. Toullec, O. Guipaud, V. Buard, G. Tarlet, E. Mintet, C. Jaillet, M. L. Iruela-Arispe, M. Benderitter, J. C. Sabourin and F. Milliat (2015). "In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury." *Sci Rep* **5**: 15738.
- Redon, C. E., J. S. Dickey, W. M. Bonner and O. A. Sedelnikova (2009). "gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin." *Adv Space Res* **43**(8): 1171-1178.
- Reisz, J. A., N. Bansal, J. Qian, W. Zhao and C. M. Furdui (2014). "Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection." *Antioxid Redox Signal* **21**(2): 260-292.
- Reyes, J., J. Y. Chen, J. Stewart-Ornstein, K. W. Karhohs, C. S. Mock and G. Lahav (2018). "Fluctuations in p53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest." *Mol Cell* **71**(4): 581-591 e585.
- Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, C. C. Sung and M. Hauer-Jensen (1997). "Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?" *Radiother Oncol* **44**(1): 65-71.
- Rieder, F., J. Brenmoehl, S. Leeb, J. Scholmerich and G. Rogler (2007). "Wound healing and fibrosis in intestinal disease." *Gut* **56**(1): 130-139.
- Rithidech, K. N., P. Reungpatthanaphong, L. Honikel, A. Rusek and S. R. Simon (2010). "Dose-rate effects of protons on in vivo activation of nuclear factor-kappa B and cytokines in mouse bone marrow cells." *Radiat Environ Biophys* **49**(3): 405-419.
- Roche, K. C., A. D. Gracz, X. F. Liu, V. Newton, H. Akiyama and S. T. Magness (2015). "SOX9 maintains reserve stem cells and preserves radioresistance in mouse small intestine." *Gastroenterology* **149**(6): 1553-1563 e1510.
- Rodriguez-Lafresse, C. and J. Balosso (2012). "[From the carbon track to therapeutic efficiency of hadrontherapy]." *Cancer Radiother* **16**(1): 16-24.
- Roth, N. M., M. R. Sontag and M. F. Kiani (1999). "Early effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue." *Radiat Res* **151**(3): 270-277.
- Rubio, C. A. and M. Jalnas (1996). "Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats." *Dig Dis Sci* **41**(2): 392-401.

- Rupam, G., O. Balaji, R. Sreen and P. Navin (2017). "Radiation therapy-induced subacute intestinal obstruction." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **10**(7): 7-8.
- Rwigema, J. C., D. Nguyen, D. E. Heron, A. M. Chen, P. Lee, P. C. Wang, J. A. Vargo, D. A. Low, M. S. Huq, S. Tenn, M. L. Steinberg, P. Kupelian and K. Sheng (2015). "4pi noncoplanar stereotactic body radiation therapy for head-and-neck cancer: potential to improve tumor control and late toxicity." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **91**(2): 401-409.
- Sadler, J. E. (1997). "Thrombomodulin structure and function." *Thromb Haemost* **78**(1): 392-395.
- Sairenji, T., K. L. Collins and D. V. Evans (2017). "An Update on Inflammatory Bowel Disease." *Prim Care* **44**(4): 673-692.
- Sandle, G. I. (1998). "Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal." *Gut* **43**(2): 294-299.
- Santana, P., L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks and R. Kolesnick (1996). "Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis." *Cell* **86**(2): 189-199.
- Sasaki, R., T. Soejima, A. Matsumoto, T. Maruta, K. Yamada, Y. Ota, T. Kawabe, H. Nishimura, E. Sakai, Y. Ejima and K. Sugimura (2001). "Clinical significance of serum pulmonary surfactant proteins a and d for the early detection of radiation pneumonitis." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**(2): 301-307.
- Schultke, E., J. Balosso, T. Breslin, G. Cavaletti, V. Djonov, F. Esteve, M. Grotzer, G. Hildebrandt, A. Valdman and J. Laissue (2017). "Microbeam radiation therapy - grid therapy and beyond: a clinical perspective." *Br J Radiol* **90**(1078): 20170073.
- SDX Spirometric Motion Management System.
- SFRO (2007). *Guide des procédures de radiothérapie externe.*
- Sharma, S. D. (2011). "Unflattened photon beams from the standard flattening filter free accelerators for radiotherapy: Advantages, limitations and challenges." *J Med Phys* **36**(3): 123-125.
- Shivshankar, P., C. Brampton, S. Miyasato, M. Kasper, V. J. Thannickal and C. J. Le Saux (2012). "Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(1): 28-36.
- Smith, L. G., R. C. Miller, M. Richards, D. J. Brenner and E. J. Hall (1999). "Investigation of hypersensitivity to fractionated low-dose radiation exposure." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**(1): 187-191.
- Smyth, G., P. M. Evans, J. C. Bamber and J. L. Bedford (2019). "Recent developments in non-coplanar radiotherapy." *Br J Radiol* **92**(1097): 20180908.
- Sofia Vala, I., L. R. Martins, N. Imaizumi, R. J. Nunes, J. Rino, F. Kuonen, L. M. Carvalho, C. Ruegg, I. M. Grillo, J. T. Barata, M. Mareel and S. C. Santos (2010). "Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis." *PLoS One* **5**(6): e11222.
- Sole, C. V., J. L. Lopez Guerra, R. Matute, J. Jaen, F. Puebla, E. Rivin, A. Sanchez-Reyes, C. Beltran, C. Bourcier, F. A. Calvo and H. Marsiglia (2013). "Stereotactic ablative radiotherapy delivered by image-guided helical tomotherapy for extracranial oligometastases." *Clin Transl Oncol* **15**(6): 484-491.
- Somogyi, Z. (2000). "Radiation response of cell organelles." *Micron* **31**(2): 165-181.

- Somosy, Z., T. Kubasova, G. S. Ecsedi and G. J. Koteles (1986). "Radiation-induced changes of negative charge on the cell surface of primary human fibroblasts." *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **49**(6): 969-978.
- Sorensen, B. S., A. Vestergaard, J. Overgaard and L. H. Praestegaard (2011). "Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator." *Radiother Oncol* **101**(1): 223-225.
- Soysouvanh, F., M. A. Benadjaoud, M. dos Santos, M. Mondini, J. Lavigne, A. Bertho, V. Buard, G. Tarlet, S. Adnot, E. Deutsch, O. Guipaud, V. Paget, A. Francois and F. Milliat "Stereotactic lung irradiation in mice promotes long-term senescence and lung injury." *Soumis dans IJROBP*.
- Spitz, D. R., E. I. Azzam, J. J. Li and D. Gius (2004). "Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology." *Cancer Metastasis Rev* **23**(3-4): 311-322.
- Steinberg, F., K. Quabeck, B. Rehn, R. Kraus, M. Mohnke, U. Costabel, E. Kreuzfelder, M. Molls, J. Bruch, U. W. Schaefer and et al. (1993). "Lung effects after total body irradiation of mice and bone marrow transplant patients: comparison of experimental and preliminary clinical data." *Recent Results Cancer Res* **130**: 133-143.
- Stewart, F. A., S. Heeneman, J. Te Poele, J. Kruse, N. S. Russell, M. Gijbels and M. Daemen (2006). "Ionizing radiation accelerates the development of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice and predisposes to an inflammatory plaque phenotype prone to hemorrhage." *Am J Pathol* **168**(2): 649-658.
- Stone, H. B., C. N. Coleman, M. S. Anscher and W. H. McBride (2003). "Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms." *Lancet Oncol* **4**(9): 529-536.
- Supiot, S., K. Clement-Colmou, F. Paris, I. Corre, S. Chiavassa and G. Delpon (2015). "[Which rules apply to hypofractionated radiotherapy?]." *Cancer Radiother* **19**(6-7): 421-425.
- Suzuki, M., Y. Kase, H. Yamaguchi, T. Kanai and K. Ando (2000). "Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**(1): 241-250.
- Tagkalidis, P. P. and J. J. Tjandra (2001). "Chronic radiation proctitis." *ANZ J Surg* **71**(4): 230-237.
- Taunk, N. K., B. G. Haffty, J. B. Kostis and S. Goyal (2015). "Radiation-induced heart disease: pathologic abnormalities and putative mechanisms." *Front Oncol* **5**: 39.
- Taylor, C. W. and A. M. Kirby (2015). "Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **27**(11): 621-629.
- Terashima, S., Y. Hosokawa, E. Tsuruga, Y. Mariya and T. Nakamura (2017). "Impact of time interval and dose rate on cell survival following low-dose fractionated exposures." *J Radiat Res* **58**(6): 782-790.
- Thames, H. D., Jr., R. Withers, K. A. Mason and B. O. Reid (1981). "Dose-survival characteristics of mouse jejunal crypt cells." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **7**(11): 1591-1597.
- Thariat, J., J. L. Habrand, P. Lesueur, A. Chaikh, E. Kammerer, D. Lecomte, A. Batalla, J. Balosso and T. Tessonier (2018). "[Why proton therapy? And how?]." *Bull Cancer* **105**(3): 315-326.
- Toledano, A., S. Beley, M. Bollet, H. Lamallem, M. Zerbib and M. Roupret (2012). "[Role of hypofractionated radiotherapy in the treatment of prostate cancer: a review]." *Prog Urol* **22**(12): 671-677.

- Toullec, A., V. Buard, E. Rannou, G. Tarlet, O. Guipaud, S. Robine, M. L. Iruela-Arispe, A. Francois and F. Milliat (2018). "HIF-1 α Deletion in the Endothelium, but Not in the Epithelium, Protects From Radiation-Induced Enteritis." *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **5**(1): 15-30.
- Trott, K. R., T. Herrmann and M. Kasper (2004). "Target cells in radiation pneumopathy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**(2): 463-469.
- Tucker, S. L., H. R. Withers, K. A. Mason and H. D. Thames, Jr. (1983). "A dose-surviving fraction curve for mouse colonic mucosa." *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**(3): 433-437.
- Turner, H. C., I. Shuryak, M. Taveras, A. Bertucci, J. R. Perrier, C. Chen, C. D. Elliston, G. W. Johnson, L. B. Smilenov, S. A. Amundson and D. J. Brenner (2015). "Effect of dose rate on residual gamma-H2AX levels and frequency of micronuclei in X-irradiated mouse lymphocytes." *Radiat Res* **183**(3): 315-324.
- Tyler Watkins, W., J. A. Moore, G. D. Hugo and J. V. Siebers (2017). "Dose to mass for evaluation and optimization of lung cancer radiation therapy." *Radiother Oncol* **125**(2): 344-350.
- Unicancer. (2017). "Un appareil de radiothérapie guidé par IRM, une première à l'ICM." from <http://www.unicancer.fr/actualites/actualites-centres/un-appareil-de-radiotherapie-guide-par-irm-une-premiere-licm>.
- Unicancer. (2019). "Le MRIdian[®], équipement révolutionnaire de radiothérapie avec IRM embarquée, unique en France a été mis en service à l'Institut Paoli-Calmettes." from <http://www.unicancer.fr/actualites/actualites-centres/mridian%C2%AE-equipement-revolutionnaire-radiotherapie-irm-embarquee-unique-en-france-ete-mis-en-servic>.
- UNSCEAR (2000). Sources and effects of ionizing radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. **II**: 1-117.
- UPMC (2016). Enseignement Intégré par Appareil : Appareil Respiratoire. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.
- Valentin, J. (2003). "Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (W_R): ICRP Publication 92: Appeoved by the Commission in January 2003." *Ann ICRP* **33**(4): 1-121.
- Varian (2007). Real-time Position Management™ System Varian Medical Systems.
- Venkatesulu, B. P., L. S. Mahadevan, M. L. Aliru, X. Yang, M. H. Bodd, P. K. Singh, S. W. Yusuf, J. I. Abe and S. Krishnan (2018). "Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms." *JACC Basic Transl Sci* **3**(4): 563-572.
- Verbakel, W. F., J. van den Berg, B. J. Slotman and P. Sminia (2013). "Comparable cell survival between high dose rate flattening filter free and conventional dose rate irradiation." *Acta Oncol* **52**(3): 652-657.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* **36**(3): 131-149.
- Viau, M., A. F. Perez, L. Bodgi, C. Devic, A. Granzotto, M. L. Ferlazzo, M. Bourguignon, A. Puisieux, T. Lacornerie, E. Lartigau, J. L. Lagrange and N. Foray (2016). "[Repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses]." *Cancer Radiother* **20**(3): 217-225.
- Vincenti, S., N. Brillante, V. Lanza, I. Bozzoni, C. Presutti, F. Chiani, M. P. Etna and R. Negri (2011). "HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs." *Radiat Res* **175**(5): 535-546.

- Vogin, G. (2011). "[Radiosensitivity, radiocurability and DNA repair]." *Cancer Radiother* **15**(4): 294-306.
- Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, C. Linard, C. Strup, A. Francois, J. C. Sabourin, P. Lasser, A. Lusinchi, E. Deutsch, T. Girinsky, J. Aigueperse, J. Bourhis and D. Mathe (2004). "Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization." *Radiat Res* **161**(3): 299-311.
- Vozenin, M. C., P. De Fornel, K. Petersson, V. Favaudon, M. Jaccard, J. F. Germond, B. Petit, M. Burki, G. Ferrand, D. Patin, H. Bouchaab, M. Ozsahin, F. Bochud, C. Bailat, P. Devauchelle and J. Bourhis (2019). "The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients." *Clin Cancer Res* **25**(1): 35-42.
- Walsh, D. (1897). "Deep Tissue Traumatism from Roentgen Ray Exposure." *Br Med J* **2**(1909): 272-273.
- Wambersie, A. (1999). "RBE, reference RBE and clinical RBE: applications of these concepts in hadron therapy." *Strahlenther Onkol* **175 Suppl 2**: 39-43.
- Wang, C. K. (2010). "The progress of radiobiological models in modern radiotherapy with emphasis on the uncertainty issue." *Mutat Res* **704**(1-3): 175-181.
- Wang, J. S., H. J. Wang and H. L. Qian (2018). "Biological effects of radiation on cancer cells." *Mil Med Res* **5**(1): 20.
- Wang, Y., M. Boerma and D. Zhou (2016). "Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases." *Radiat Res* **186**(2): 153-161.
- Wang, Y., A. R. Hand, Y. H. Wang, M. Mina, C. Gillies, T. Peng, R. E. Cone and J. O'Rourke (1998). "Functional and morphologic evidence of the presence of tissue-plasminogen activator in vascular nerves: implications for a neurologic control of vessel wall fibrinolysis and rigidity." *J Neurosci Res* **53**(4): 443-453.
- Ward, W., A. Molteni and C. Ts'ao (1997). "Endothelial- oriented strategies to spare normal tissues." *The radiation biology of the vascular endothelium*: 185-208
- Weyrather, W. K., S. Ritter, M. Scholz and G. Kraft (1999). "RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity." *Int J Radiat Biol* **75**(11): 1357-1364.
- Whelan, T. J., J. P. Pignol, M. N. Levine, J. A. Julian, R. MacKenzie, S. Parpia, W. Shelley, L. Grimard, J. Bowen, H. Lukka, F. Perera, A. Fyles, K. Schneider, S. Gulavita and C. Freeman (2010). "Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer." *N Engl J Med* **362**(6): 513-520.
- Willett, C. G., C. J. Ooi, A. L. Zietman, V. Menon, S. Goldberg, B. E. Sands and D. K. Podolsky (2000). "Acute and late toxicity of patients with inflammatory bowel disease undergoing irradiation for abdominal and pelvic neoplasms." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **46**(4): 995-998.
- Williams, J. P., S. L. Brown, G. E. Georges, M. Hauer-Jensen, R. P. Hill, A. K. Huser, D. G. Kirsch, T. J. Macvittie, K. A. Mason, M. M. Medhora, J. E. Moulder, P. Okunieff, M. F. Otterson, M. E. Robbins, J. B. Smathers and W. H. McBride (2010). "Animal models for medical countermeasures to radiation exposure." *Radiat Res* **173**(4): 557-578.
- Wutzler, S., T. Lehnert, H. Laurer, M. Lehnert, M. Becker, D. Henrich, T. Vogl and I. Marzi (2011). "Circulating levels of Clara cell protein 16 but not surfactant protein D identify and quantify lung damage in patients with multiple injuries." *J Trauma* **71**(2): E31-36.

- Yan, K. S., L. A. Chia, X. Li, A. Ootani, J. Su, J. Y. Lee, N. Su, Y. Luo, S. C. Heilshorn, M. R. Amieva, E. Sangiorgi, M. R. Capecchi and C. J. Kuo (2012). "The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(2): 466-471.
- Yang, J., C. Ding, X. Dai, T. Lv, T. Xie, T. Zhang, W. Gao, J. Gong, W. Zhu, N. Li and J. Li (2017). "Soluble Dietary Fiber Ameliorates Radiation-Induced Intestinal Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **41**(8): 1399-1410.
- Yorke, E. D. (2001). "Modeling the effects of inhomogeneous dose distributions in normal tissues." *Semin Radiat Oncol* **11**(3): 197-209.
- Young, B., J. S. Lowe, A. Stevens and J. W. Heath (2006). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather*.
- Yu, X., S. L. Harris and A. J. Levine (2006). "The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein." *Cancer Res* **66**(9): 4795-4801.
- Zaorsky, N. G., M. T. Studenski, A. P. Dicker, L. Gomella and R. B. Den (2013). "Stereotactic body radiation therapy for prostate cancer: is the technology ready to be the standard of care?" *Cancer Treat Rev* **39**(3): 212-218.
- Zhou, C., B. Jones, M. Moustafa, C. Schwager, J. Bauer, B. Yang, L. Cao, M. Jia, A. Mairani, M. Chen, L. Chen, J. Debus and A. Abdollahi (2017). "Quantitative assessment of radiation dose and fractionation effects on normal tissue by utilizing a novel lung fibrosis index model." *Radiat Oncol* **12**(1): 172.
- Zhou, X. and B. B. Moore (2017). "Lung Section Staining and Microscopy." *Bio Protoc* **7**(10).