



**HAL**  
open science

# Aspects moléculaires de la radiothérapie par faibles doses : cancer, maladie d'Alzheimer, inflammation

Eymeric Le Reun

► **To cite this version:**

Eymeric Le Reun. Aspects moléculaires de la radiothérapie par faibles doses : cancer, maladie d'Alzheimer, inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10137 . tel-04457273

**HAL Id: tel-04457273**

**<https://theses.hal.science/tel-04457273>**

Submitted on 14 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE de DOCTORAT**  
**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**École Doctorale N°205**  
**École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé**

**Discipline** : Radiobiologie

Soutenue publiquement le 08/09/2023, par :

**Eymeric LE REUN**

---

**Aspects moléculaires de la radiothérapie par faibles doses :  
cancer, maladie d'Alzheimer, inflammation**

---

Devant le jury composé de :

Pr Jérôme LAMARTINE  
Pr Florence HUGUET  
Dr Céline MIRJOLET  
Pr Pelagia TSOUTSOU  
Pr Jean BOURHIS  
Dr Nicolas FORAY

UCBL1, Lyon  
Hôpital Tenon, Paris  
CGFL, Dijon  
HUG, Genève  
CHUV, Lausanne  
Inserm U1296, Lyon

Président  
Rapporteuse  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Examineur  
Directeur de thèse

## **ASPECTS MOLÉCULAIRES DE LA RADIOTHÉRAPIE PAR FAIBLES DOSES : CANCER, MALADIE D'ALZHEIMER, INFLAMMATION**

### **RÉSUMÉ**

Aujourd'hui, la radiothérapie la plus courante est basée sur des doses de l'ordre de 2 Gy par séance, qui visent à détruire les cellules tumorales. La radiothérapie par faibles doses (ou LDRT pour *low-dose radiation therapy* ; < 1 Gy/séance) a quant à elle un effet tantôt destructeur en oncologie, tantôt protecteur pour certaines pathologies inflammatoires ou neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Si certaines hypothèses cellulaires ont été formulées, il n'existait cependant pas, à ce jour, d'interprétation moléculaire pour expliquer les différents modes d'action de la LDRT.

L'unité Inserm U1296 a développé un modèle moléculaire de réponse individuelle aux radiations basé sur le transit cyto-nucléaire de la protéine ATM : le modèle RIANS (pour *radiation-induced ATM nucleoshuttling*). Après irradiation, les dimères cytoplasmiques d'ATM se monomérisent et diffusent dans le noyau ; les monomères d'ATM reconnaissent alors les cassures double-brin de l'ADN et déclenchent leur réparation. Tout retard de RIANS peut entraîner radiosensibilité (mort cellulaire), radiosusceptibilité (cancer radio-induit) ou radiodégénérescence (vieillesse accélérée). Le modèle RIANS permet également de mieux comprendre des phénomènes spécifiques aux faibles doses tels que l'hormésis et l'hypersensibilité aux faibles doses (HRS).

Le but de cette thèse était donc de caractériser, via le rôle central de la protéine ATM, les mécanismes d'action de la radiothérapie par faibles doses pour trois grandes entités nosologiques : le cancer, la maladie d'Alzheimer, et les maladies inflammatoires :

- dans le cas du traitement du cancer, nous avons montré l'importance du phénomène HRS dans la radiothérapie hypo-fractionnée de type stéréotaxique. En effet, en dépit des modèles actuels basés sur la dose totale, il apparaît qu'une séance de radiothérapie stéréotaxique délivre des mini-faisceaux de faibles doses, éligibles au phénomène HRS. Ainsi, pour des tumeurs HRS, l'efficacité anti-tumorale de la radiothérapie stéréotaxique résiderait dans la supra-additivité de faibles doses, entraînant des effets équivalents à de très fortes doses.
- dans le cas de la maladie d'Alzheimer, nous avons mis en évidence une agglutination de la protéine ATM autour du noyau cellulaire, faisant de cette couronne périnucléaire d'ATM un marqueur de vieillissement accéléré. Une irradiation par faibles doses permettrait de monomériser les dimères d'ATM, conduisant à la fois à une désagrégation des couronnes périnucléaires et un rétablissement du RIANS, produisant alors un effet hormétique bénéfique propre à ralentir la progression de la maladie.
- dans le cas des maladies inflammatoires, des investigations encore en cours suggèrent que les faibles doses apporteraient des monomères d'ATM supplémentaires dans le cytoplasme, responsables d'une activation de certaines cytokines anti-inflammatoires et une inhibition de certaines cytokines pro-inflammatoires.

Ce travail a permis de : i) confirmer la validité du modèle RIANS ; ii) établir l'état de l'art de la radiothérapie par faibles doses en pratique clinique ; iii) guider le radiothérapeute dans le choix de la technique d'irradiation ; iv) proposer une nouvelle approche diagnostique et thérapeutique de la maladie d'Alzheimer ; et v) apporter des premiers éléments de réflexion sur le plan moléculaire concernant l'effet anti-inflammatoire de la radiothérapie par faibles doses.

### **MOTS CLEFS**

Faibles doses ; radiothérapie ; LDRT ; radiosensibilité ; cancer ; maladie d'Alzheimer ; inflammation ; HRS ; hormésis ; protéine ATM.

### **LABORATOIRE**

Inserm U1296, "Radiations : Défense, Santé, Environnement", Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.

**MOLECULAR ASPECTS OF LOW-DOSE RADIATION THERAPY IN  
CANCER, ALZHEIMER'S DISEASE, AND INFLAMMATION****ABSTRACT**

Today, the most common radiotherapy is based on doses of the order of 2 Gy per session, which aim to destroy tumor cells. Low-dose radiation therapy (LDRT ; < 1 Gy/session) has an effect that is sometimes destructive in oncology, sometimes protective for certain inflammatory or neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease. Although certain cellular hypotheses have been emitted, there has not yet been any molecular interpretation to explain the LDRT different modes of action.

U1296 Inserm unit has developed a molecular model of individual response to radiation based on the radiation-induced ATM nucleoshuttling (the RIANs model). After irradiation, cytoplasmic ATM dimers monomerize and diffuse into the nucleus; ATM monomers then recognize DNA double-strand breaks and trigger their repair. Any delay in the RIANs can lead to radiosensitivity (cell death), radiosusceptibility (radiation-induced cancer) or radiodegeneration (accelerated aging). The RIANs model also provides a better understanding of low-dose specific phenomena such as hormesis and low-dose hypersensitivity (HRS).

The aim of this thesis was therefore to characterize, using the central role of ATM protein, the mechanisms of action of low-dose radiotherapy for three major nosological entities: cancer, Alzheimer's disease, and inflammatory diseases:

- in the case of cancer treatment, we have shown the importance of the HRS phenomenon in hypo-fractionated radiotherapy of the stereotactic type. Indeed, despite current models based on the total dose, it appears that a session of stereotactic radiotherapy may deliver mini-beams of low doses, eligible for the HRS phenomenon. Thus, for HRS tumours, the anti-tumor efficacy of stereotactic radiotherapy would reside in the supra-additivity of low doses, and HRS phenomenon, leading to equivalent effects observed at very high doses.
- in the case of Alzheimer's disease, we have demonstrated an agglutination of the ATM protein around the cell nucleus, making this perinuclear crown of ATM a marker of accelerated aging. Irradiation at low doses would make it possible to monomerize the ATM dimers, leading to both disintegration of the perinuclear crowns and restoration of the RIANs, thus producing a beneficial hormetic effect able to slow the progression of the disease.
- in the case of inflammatory diseases, preliminary investigations (still in progress) showed that low doses would provide additional ATM monomers in the cytoplasm, responsible for activation of some anti-inflammatory cytokines, and inhibition of others pro-inflammatory cytokines.

These works: i) confirm the validity of the RIANs model at low doses; ii) establish the state of the art of low-dose radiotherapy in clinical practice; iii) guide the radiotherapist in choosing the most relevant irradiation technique; iv) propose a new diagnostic and therapeutic approach to Alzheimer's disease; and v) provide first elements of explanation about the molecular mechanisms of low-dose radiotherapy anti-inflammatory effect.

**KEY WORDS**

Low-dose; radiation therapy; LDRT; radiosensitivity; cancer; Alzheimer's disease; inflammation; HRS; hormesis; ATM protein.

**LABORATORY**

Inserm U1296 Unit, "Radiation: Defense, Health and Environment", Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.

# REMERCIEMENTS

J'adresse tous mes remerciements à **Nicolas Foray**, pour m'avoir enseigné l'univers passionnant de la Radiobiologie et avoir dirigé d'une main de maître l'ensemble de mes travaux de recherche, depuis mon stage de Master en 2018 jusqu'à son actuel prolongement doctoral. Pour m'avoir permis, cher Nicolas, d'avancer sereinement vers un horizon scientifique nécessairement hypothétique et ô combien exaltant. J'aurai eu l'immense privilège de côtoyer tour à tour le physicien, le biologiste, l'historien, le ferrovipathe, le maître-nageur, le stratège, le gastronome, le nobélisable, le grenadier et l'égyptologue que tu incarnes, jusqu'à Henri VIII en personne. Reçois ici le témoignage de toute mon amitié.

À madame la Professeure **Sylvie Ricard-Blum**, pour votre encadrement en tant que directrice de l'École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé de Lyon.

À madame la Professeure **Florence Huguet**, madame la Docteure **Céline Mirjolet**, et monsieur le Professeur **Jérôme Lamartine**, vous qui me faites l'honneur de composer mon jury de thèse.

À madame la Professeure **Pelagia Tsoutsou**, pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit et, plus largement, pour ton soutien dans mon parcours professionnel. Je te remercie également pour l'atmosphère conviviale que tu insuffles quotidiennement dans l'équipe de radio-oncologie des HUG, délestant chaque journée de travail de sa dimension de labeur. J'admire enfin, chère Paula, le processus démocratique par lequel ton service opère sa mue.

À monsieur le Professeur **Jean Bourhis**, pour m'avoir ouvert les portes de la Radiothérapie, et permis d'établir une collaboration scientifique entre votre service du CHUV et l'unité Inserm U1296. C'est pour moi un immense honneur de vous compter parmi les membres de mon jury.

À messieurs les Professeurs **Jacques Balosso** et **Vincent Favaudon**, pour avoir supervisé mes comités de suivi de thèse. Je vous remercie également pour les discussions constructives que nous avons eues au décours.

À tous mes amis et membres de l'**unité Inserm U1296** "Radiations : Défense, Santé, Environnement" de Lyon : Adeline Pètre, Anne-Catherine Jallas, Audrey Bouchet, Aurélien Canet, Clément Devic, Joëlle Al-Choboq, Juliette Restier-Verlet, Larry Bodgi, Laura El Nachef, Manon Britel et Mélanie Ferlazzo. Je remercie tout particulièrement Adeline Granzotto pour m'avoir promu batteur et pour ton implication dans les projets Eratosthène et Cyrano, ainsi que Laurène Sonzogni pour le projet Tag Maal. À Elise Berthel, pour m'avoir formé aux différentes techniques du laboratoire, pour ta rigueur scientifique et nos débats tempétueux dont je ressors grandi ! Nul doute que mon arrivée dans l'unité en 2018 fut déterminante dans l'évolution de mon parcours professionnel. C'est toujours avec autant de plaisir que je continue de travailler à vos côtés dans cette atmosphère irradiante et stratosphérique !

À tous ceux qui m'ont accompagné, soutenu et supervisé durant mes années de Master, en particulier : **Anne Pavy-Le Traon**, **Marie-Pierre Bareille** et **François Crampes** lors de mon stage de Master 1 à la clinique spatiale MEDES de Toulouse, ainsi qu'**Emmanuel Moyse**, pour m'avoir fait confiance dans mon projet de Master 2.

À toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler comme interne au **CHRU de Brest** : Armelle Gentric, Cyril Leven, Fabien Le Ny, Jean-Luc Carré, Maël Padelli, Marion Andro, Quentin Beauvillard, Sandrine Estivin, Tiphaine L'Hostis et Salma Nafaï ; à l'**Hôpital de Douarnenez** : Jean-François

Houël, Jean-Philippe Elkaïm, Sylvain Ropars et Virginie Jan ; au **CHUV de Lausanne** : Alexander Bennassi, David Viertl, Édouard Romano, Émilien Muggeo, Fernanda Herrera, Galaad Bernard, Judith Delage, Laura Lévy, Luis Schiappacasse, Mahmut Özsahin pour avoir notamment dirigé ma thèse de médecine, Marc Laurans, Nicolas Danthez, Rémy Kinj, Véronique Vallet et Wendy Jeanneret-Sozzi ; à l'**Hôpital de Sion** : Anis Hdiji, Christian Mihaila, Dagmar Dohr, Farah Ahmad, Giorgio Lamanna, Javier Pena, Kaouthar Khanfir, Orhan Özsoy et Souhir Chaabouni ; à l'**Institut Gustave Roussy** : Benjamin Nicaise, Cécile Le Péchoux, Cyrus Chargari, Eliot Nicolas, Éric Deutsch, Gabriella Dumitrescu, Jérôme Bendavid, Mario Terlizzi, Marjolaine Ung, Pierre Blanchard, Samir Achkar, Sophie Espenel et Yasmina Moukasse ; au **CHPG de Monaco** : Aurélie Ginot, Bastien Lavignon, Benjamin Serrano, Cécile Ortholan, Karen Bénézery, Margaux Padovani, Nicolas Garnier, Philippe Colin, Régis Amblard et Rémy Villeneuve ; aux **Hôpitaux Universitaires de Genève** : André Durham, David Lauffer, Filip Kaššák, Filipe Fernandes De Sousa, Luna Rohm, Max Gau, Melpomeni Kountouri, Mickael Bendahman et Sébastien Tran. Je remercie par ailleurs le Pr Damien Weber dont je me réjouis de rejoindre prochainement l'équipe de protonthérapie à l'**Institut Paul Scherrer**.

À mes anciens professeurs des écoles, en particulier Mme Leland, Mme Kergourlay, Mme Anne Jehanno, Mme Christelle Dano et Mr Gildas Cochenec.

À mes amis,

**ZeZ et Genny**, pour l'intransigeance et la longévité de notre amitié, vous êtes pour moi des sœurs.

**Pilou**, tu es un ami précieux à l'enthousiasme contagieux et la discrétion magistrale bref, l'allégorie de l'Intelligence ; lorsque *le vent se lève*, (...) *tenter de vivre* pourrait tenir dans une bannette de Philippins baignée de musique !

**François**, pour ton écoute attentionnée et ta ressource intarissable ; continuons de pousser toutes ces portes, – fussent-elles en porcelaine marron-fuchsia drapées de dentelle, – car la *légèreté de l'être* est avec toi des plus exquis ; ton regard (anisocorique) de radiologue quant à ce manuscrit est une fois de plus le bienvenu.

Ma très chère **Marion**, tu trouveras le jeu de cartes dans ta boîte en fer ; car *tout est là : c'est l'unique question*.

**Doop, Gaspard, Hyacinthe, Jerry, La Mot, La Race, Morgan et Paul**, pour tous ces moments de félicité à un âge fondateur de l'existence ; votre solide et indéfectible amitié m'honore.

**Claire Bzh et Claire D**, vous qui m'avez fait grandir par le passé, j'éprouve toujours autant de plaisir à être à vos côtés ; merci pour votre subtile complicité.

**Raphaëlle**, dont les raffinements de l'esprit, de la conversation et de la silhouette ne sauraient être appréhendés par toute la littérature du monde ; tu es une amie chère à mon cœur.

**Victor**, mon pote, mon gazier, jammer ensemble est à l'image de notre amitié : harmonieuse et sans effusion.

**Bougeant et ChaFist**, que ne déboucherions-nous le Mabilles dès le mardi ? tant il me tarde de chaque fois vous revoir ; la virtuosité de votre humour n'a d'égal que la beauté de votre couple.

**Illa**, mon *Aurore*, merci de déconstruire mes préjugés à la seule force de tes charmes ; puissions-nous jamais atteindre notre dernier chapitre.

Et toi **Julian**, mon ami "de classe exceptionnelle" et assurément le seul à me connaître de manière *hollyshit*. En attendant que sonne notre heure de gériatrie interventionnelle, tâchons d'oublier un peu que *la vie c'est ça, un bout de lumière qui finit dans la nuit*.

**Moritz**, pour tous nos Emparis by night ; je ne te ferai pas l'affront d'en écrire davantage. **Valer** et **Juliette**, à notre prochaine virée Ouzo Yacht Club. **Nasia**, ton syntagme résonne toujours en moi. **Roxane**, car je peux compter sur toi pour dormir dans la rue. **Yasmina**, **Sanaa**, et **Chloé**, pour vos virils sujets de conversations. **Caza**, **Bab**, **Marc**, **Solenn** et **Agathe**, pour nous avoir rejoints. **Étienne**, pour l'amour du bon goût et son cortège de bibelots. **Coins**, pour tous nos concerts. **Natalia**. **Charly**, **Khem**, **Lucky**, **Nounours**, **Pérette** et **Pitch**, pour votre esprit stonien. **Coco** et **Joe**, pour nos alpines souffrances. **Céline**. **Sarah**, **Mathilde** et **Thomas**. **Viviane**, puisqu'il est désormais établi qu'on peut vivre autant d'intrigues en si peu de temps. **Léa**, pour ce magnifique été à Dz. **Anne-Liche**, **Boc**, **Dam**, **la Douille**, **Gwen**, **Jacques**, **JB**, **Justine**, **Manon**, **Marion**, **Sandy**, **Vincent**, **Zabou**, **Oscar Alpha** et **Matthieu**, pour tous ces bons moments brestois. **Laure**. **Jean-Luc**, **Martine**, **Charlotte** et **Julien**, pour ces océans de *voyages qui forment la jeunesse*. **Claudia**. **Patrick** et **Jonas**, pour notre drôle de confinement "préoccupant mais non-alarmant". **David Tarapacki**, pour m'avoir lâché en avion. **Gaëtan Krouche**, pour m'avoir lâché d'un avion. **Christian Ghio**, pour m'avoir permis de voler de mes propres ailes. **Adriano Golemis**. **Pascale**, pour ton inspirante impertinence. The **Glimmer Twins**, for your inspiring impertinence. **Valentin** et **Jean-Marie**, pour ces temps mémorables. **Federica**, pour m'avoir fait découvrir les charmes et les dangers de Naples. **Esa Lee Run**, mon ultime refuge lors d'une période éprouvante de l'externat. **Jean-Marc Bontemps** et **Etienne Riebel**, vous les précepteurs d'Esa Lee Run. Les **Unveilers** et les **Structures**, pour la gloire embrassée et toutes ces foules brassées. **Christine** and the **McLellan family**, for our Whangamomona time. **Sue** and **Lynette**, for your madness in the kitchen. **Sofi**. **Éric Trottmann**, pour avoir aiguisé ma conscience sociale. **Pauline**, pour notre cirque de la Solitude et une déclaration sur l'honneur au commissariat. **Jean-Seb**, pour nos sempiternels podiums aux entraînements d'hiver, un Tourduf mémorable, et ta transat qui motiva la mienne. **Bertrand Pineau**, pour nos 2660 nm, 19 jours et 4 heures de *Résilience*...

Enfin et surtout, merci à ma famille. Papa et Maman, pour votre amour inconditionnel, votre soutien sans faille et vos encouragements tacites ; vous m'avez enseigné la valeur du travail et distillé la fièvre des voyages, - avec la mer comme terreau de notre clan. Je vous aime puissamment. **Stéphanie**, **Olivier** et **Margaux**, nous traversons la vie ensemble dans toute sa *magnifique désolation* et ses innombrables moments de grâce. Je ne puis concevoir mon bonheur sans être assuré du vôtre. À mes cousins, cousines, oncles et tantes, à **Marianne**, **Paul**, **Sixtine**, **Antoine**, **Hector** et **Thomas**. À **Papy**, **Mamie** et **Mémé** de Pont-l'Abbé, vos cœurs battent à jamais dans le mien.

**Mamie D**, mon modèle de générosité, de droiture et de courage, je te dédie ce travail. Il est des phares qui scintillent par-delà les ténèbres.

« Il est de toute première importance pour nous, radiothérapeutes, de connaître les dangers des rayons X, et les accidents qu'ils peuvent provoquer. Nous avons entre les mains un agent thérapeutique de premier ordre qui est loin d'avoir dit son dernier mot. Apprenons à nous en servir dans les limites permises et utiles. Publiions nous-mêmes nos succès, publiions nos échecs et nos accidents. Faisons-les connaître à tous nos collègues. En présence de certaines hostilités systématiques, c'est par notre franchise, par les progrès de nos méthodes que nous nous imposerons à nos adversaires, que nous rendrons service à l'humanité souffrante. »

**Fabien Arcelin**

*Arch Electr Med, 1911*

« Et pourtant il saute aux yeux que le hasard fut autrefois le plus grand de tous les inventeurs ou observateurs, l'inspirateur bienveillant de ces ancêtres inventifs, et que la plus insignifiante des inventions faite aujourd'hui réclame plus d'esprit, de discipline et d'imagination scientifique qu'il n'y en eut autrefois pendant des périodes entières. »

**Friedrich Nietzsche**

*Aurore, 1881*

« Don Pélage : Pour tant de travail et de souffrance, quelle sera la récompense que vous lui réservez ?  
Le Roi : Mon fils, ce sera la seule qu'il attende et qui soit digne de lui : l'ingratitude. »

**Paul Claudel**

*Le Soulier de Satin, 1929*

« Quand tu aimes il faut partir  
Ne larmoie pas en souriant  
Ne te niche pas entre deux seins  
Respire marche pars va-t'en »

**Blaise Cendrars**

*Feuilles de route, 1924*

« You never know what's gonna happen »

**Keith Richards**

*Live at Waldbühne, 2022*



# TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	2
Abstract .....	3
Remerciements .....	4
Épigraphes.....	7
Table des matières.....	8
Liste des abréviations.....	11
<b>I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>15</b>
I.1. LA RADIOTHÉRAPIE EN PRATIQUE CLINIQUE.....	15
I.1.1. Bases de la radiothérapie.....	15
I.1.1.1. <i>Prolégomènes</i> .....	15
I.1.1.2. <i>Fonctionnement d'un accélérateur linéaire (Linac) d'électrons</i> .....	17
I.1.1.3. <i>Techniques de radiothérapie externe</i> .....	20
I.1.2. Applications en oncologie.....	24
I.1.2.1. <i>Radiothérapie standard, hypofractionnée, et stéréotaxique</i> .....	24
I.1.2.2. <i>Radiothérapie par faibles doses par séance (<math>\leq 1</math> Gy/séance)</i> .....	27
I.1.3. Applications en neurologie .....	30
I.1.3.1. <i>Radiochirurgie non-oncologique</i> .....	30
I.1.3.2. <i>Radiothérapie de la maladie d'Alzheimer</i> .....	30
I.1.4. Effet anti-inflammatoire.....	33
I.2. BASES DE RADIOBIOLOGIE.....	39
I.2.1. Radiobiologie cellulaire .....	39
I.2.1.1. <i>Des dépôts d'énergie aux dommages de l'ADN</i> .....	39
I.2.1.2. <i>Reconnaissance et quantification des CDB</i> .....	49
I.2.1.3. <i>Réparation des CDB</i> .....	52
I.2.1.4. <i>Mort ou survie cellulaires</i> .....	58
I.2.2. Radiobiologie clinique : de la mort cellulaire à l'individu irradié.....	63
I.2.2.1. <i>La radiosensibilité individuelle</i> .....	63
I.2.2.2. <i>La radiosusceptibilité</i> .....	71
I.2.2.3. <i>La radiodégénérescence</i> .....	76
I.3. APPORT MOLÉCULAIRE DU LABORATOIRE INSERM U1296.....	80
I.3.1. Justification des choix de notre approche.....	80
I.3.1.1. <i>Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB</i> .....	80
I.3.1.2. <i>Choix des modèles cellulaires</i> .....	81
I.3.2. Genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM .....	82
I.3.2.1. <i>Pourquoi ATM ?</i> .....	82
I.3.2.2. <i>Les principes généraux du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM</i> .....	85
I.3.2.3. <i>Protéines cytoplasmiques et radiosensibilité</i> .....	87
I.3.2.4. <i>La notion de reconnaissance des CDB</i> .....	88
I.3.2.5. <i>La cellule : un dosimètre de haute précision</i> .....	90
I.3.2.6. <i>Importance des protéines X</i> .....	91
I.3.2.7. <i>Le modèle RIANs et le modèle LQ</i> .....	93
I.3.3. Le modèle RIANs et les effets des faibles doses.....	94

I.3.3.1. L'hyper-radiosensibilité aux faibles doses .....	94
I.3.3.2. L'hormésis et la réponse adaptative .....	98
<b>II. BUTS DE LA THÈSE .....</b>	<b>111</b>
<b>III. RÉSULTATS.....</b>	<b>115</b>
III.1. INTRODUCTION, ÉTAT DE L'ART, ET VALIDATION DES OUTILS.....	115
III.1.1. Article 1 – Choix de la protéine ATM comme biomarqueur radiobiologique .....	115
III.1.1.1. Contexte.....	115
III.1.1.2. Matériels & Méthodes .....	116
III.1.1.3. Résumé des résultats .....	116
III.1.1.4. Discussion & Conclusion .....	118
III.1.2. Revue A – Causes et conséquences d'un retard de RIANs.....	119
III.1.2.1. Contexte.....	119
III.1.2.2. Résumé des résultats .....	119
III.1.2.3. Discussion & Conclusion .....	122
III.1.3. Revue B – Modèle RIANs face à la répétition de faibles doses .....	123
III.1.3.1. Contexte.....	123
III.1.3.2. Résumé des résultats .....	123
III.1.3.3. Discussion & Conclusion .....	125
III.1.4. Revue C – Hypothèses mécanistiques de la radiothérapie par faibles doses .....	126
III.1.4.1. Contexte.....	126
III.1.4.2. Résumé des résultats .....	126
III.1.4.3. Discussion & Conclusion .....	129
III.2. LDRT ONCOLOGIQUE .....	130
III.2.1. Article 2 – Choix du CyberKnife® comme outil expérimental.....	130
III.2.1.1. Contexte.....	130
III.2.1.2. Matériels & Méthodes .....	131
III.2.1.3. Résumé des résultats .....	131
III.2.1.4. Discussion & Conclusion .....	133
III.2.2. Article 3 – Phénomène HRS en radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife®.....	134
III.2.2.1. Contexte.....	134
III.2.2.2. Matériels & Méthodes .....	134
III.2.2.3. Résumé des résultats .....	135
III.2.2.4. Discussion & Conclusion .....	138
III.3. DIAGNOSTIC PRÉCOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET PERSPECTIVES DE LDRT (Article 4)	139
III.3.1. Contexte .....	139
III.3.2. Matériels et Méthodes .....	139
III.3.3. Résumé des résultats.....	140
III.3.4. Discussion & Conclusion .....	144
III.4. LDRT ANTI-INFLAMMATOIRE (données préliminaires).....	146
III.4.1. Contexte .....	146
III.4.2. Rationnel scientifique.....	146
III.4.3. Hypothèses .....	148
III.4.4. Résultats préliminaires et ébauche d'un premier modèle .....	149
<b>IV. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>151</b>
IV.1. INTRODUCTION, ÉTAT DE L'ART, ET VALIDATION DES OUTILS .....	151

IV.2. LA LDRT ONCOLOGIQUE .....	151
IV.3. LA LDRT DANS LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES .....	157
<b>V. CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>161</b>
<b>VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>163</b>
<b>VII. ANNEXES .....</b>	<b>187</b>
- ARTICLE 1 : Choix de la protéine ATM comme biomarqueur radiobiologique .....	187
- REVUE A : Causes et conséquences d'un retard de RIANs .....	187
- REVUE B : Modèle RIANs face à la répétition de faibles doses .....	187
- REVUE C : Hypothèses mécanistiques de la radiothérapie par faibles doses .....	187
- ARTICLE 2 : Choix du CyberKnife® comme outil expérimental .....	187
- ARTICLE 3 : Phénomène HRS en radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife® .....	187
- ARTICLE 4 : Diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer et perspectives de LDRT .....	187
- Effet bystander et dommages de l'ADN calcium-dépendants .....	187
- Dommages de l'ADN et risque individuel de cancer du sein .....	187
- Curiethérapie PDR des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques de l'enfant .....	187
Serment du docteur .....	369

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

*Par soucis de simplification, les acronymes des protéines ne sont volontairement pas explicités dans cette liste.*

- 3D-CRT : *3-dimensional conformal radiotherapy* (cf. RC3D)
- ADL : *basic activities of daily living* (actes de la vie courante)
- ALARA : *as low as reasonably achievable* (aussi bas que raisonnablement possible)
- AT : ataxie-télangiectasie
- BER : *base excision repair* (réparation par excision de base)
- BT : *brachytherapy* (curiethérapie)
- C : carbone
- CDB : cassures double-brin de l'ADN (cf. DSB)
- CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse
- CIPR : Commission Internationale de Radioprotection
- CK : CyberKnife® (Accuray, USA)
- COPERNIC : COllection Pour la rEcherche sur la Radiosensibilité au NiveaU Clinique
- COVID-19 : maladie à coronavirus 2019
- CPNPC : cancer pulmonaire non à petites cellules
- CSB : cassures simple-brin de l'ADN (cf. SSB)
- CT : *computed tomography* (tomodensitométrie)
- CTCAE : *Common Terminology Criteria for Adverse Effects*
- CYRANO : *CYtokine RAdiation and NucleOshuttling* (transit cyto-nucléaire radio-induit de cytokine)
- DB : dommage de base de l'ADN
- DSB : DNA double strand break (cf. CDB)
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* (technique d'immuno-adsorption par enzyme liée)
- ERATOSTHENE : Effet des techniques émergentes de RAdioThérapie Oncologique Sur la THEorie du transit cyto-nucléaire de la protéiNE ATM
- FD : faible dose

- FDD : faible débit de dose
- FFF : *flattening filter free* (sans filtre égalisateur)
- FiO<sub>2</sub> : fraction d'oxygène inspiré
- G<sub>0</sub> : stade quiescent de non-division cellulaire
- G<sub>1</sub> : phase de croissance cellulaire et d'activités métaboliques normales
- G<sub>2</sub> : phase préparant la mitose
- GTV : *gross tumor volume* (volume tumoral macroscopique)
- Gy : Gray [J/kg<sup>-1</sup>]
- H : hydrogène
- HDC : *highly-damaged cell* (cellule hyper-lésée)
- HDRT : *high-dose radiation therapy* (radiothérapie par forte dose)
- HRS : *hypersensitivity to low dose* (hyper-radiosensibilité aux faibles doses)
- IF : immunofluorescence
- IGRT : *image-guided radiation therapy* (radiothérapie guidée par l'image)
- IMPT : *intensity modulated proton therapy* (protonthérapie avec modulation d'intensité)
- IMRT : *intensity modulated radiotherapy* (cf. RCMI)
- IRM : imagerie par résonance magnétique
- IRR : *induced radioresistance* (radiatorésistance induite)
- LD : *low dose* (faible dose)
- LDRT : *low-dose radiation therapy* (radiothérapie par faibles doses)
- LENT : *Late Effects in Normal Tissues*
- LINAC : *linear accelerator* (accélérateur linéaire [de particules])
- LMDS : *localized multiple damage sites* (dommages multiples hautement localisés)
- LNH : lymphome non-hodgkinien
- LNT : *Linear No-Threshold model* (modèle linéaire sans seuil)
- LQ : linéaire-quadratique
- M : phase de mitose
- MA : maladie d'Alzheimer
- MLC : collimateur multi-lames
- MLD : *mean lung dose* (dose moyenne aux poumons)
- MMSE : *Mini-Mental State Examination*

- MR : *mismatch repair* (réparation des mésappariements)
- N : azote
- NER : *nucleotide excision repair* (réparation par excision de nucléotide)
- NHEJ : *non-homologous end-joining* (réparation par suture)
- NLT : *Non-Linear Threshold model* (modèle non-linéaire avec seuil)
- O : oxygène
- OMS : Organisation mondiale de la santé (cf. WHO)
- OTAN : Organisation du Traité de l'Atlantique-Nord
- PDR : *pulsed dose rate* (bas débit pulsé)
- PLA : *proximity ligation assay* (test de ligation de proximité)
- PSPT : *passive scattering proton therapy* (protonthérapie à diffusion passive)
- PTV : *planning target volume* (volume cible prévisionnel)
- RA : réponse adaptative
- RC3D : radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (cf. 3D-CRT)
- RCMi : radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (cf. IMRT)
- RCT : radio-chimiothérapie
- RH : recombinaison homologue
- RI : radiations ionisantes
- RIANS : *radiation-induced ATM nucleoshuttling* (transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM)
- RILA : *radiation-induced lymphocyte apoptosis* (test d'apoptose lymphocytaire radio-induite)
- RT : radiothérapie
- RT2D : radiothérapie en deux dimensions
- RTE : radiothérapie externe
- RTOG : *Radiation Therapy Oncology Group*
- S : phase de la réplication de l'ADN
- SAFI : rapport  $\text{SatO}_2/\text{FiO}_2$ .
- SARS-CoV-2 : syndrome respiratoire aigu sévère à coronavirus 2
- SatO2 : saturation oxymétrique de pouls
- SBRT : *stereotactic body radiation therapy* (radiothérapie stéréotaxique)

- SF2 : fraction survivante à 2 Gy
- SFRO : Société Française de Radiothérapie Oncologique
- SIA : syndrome d'irradiation aiguë
- SIB : *severe impairment battery*
- SNP : polymorphismes nucléotidiques simples
- SRS : *stereotactic radio-surgery* (radiochirurgie)
- SSB : *DNA single strand-break* (cf. CSB)
- TAG MAAL : modèle du Transit d'ATM Généralisé à la MAldie d'ALzheimer
- TBI : *total body irradiation* (irradiation corporelle totale)
- TEL : transfert d'énergie linéique
- UV : ultra-violet
- V5 : volume recevant au moins 5 Gy
- V20 : volume recevant au moins 20 Gy
- VMAT : *volumetric modulated arc therapy* (modulation d'intensité volumétrique par arc-thérapie)
- WHO : World Health Organization (cf. OMS)
- ZOPRA : association zolédronate-pravastatine

# I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

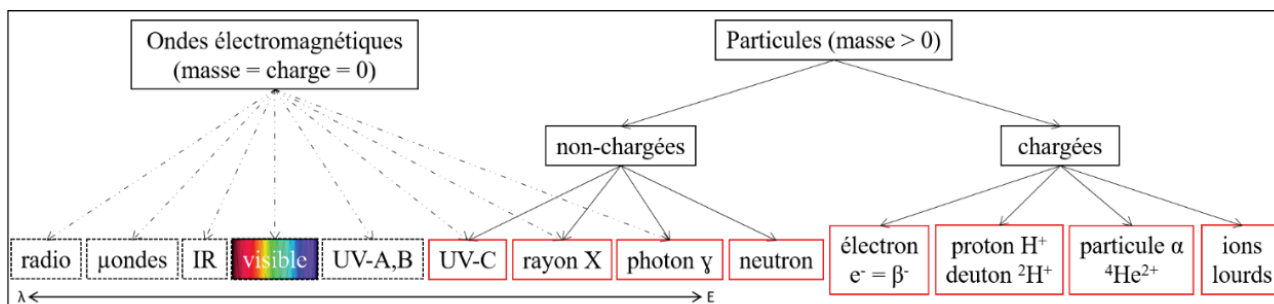
## I.1. LA RADIOTHÉRAPIE EN PRATIQUE CLINIQUE

### I.1.1. Bases de la radiothérapie

#### I.1.1.1. Prolégomènes

Suite à la découverte des rayons X par le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen en Novembre 1895 (1) puis celle de la radioactivité par le physicien français Henri Becquerel en Février 1896 (2, 3), les radiations ionisantes ont rapidement suscité l'intérêt de médecins pionniers. Parmi eux, Victor Despeignes, originaire de Lyon, diagnostiqua chez son voisin une tumeur gastrique alors qu'il exerçait comme médecin de canton aux Echelles. Inspiré par de récentes expériences d'irradiation de cobayes par "rayons de Röntgen" (4), Despeignes décida d'utiliser un tube de Crookes (tube à rayons X) sur l'abdomen de son patient, deux fois par jour, du 4 au 22 Juillet 1896. À neuf jours de traitement, le médecin « constate une amélioration sensible permettant quelque espoir là où il y en n'avait plus » (5). Un siècle plus tard, la radiothérapie s'est imposée comme un traitement incontournable non seulement en oncologie mais également pour diverses pathologies non malignes (6).

La radiothérapie utilise des radiations dites "ionisantes" (RI), dont l'énergie est suffisante ( $\geq 13.6$  eV) pour arracher au moins un électron à une molécule d'eau, - composant principal du corps humain (7). Les RI comprennent les particules chargées (électrons  $e^-$ , protons  $H^+$ , particules alpha  ${}^4He^{2+}$ , ions lourds tels que les ions Carbone), les particules non-chargées (neutrons), et certains rayonnements comme les photons X et les photons gamma. Notons que les ondes électromagnétiques de longueur d'onde plus élevée telles que les UV<sub>A</sub>, les UV<sub>B</sub>, la lumière visible, la lumière infrarouge, les micro-ondes et les ondes radio ont une énergie inférieure à 13.6 eV, et ne sont donc pas ionisantes (Fig. 1).



**Figure 1.** Rayonnements particuliers et ondulatoires. Les rayonnements ionisants sont encadrés en rouge.

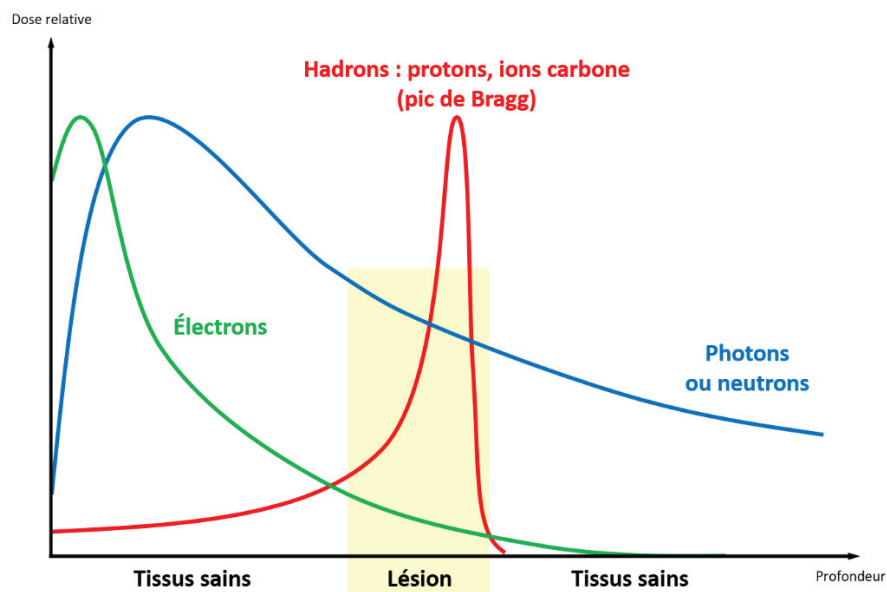


Les RI peuvent être d'origine soit naturelle : cosmique, radioactivité tellurique (Uranium, Radon), interne (eau et aliments ingérés), soit artificielle : industrie et accidents nucléaires, domaine médical (imagerie diagnostique, radiologie interventionnelle, radiothérapie). Les RI employées en radiothérapie (RT) proviennent de sources radioactives (e.g. Iridium 192), ou d'accélérateurs de particules (e.g. Linac, synchrotron, cyclotron), et sont délivrées depuis l'intérieur ou l'extérieur du patient. Les deux modalités de RT les plus fréquentes sont la radiothérapie externe à l'aide d'un accélérateur linéaire (Linac) de particules (8), et la curiethérapie qui consiste à introduire des sources radioactives à l'intérieur du patient (endocavitaire ou interstitielle) (9). Plus rarement, des sources radioactives peuvent être utilisées depuis l'extérieur du patient (plésio-curiethérapie, appareil Gamme-Knife). La radiothérapie interne vectorisée utilise quant à elle des radiopharmaceutiques administrés par voie intraveineuse ou *per os*.

En radiothérapie externe, le contexte clinique, la nature ou encore la profondeur de la cible déterminent le choix des RI utilisés. Dans la plupart des cas, les patients sont traités à l'aide de photons, dont la pénétrance dans la matière croît avec l'énergie ; les électrons sont quant à eux plutôt réservés pour des lésions superficielles (Fig. 2).

À ce jour, les hadrons (protons et ions carbone) sont les particules à haut transfert linéique d'énergie (TEL) les plus largement utilisées en radiothérapie. L'énergie perdue par les particules chargées est inversement proportionnelle au carré de leur vitesse, de sorte qu'à leur arrivée dans les tissus, les hadrons pénètrent si rapidement que peu d'ionisations sont produites. Puis, après une certaine distance parcourue, les particules perdent toute leur énergie et leur vitesse, produisant une forte densité d'ionisations appelée pic de Bragg. Après le pic de Bragg, l'énergie du faisceau chute drastiquement, n'entraînant quasiment aucune interaction avec la matière et épargnant les tissus situés au-delà de la cible (10) (Fig. 2).

L'effet biologique des RI est détaillé ci-après (cf. § 1.2). Brièvement : les RI endommagent l'ADN des cellules traversées par l'intermédiaire d'une radiolyse de l'eau entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), – famille des radicaux libres, – à fort pouvoir oxydant. En cas de mauvaise ou de non-réparation, les lésions de l'ADN peuvent conduire à la mort cellulaire radiobiologique (mort physique de la cellule ou arrêt du cycle cellulaire).

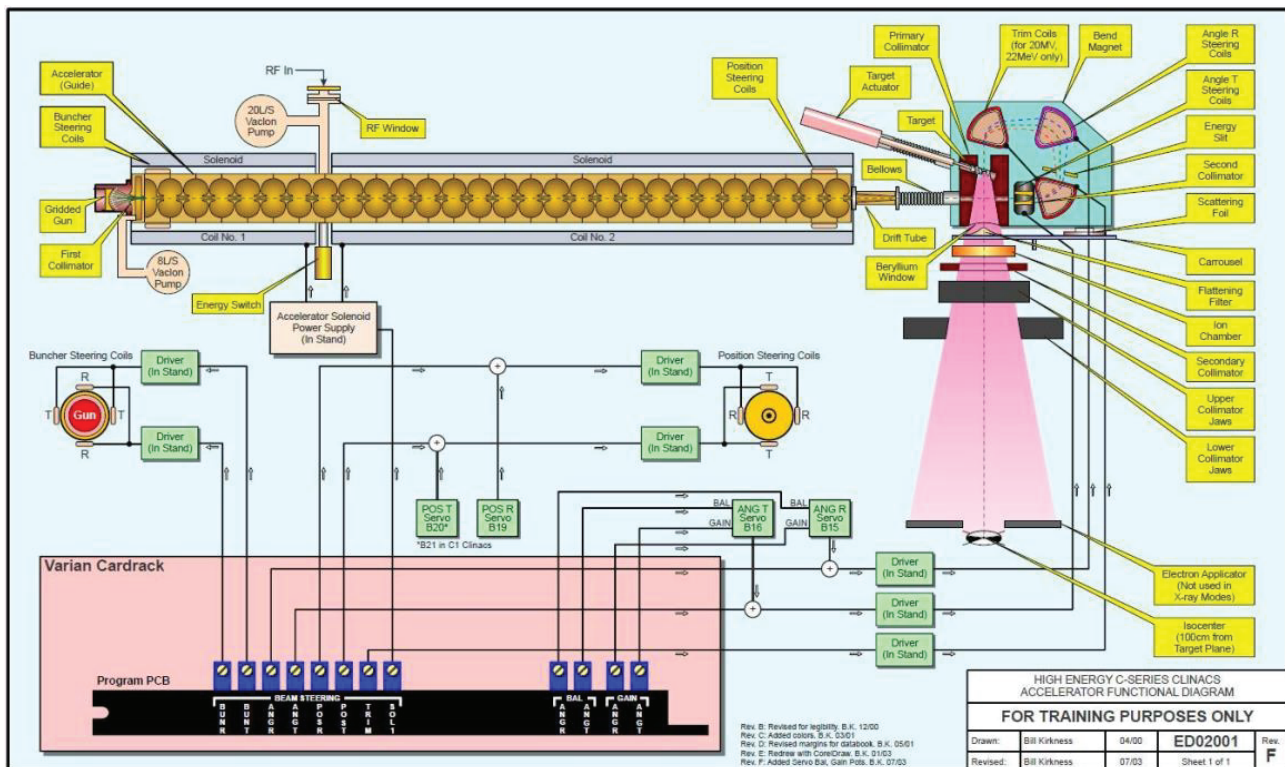


**Figure 2.** Courbes de rendement en profondeur des rayonnements ionisants. Le pic de Bragg correspond à un dépôt d'énergie maximal en fin de parcours.

### *1.1.1.2. Fonctionnement d'un accélérateur linéaire (Linac) d'électrons*

Comme évoqué précédemment, la radiothérapie est dans la grande majorité des cas délivrée par voie externe, à l'aide de machines de traitement.

Un accélérateur de particules est un appareil utilisant des particules chargées électriquement : électrons, protons, ou ions lourds. Soumises à un champ magnétique, ces particules sont accélérées selon une trajectoire qui peut être soit : linéaire dans un Linac (*linear accelerator*), circulaire dans un synchrotron, ou en spirale dans un cyclotron. Il en résulte un faisceau de particules ou de photons pouvant être orienté vers le patient. En radiothérapie, les machines les plus communément employées sont des accélérateurs linéaires d'électrons, générant un faisceau d'électrons ou de photons X, dont la structure est représentée par la Figure 3, et son fonctionnement décrit ci-après (11).

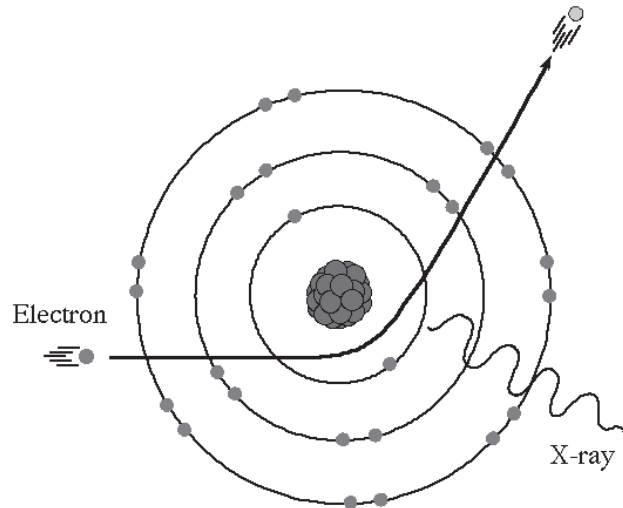


Un accélérateur linéaire (Linac) d'électrons dispose d'un canon à électrons (*electron gun*) au sein duquel des électrons sont émis par effet thermoïonique, après chauffage d'un filament en matériau conducteur. Les électrons sont ensuite injectés dans une succession de cavités vides (section accélératrice ou *accelerating waveguide*) en direction d'une anode, tout en étant soumis à un champ magnétique élevé produit par un klystron ou un magnétron. L'énergie potentielle du champ magnétique est transmise aux électrons sous forme d'énergie cinétique (accélération) selon la loi de Coulomb. Ainsi, l'intensité du champ magnétique appliquée aux électrons détermine l'énergie maximale du faisceau en sortie de Linac.

À la sortie de la section accélératrice, le faisceau d'électrons intègre la tête du Linac où un aimant le défecte à 270°, en direction du patient. Un collimateur primaire définit ensuite la taille maximale du faisceau en fonction de la zone cible.

Le Linac s'utilise en mode "électrons" ou en mode "photons". Une lésion superficielle pourra être traitée grâce au faisceau d'électrons. En cas de lésion plus profonde, nécessitant une plus grande pénétrance des RI dans la matière, on privilégiera un faisceau de photons. Pour obtenir un faisceau de photons, le faisceau d'électrons frappe d'abord une cible

(classiquement en tungstène et placée sur une plaque escamotable), entraînant un rayonnement de freinage "*Bremsstrahlung*" à l'origine de photons X (Fig. 4).



**Figure 4.** Production de photons X par rayonnement de freinage "*Bremsstrahlung*" (13).

Le faisceau ainsi généré par l'impact des électrons contient des photons d'énergie variable ( $\leq E_{\text{électrons incidents}}$ ). Cette hétérogénéité du faisceau est corrigée grâce à un filtre égalisateur (*flattening filter*) ; à une énergie de photons souhaitée correspond un filtre précis (classiquement : 6 MV). Un faisceau de photons non filtré est dit "FFF" pour *flattening filter free* (classiquement : maximum 10 FFF). À noter qu'un faisceau d'électrons est quant à lui déjà suffisamment homogène, sans qu'il ne requière d'être homogénéisé par quelconque filtre.

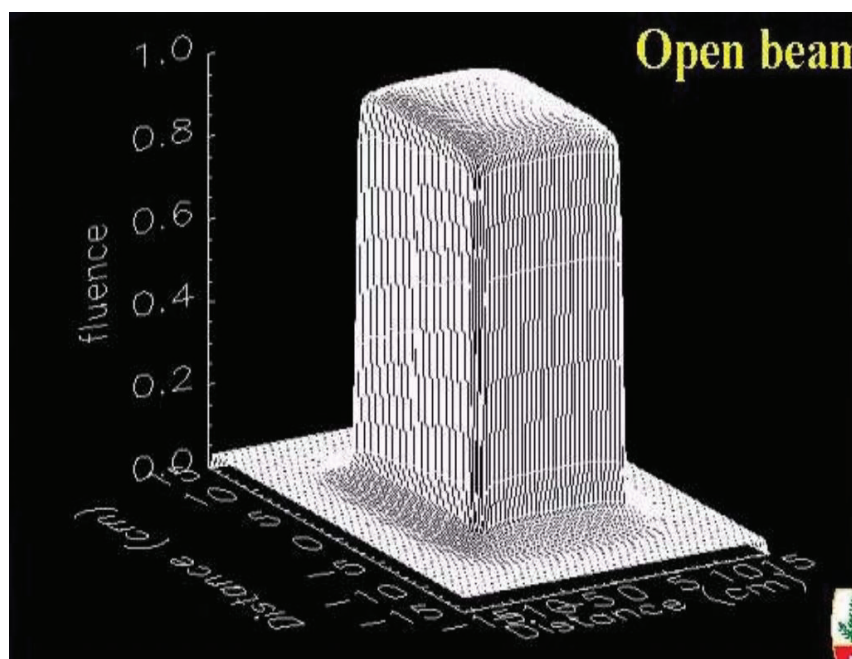
Le faisceau d'électrons/photons poursuit sa course dans la tête du Linac, traversant successivement des chambres d'ionisation contrôlant l'intensité et l'homogénéité du faisceau, puis un collimateur secondaire qui ressert le faisceau sur la région à traiter. Un ensemble de lames (mâchoires supérieure et inférieure, collimateur multilames MLC) permet ensuite de conformer au maximum le faisceau au plus près de la forme de la cible.

Enfin, si le Linac est utilisé en mode électrons, le faisceau de particules traverse un applicateur, placé à proximité immédiate du patient, qui canalise le champ d'électrons dans les limites de la zone cible.

### *1.1.1.3. Techniques de radiothérapie externe*

#### *Radiothérapie en 2 dimensions (RT2D)*

Au fil des décennies, la radiothérapie a bénéficié de nombreuses avancées techniques et technologiques (14). Jusqu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, les champs d'irradiation étaient orientés vers la tumeur sur la base de repères cliniques voire radiographiques (en deux dimensions). Les faisceaux étaient conformés de manière rudimentaire à l'aide de caches fixes, – en matériau à numéro atomique élevé, souvent en plomb, – placés entre la source de rayonnement et le patient. Malgré des résultats encourageants, cette radiothérapie dite RT2D présentait cependant plusieurs limites : i) irradiation de volumes identiques chez des patients aux tumeurs de tailles et de formes variables, ii) dose homogène sur des tissus de densités hétérogènes, iii) méconnaissance de la dose reçue par les organes à risque, iv) limitée à 2 ou 4 faisceaux (14).

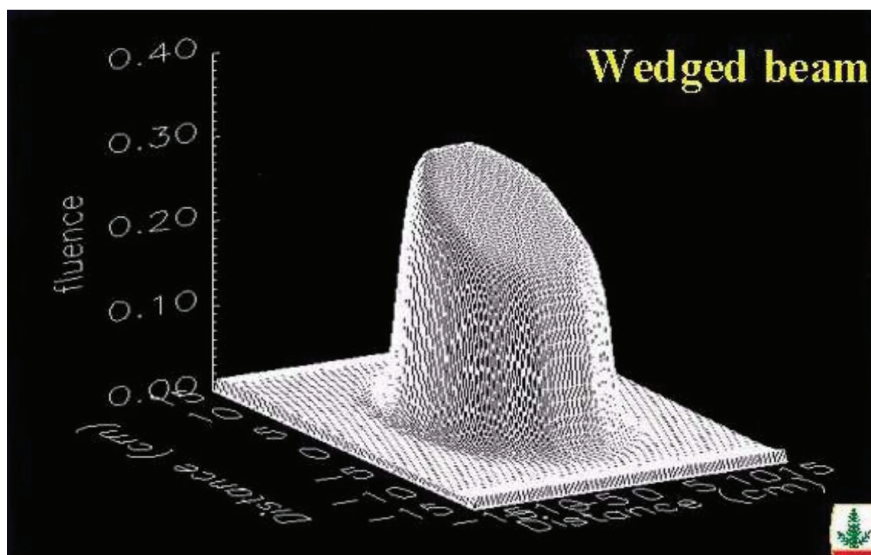


**Figure 5.** Distribution de dose d'un faisceau de radiothérapie en deux dimensions (RT2D) (15).

#### *Radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (RC3D)*

En 1972, l'ingénieur britannique Godfrey Hounsfield met au point le premier scanner médical (*CT-scan*), offrant à la fois la possibilité de déterminer précisément la forme de la tumeur en trois dimensions, et de calculer la densité des tissus traversés par les rayons. Concomitamment, d'autres avancées techniques telles que le MLC et les filtres placés dans la tête de l'irradiateur (cf. § 1.1.1.2) ont permis de conformer efficacement la géométrie du

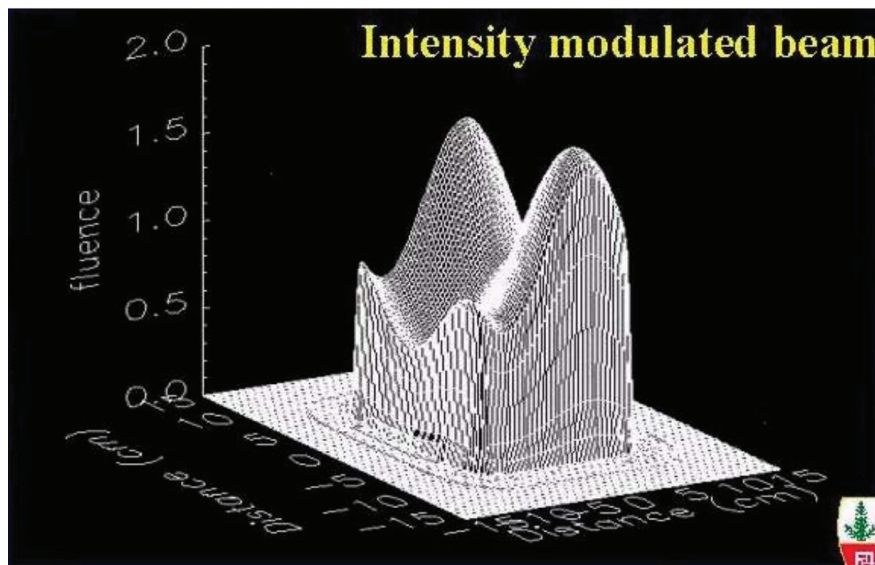
faisceau à la forme de la tumeur. Désormais, grâce à la radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (RC3D), les organes à risque se trouvent davantage épargnés qu'en RT2D (16), autorisant ainsi l'augmentation de la dose délivrée à la tumeur (17).



**Figure 6.** Distribution de dose d'un faisceau de radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (RC3D) avec filtre en coin (15).

#### *Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT)*

Si la conformation géométrique du faisceau représenta une avancée majeure en radiothérapie, la révolution informatique des années 1990 améliora à son tour efficacité et sécurité des traitements. En effet, les ordinateurs de dosimétrie (ou *TPS* pour *treatment planning system*) déterminent désormais la balistique des faisceaux à partir de contraintes imposées par le radiothérapeute (couverture minimale de la cible, doses moyennes et maximales aux organes à risques). Il s'agit ainsi d'une planification dite "inverse", en opposition à une planification directe où la dosimétrie ne pouvait qu'être constatée après simulation manuelle des faisceaux. De plus, le pilotage dynamique du MLC permet de faire varier la forme du faisceau au cours de l'irradiation. Cette technique de radiothérapie, dite conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI ou IMRT pour *intensity-modulated radiation therapy*), a permis, – par rapport à la RC3D, – de réduire considérablement les effets secondaires radio-induits sans transiger sur le contrôle local de la maladie et la survie globale des patients (18, 19).

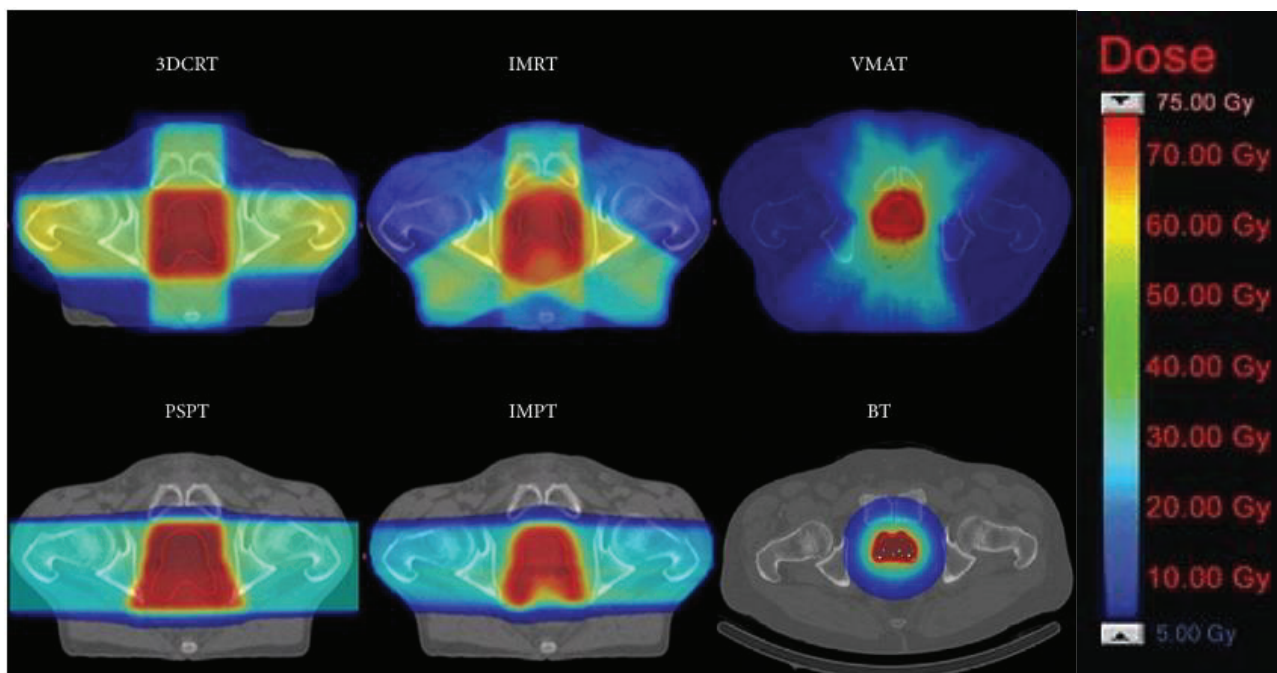


**Figure 7.** Distribution de dose d'un faisceau de radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT) (15).

Enfin, l'IMRT peut être délivrée de manière statique ou dynamique.

L'IMRT statique délivre la dose de manière discontinue en plusieurs faisceaux ; chaque faisceau a une intensité soit constante ("step and shoot"), soit modulée ("sliding window") au cours de l'irradiation.

En IMRT dynamique, la dose est délivrée de manière continue en un faisceau rotatif : soit selon un arc plan (VMAT pour *volumetric modulated arc therapy*), soit hélicoïdal avec translation concomitante de la table de traitement (TomoTherapy<sup>®</sup>) (20). Contrairement en arc-thérapie, la rotation en Tomothérapie n'est pas réglementairement limitée, permettant des traitements plus rapides.



**Figure 8.** Distribution de dose selon la technique de radiothérapie (21). 3D-CRT = 3-dimensional conformal radiotherapy (radiothérapie conformationnelle en trois dimensions); IMRT = intensity modulated radiotherapy (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité); VMAT = volumetric modulated arc therapy (modulation d'intensité volumétrique par arc-thérapie); PSPT = passive scattering proton therapy (protonthérapie à diffusion passive); IMPT = intensity modulated proton therapy (protonthérapie avec modulation d'intensité); BT = brachytherapy (curiethérapie).

### Radiothérapie stéréotaxique

La radiothérapie stéréotaxique a vu le jour en 1967 avec l'appareil Gamma Knife® (Elekta AB, Stockholm, Suède), mis au point par le neurochirurgien suédois Lars Leksell. Un cadre en métal permet au préalable le repérage lésionnel en trois dimensions ("volume" = *stereo* en latin), puis les photons  $\gamma$  émis par l'isotope radioactif Cobalt 60 sont dirigés vers la/les lésion(s) intracrânienne(s); on parle de radiochirurgie (ou SRS pour *stereotactic radiosurgery*) (22).

La technique de radiothérapie stéréotaxique a depuis été déclinée aux Linac et leurs photons X, et étendue au traitement de lésions extra-crâniennes (SBRT pour *Stereotactic Body Radiation Therapy*). Spécialement conçu pour la radiothérapie stéréotaxique, le CyberKnife® (Accuray, USA) correspond à un Linac monté sur une tête robotique, permettant un déplacement dans tous les plans de l'espace autour du patient (23).

Au total, la radiothérapie stéréotaxique est une technique de traitement délivrant une multitude de microfaisceaux de manière centripète vers la tumeur, selon une balistique en 3D (24). Notons au passage que chaque microfaisceau est en lui-même porteur d'une faible dose. En pratique, le terme de *stéréotaxie* peut également faire référence à une irradiation par



forte dose par séance. Nous verrons plus loin les conséquences de cette confusion sémantique (cf. § II).

#### *Radiothérapie guidée par l'image (IGRT)*

Enfin, avant chaque irradiation, le repositionnement du patient sur la table de traitement peut être contrôlé par radiographie, scanner, voire IRM ; on parle alors de radiothérapie guidée par l'image (IGRT) (25, 26).

#### *Radiothérapie FLASH*

Plébiscité depuis 2014 (27), l'effet FLASH correspond à la préservation des tissus sains lors d'une irradiation à l'efficacité anti-tumorale conservée (28). Bien qu'indépendant de la particule employée (29), l'effet FLASH est pour l'heure cliniquement restreint à l'usage d'électrons (30) du fait de limitations principalement techniques (31). Nécessitant des débits de dose ultra-élevés de l'ordre de 40 Gy/s (*vs* 1 Gy/min ou 100 UM/min en RT conventionnelle), la radiothérapie FLASH nous éloigne cependant du sujet de cette thèse.

#### *Choix de la technique de radiothérapie externe (RTE)*

Chaque avancée technologique ne se traduit pas systématiquement par un bénéfice pour le patient. En effet, une meilleure conformation de la dose peut ne pas réduire la radiotoxicité, comme dans le cas d'un traitement adjuvant du sein (32) ou encore d'une radiothérapie exclusive de la prostate (33). De plus, l'usage du CyberKnife pour irradier un grand volume, tel qu'un sein par exemple, rallongerait considérablement le temps passé sur la table de traitement par rapport au VMAT. Aussi la technique de RTE est-elle minutieusement choisie selon l'indication thérapeutique et les caractéristiques cliniques du patient.

## **I.1.2. Applications en oncologie**

### *I.1.2.1. Radiothérapie standard, hypofractionnée, et stéréotaxique*

Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, le développement de l'anesthésie générale par W. Morton (34) et de l'asepsie par I.P. Semmelweis (35) permet des avancées majeures en chirurgie. La cancérologie connaît alors les premières laryngectomie totale (1873), gastrectomie totale

(1881), mastectomie radicale (1894), hystérectomie radicale (1898), ou encore prostatectomie radicale (1904). Néanmoins, l'inopérabilité du patient (selon ses comorbidités), la non-résécabilité de la tumeur (risque de marges positives), et le stade avancé du cancer (métastases à distance) peuvent dans de nombreux cas compromettre le succès oncologique d'une chirurgie d'exérèse. À cette même période, l'avènement de la radiothérapie apporte également son lot de succès (5). De nos jours, les stratégies de traitements oncologiques sont volontiers multimodales, afin d'améliorer le contrôle de la maladie et la survie du patient. À ce titre, on estime qu'environ 60 à 70% des malades atteints de cancer bénéficient d'un traitement par radiothérapie (36).

En oncologie, les stratégies de traitement curatif privilégient la radiothérapie :

- associée à la chirurgie : soit en néo-adjuvant afin de réduire la masse tumorale avant l'opération, comme dans le cas du cancer de l'œsophage (37) ; soit en adjuvant dans le but de détruire les cellules tumorales résiduelles présentes dans le lit de tumorectomie, comme dans le cas d'un cancer du sein (38, 39), de l'endomètre (40), d'un glioblastome (41), d'un méningiome (42), ou encore d'un sarcome (43).
- associée à une chimiothérapie : soit séquentielle comme dans certains cas de cancers du rectum (44), de pancréas (45) ou de lymphomes de Hodgkin (46) ; soit concomitante, – avec une molécule radiosensibilisante, – particulièrement dans le cadre d'un cancer de la sphère ORL (47), de l'œsophage (48), du col utérin (49), de la vessie (50), du canal anal (51), d'un cancer pulmonaire à petites cellules de stade précoce (52), ou d'un cancer pulmonaire non-à-petites cellules de stade localement avancé (53).
- de manière exclusive, notamment dans des cas de cancers prostatiques (54) ou pulmonaires non-à-petites cellules (55) de stades précoces.
- dans le cas particulier d'une irradiation corporelle totale (ou *TBI* pour *total body irradiation*) myéloablative, pour le traitement des leucémies aiguës (lymphoblastique ou myéloblastique), avec un double objectif : i) tumoricide, notamment dans les zones "sanctuaires" difficilement accessibles par la chimiothérapie telles que les testicules ou le cerveau en raison de la barrière hémato-encéphalique ; ii) immuno-modulateur, afin de prévenir le rejet de greffe de cellules souches hématopoïétiques (GSCH) de moelle osseuse (56). Notons que le syndrome hématopoïétique est l'une

des premières manifestations du syndrome d'irradiation aiguë (SIA), pour des doses de l'ordre de 4 Gy corps entier (57).

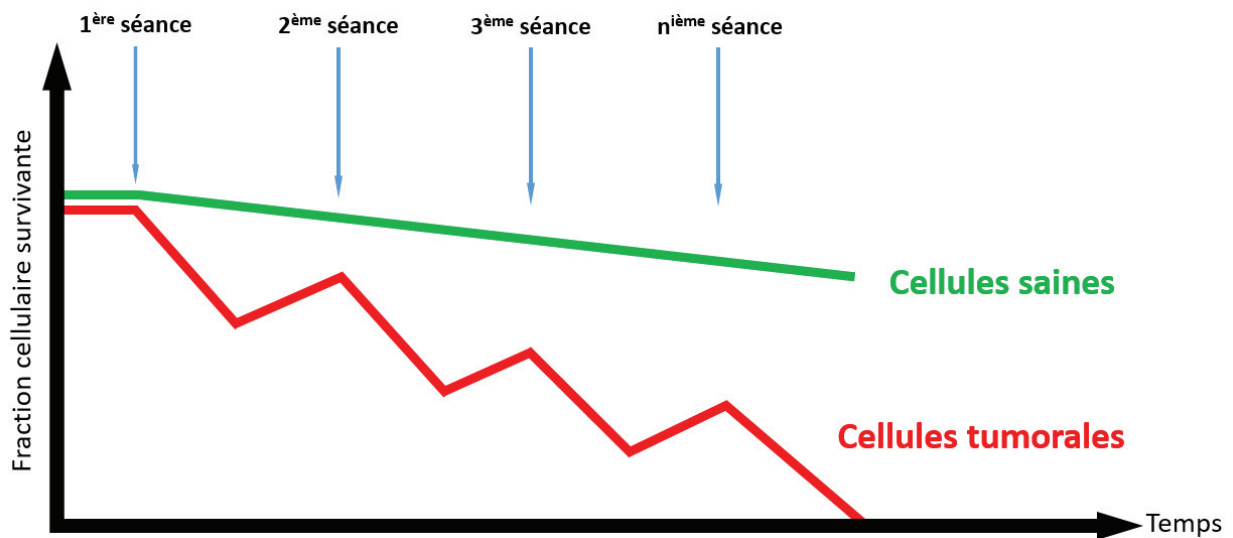
Une radiothérapie curative peut également s'accompagner d'une irradiation prophylactique :

- des aires ganglionnaires de drainage de la tumeur, très fréquente en sénologie (58) ou pour les cancers prostatiques (59).
- de l'encéphale en totalité, recommandée par exemple pour les patients en réponse complète après traitement d'un cancer pulmonaire à petites cellules (60).

Enfin, une prise en charge palliative peut proposer une radiothérapie :

- antalgique, par exemple en cas de tumeur pancréatique (61) ou de métastases osseuses (62).
- de contrôle local pour des patients oligométastatiques au niveau intra- (63) ou extra-crânien (64).
- en urgence : à visée hémostatique, en cas de syndrome de compression de la veine cave supérieure, d'engagement cérébral, ou plus fréquemment de compression médullaire (65).

Les doses curatives de RI utilisées en oncologie sont généralement trop élevées pour être délivrées en une seule séance, au risque d'exposer le patient à des toxicités majeures. Nonobstant cette limite biologique, les mécanismes de réparation des dommages radio-induits de l'ADN sont généralement plus permissifs dans les cellules tumorales que dans les cellules saines (66, 67), avec une part relative de la réparation par recombinaison plus élevée (68). Ainsi, le fractionnement d'une forte dose totale anti-tumorale (de l'ordre de 50-80 Gy) en faibles doses par séance anti-toxiques (classiquement de 2 Gy/séance) permet d'observer un effet différentiel entre populations cellulaires saines et tumorales (69, 70), schématisé dans la Figure 9.



**Figure 9.** Effet différentiel du fractionnement en radiothérapie.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment (cf. § 1.1.1.3), le perfectionnement des techniques de radiothérapie permet aujourd'hui de conformer la dose le plus exclusivement possible à la tumeur, tout en épargnant au maximum les tissus sains alentours (20). Une telle balistique de traitement, hautement précise, autorise désormais à augmenter la dose par séance selon des schémas : volontiers hypo-fractionnés (2-3 Gy/fraction), comme pour certaines tumeurs prostatiques (71, 72) ou mammaires (73, 74) ; voire stéréotaxiques ( $\geq 4$  Gy/ séance), comme en cas de SBRT pulmonaire (55), hépatique (75), ou de radiochirurgie de métastases cérébrales (63, 76). Outre une amélioration du contrôle local (77) et de la survie globale (78) pour certains cancers, l'augmentation de la dose par séance permet également de réduire l'étalement (intervalle de temps entre la première et la dernière séance de RT), réduisant ainsi pour les patients l'inconfort lié au temps passé en milieu médical.

#### 1.1.2.2. Radiothérapie par faibles doses par fraction ( $\leq 1$ Gy/séance)

À l'opposé des doses utilisées en stéréotaxie, l'usage de faibles doses ( $\leq 1$  Gy/séance) est parfois suffisant pour obtenir un résultat clinique. Aux balbutiements de la radiothérapie, de 1896 aux années 1930s, les applications médicales des rayons X étaient nécessairement limitées par des contraintes technologiques. Les tubes à rayons X étaient fragiles et ne délivraient pas de fortes doses ( $< 1$  Gy) ni de haute énergie ( $< 100$  kV). À titre d'exemple, la reconstitution de la première RT anti-cancéreuse documentée a révélé que la dose délivrée à la tumeur était inférieure à 0.8 Gy/séance. On sait aujourd'hui que l'efficacité

de ce traitement historique ne pouvait être obtenue que sur un lymphome gastrique, probablement hyper-radiosensible aux faibles doses (5, 79, 80).

Si les lymphomes sont de nos jours traités avec des doses généralement supérieures (entre 1 et 2 Gy/ séance), ils n'en restent pas moins connus pour être radiosensibles (81). Aussi la radiothérapie par faibles doses, ou LDRT pour *low-dose radiation therapy*, a-t-elle été évaluée chez des patients atteints de lymphome non-hodgkinien (LNH). Dans une cohorte des années 1970, l'irradiation corporelle totale (TBI) de 68 patients atteints de LNH à la dose totale moyenne de 1.78 et dose médiane de 0.1 Gy/séance, a permis d'atteindre une survie sans récurrence de 32% et 27% respectivement à 5 et 10 ans (82). Une décennie plus tard, un excellent taux de rémission a été mis en évidence chez des patients atteints de LNH ayant reçu deux cures de LD-TBI (0.75 Gy en 5 séances) avec chimiothérapie concomitante, suivies un mois plus tard d'une RT incluant la totalité des aires ganglionnaires atteintes (*involved-field*) (83).

Plus récemment, la LDRT a également montré un intérêt clinique pour traiter des stades métastatiques de cancer. En 2004, une étude a examiné le devenir de 36 nodules tumoraux métastatiques après irradiation normo-fractionnée (1.5 Gy/j sur 12 jours) ou ultra-fractionnée (0.5 Gy x3/j sur 12 jours). Le suivi a révélé que, pour une même dose totale, le schéma ultra-fractionné permettait de retarder la progression des nodules de manière significative (84). Une étude de phase II a par ailleurs démontré, chez 38.9% des patients atteints de métastases de cancer colorectal traitées par deux séances quotidiennes de LDRT (20 cGy toutes les 6 h) sur chacun des 12 cycles de chimiothérapie concomitantes (85). Combinée à l'immunothérapie, la LDRT de 1 Gy/séance a également entraîné une réponse complète des métastases hépatiques et ganglionnaires chez une patiente âgée atteinte d'un mélanome vaginal (86). Dans un autre essai de phase II, 74 patients atteints d'un cancer métastatique (cancer du poumon non à petites cellules, n = 38 ; mélanome, n = 21) ont subi un traitement de RT à forte dose (HDRT : 20 à 70 Gy au total ; 3 à 12.5 Gy par séance) associée ou non à la LDRT (1-10 Gy au total ; 0.5-2 Gy par séance). Le suivi a montré que l'ajout de LDRT à HDRT renforçait la réponse de contrôle de la maladie à 4 mois (47 % dans HDRT+LDRT contre 37 % dans HDRT seul ; p = 0.38) et augmentait la réponse globale (26 % dans HDRT+LDRT contre 13 % dans le HDRT seul ; p = 0.27). Ce schéma semblait également sûr, avec seulement trois patients (4.1%) souffrant de

toxicité de grade 3 ou plus. Cependant, il faut mentionner que les patients inclus dans l'étude avaient reçu une immunothérapie (87).

Enfin, il est à noter que les schémas hyperfractionnés couramment utilisés en radiothérapie oncologique concernent des doses variant de 1.1 Gy/séance, - comme pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (88), - à 1.5 Gy/séance, - cancer du poumon à petites cellules limité (52), - et ne rentrent donc pas à proprement parler dans le spectre de la LDRT. Le Tableau 1 résume les tentatives cliniques et les résultats de la LDRT en oncologie. Soulignons cependant que les données disponibles sont basées sur un nombre relativement faible de patients.

**Tableau 1.** État de l'art de la radiothérapie par faibles doses (LDRT) en Oncologie. CPNPC = cancer pulmonaire non à petites cellules. RCT = radio-chimiothérapie. LNH = lymphome non-Hodgkinien. TBI = irradiation corporelle totale (*total body irradiation*). IF = aires ganglionnaires atteintes (*involved-field*). RT = radiothérapie. HD = haute dose. LD = faible dose (*low dose*).

Cible	Design de l'étude	Schéma d'irradiation	Réponse	Référence
<b>Hémato-oncologie</b>				
68 patients atteints de LNH (90% stade III et IV)	Corps entier Rétrospective	LD-TBI : 0.1 Gy par séance en moyenne (1.78 Gy total)	Survie sans récurrence: 32% à 5 ans, 27% à 10 ans	(82)
26 patients atteints de LNH (stade III et IV)	Corps entier Prospective, non randomisée (étude pilote)	Chimiothérapie et 2 séances de LD-TBI : 5 x 0.15 Gy par séance (séparées de 2 semaines), suivi 1 mois plus tard par IF-RT (20 x 2 Gy par séance)	Rémission complète chez 92.3% (24/26) patients après LD-TBI et avant IF-RT; Rémission complète chez 96.2% (25/26) patients après IF-RT	(83)
<b>Métastases à distance</b>				
8 patients avec des nodules tumoraux	Métastases Randomisée	RT normo-fractionnée : 12 x 1.5 Gy par séance ou RT ultra-fractionnée : 0.5 Gy/4h sur 12j	Augmentation significative du délai avant repousse pour les nodules traités par RT ultra-fractionnée	(84)
18 patients avec métastases de cancer colorectal	Métastases Phase II	0.2 Gy par séance toutes les 6h (à chaque cycle de chimiothérapie)	Réponse clinique ou pathologique complète chez 38.9% (7/18) patients	(85)
Patiente de 73 ans avec métastase vaginale de mélanome, en progression sous immunothérapie	Métastase Case report	LDRT : 5 x 1 Gy par séance (métastases hépatiques); 6 x 1 Gy par séance (adénopathie inguinale)	Réponse clinique et radiographique complète	(86)
74 patients avec cancer métastatique (CPNPC, n=38; mélanome, n=21) en progression sous immunothérapie	Métastases Phase II	HDRT seule : 3-12.5 Gy par séance (20-70 Gy total) ou HDRT + LDRT : 0.5-2 Gy par séance (1-10 Gy total)	Contrôle de la maladie à 4 mois : 47% après HDRT + LDRT vs. 37% après HDRT seule (p=0.38); Réponse globale : 26% après HDRT + LDRT vs. 13% après HDRT (p=0.27)	(87)

### I.1.3. Applications en neurologie

#### *I.1.3.1. Radiochirurgie non-oncologique*

Parallèlement aux indications neuro-oncologiques, dont certaines ont été précédemment décrites (cf. § I.1.2.1), les RI peuvent également être utilisées à l'encontre de pathologies intracrâniennes non malignes (89). Il peut s'agir de malformations artérioveineuses cérébrales (MAV) (90), de tumeurs bénignes telles que les méningiomes (91, 92) et les schwannomes vestibulaires (93), ou encore de pathologies résistantes aux traitements médicamenteux comme la névralgie du nerf trijumeau (94, 95), l'épilepsie (96) ou la dépression (97, 98).

Les tremblements liés à la maladie de Parkinson peuvent également être éligibles à une thalamotomie focale par radiochirurgie (99, 100). De manière intéressante, des expériences menées dans les années 1980 ont montré que les cellules de patients souffrant de maladie de Parkinson présentent une radiosensibilité accrue (101, 102), également observée pour les cellules de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Par syllogisme, se pose alors la question de la place de la radiothérapie dans le traitement de la démence d'Alzheimer.

#### *I.1.3.2. Radiothérapie de la maladie d'Alzheimer*

La maladie d'Alzheimer (MA) représente la première cause de démence à travers le monde, considérée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme une priorité mondiale de santé publique (103). La plupart du temps, seul un diagnostic probabiliste peut être posé sur la base d'arguments cliniques (âge, amnésie hippocampique, antécédents familiaux de MA) (104), étayés par des critères biologiques après ponction lombaire (augmentation de la protéine pTau et diminution du peptide A $\beta$ 1-42 dans le liquide céphalo-rachidien) (105), et imagerie cérébrale (atrophie cortico-sous-corticale, atrophie hippocampique, absence d'autre cause de démence) (106). Le diagnostic définitif de la MA repose sur la mise en évidence histologique de dépôts extracellulaires de peptide amyloïde-A $\beta$ 42 (plaques séniles) dans les tissus de soutien du système nerveux central (107), et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires de protéine Tau hyperphosphorylée (108). Si la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles peuvent être retrouvées dans d'autres pathologies, leur association est en revanche pathognomonique de la MA. La neuroinflammation est également un signe fréquemment rencontré dans la pathogenèse de la MA (109-111).

Sur le plan thérapeutique, certains médicaments préventifs présentent des résultats controversés (112, 113). Aucun traitement curatif n'est à ce jour disponible (114), bien que la radiothérapie par faibles doses (LDRT) apparaisse comme une piste prometteuse, émanant aussi bien d'études *in vivo* (115-117) que de *case reports* cliniques (118-121).

Depuis les années 1980, quelques études ont montré que les fibroblastes et lymphocytes de patients atteints de MA sont radiosensibles et pourraient présenter des dysfonctionnements dans les systèmes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (101, 102, 122, 123). Ainsi, de nombreuses expérimentations ont été menées sur modèles murins, objectivant des améliorations des performances cognitives pour des doses totales de l'ordre de 10 à 20 Gy en séances de 2 Gy (115-117). Chez l'humain, des doses de 2 Gy/séance répétées 5 à 10 fois ont alors été appliquées dans le cadre d'un essai clinique sur une petite cohorte de cinq patients, objectivant des progrès cognitifs chez trois d'entre eux (124). D'autres études évaluant des doses similaires sont en cours en Suisse (NCT03352258, Hôpitaux Universitaires de Genève), aux États-Unis (NCT02359864, William Beaumont Hospitals) et en Corée du Sud (NCT04203121, Hôpital Universitaire Kyung Hee).

Parallèlement, depuis 2016, Cuttler et al. ont publié deux *case reports* décrivant une amélioration temporaire des performances cognitives de patients atteints de MA après avoir réalisé des scanners (CT) cérébraux itératifs, d'environ 40-50 mGy sur 10 secondes chacun (118-121). Le premier *case report* présente une femme de 81 ans atteinte de MA évoluant depuis 10 ans, vivant en maison de retraite depuis plusieurs mois, et qu'un neuropsychologue décrit en Mai 2015 comme étant « *presque totalement non communicante* », « *complètement non réactive* », « *refusant fréquemment ses médicaments* », « *presque immobile* » et qui « *n'a pas tenté de se lever de son fauteuil roulant depuis des mois* » (119). En Juillet, son médecin lui prescrit deux CT cérébraux (dose totale de 82 mGy) pour exclure toute modification anatomique, et sur demande insistante du conjoint de la patiente pour selon lui « *stimuler les systèmes neuroprotecteurs* ». Étonnamment, la patiente aurait dans les jours suivants présenté une franche amélioration sur le plan de la cognition, de la parole, du mouvement et de l'appétit (sans toutefois de scores quantitatifs), si bien qu'elle a réalisé trois autres CT en trois mois : un 3<sup>ème</sup> (39 mGy) deux semaines après le précédent, un 4<sup>ème</sup> (47 mGy) deux semaines plus tard, et un 5<sup>ème</sup> (39 mGy) six semaines plus tard en Octobre.



Devant des performances cognitives en continuelle amélioration, un 6<sup>ème</sup> CT cérébral (40 mGy) est réalisé cinq mois après le précédent, un 7<sup>ème</sup> (40 mGy) quatre mois plus tard, et un 8<sup>ème</sup> (40 mGy) à nouveau quatre mois après. Dès lors, son état général commence à décliner, de sorte que les CT cérébraux suivants sont réalisés plus précocement : un 9<sup>ème</sup> (40 mGy) 47 jours après le précédent, puis les 10<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> (80 mGy) 41 jours plus tard en Janvier 2017. Au total, la patiente a reçu environ 0.45 Gy sur l'encéphale en totalité, à travers 11 CT étalés sur 18 mois. Elle est finalement décédée le 18 Mai 2018, 16 mois après le dernier CT (119-121).

Les mêmes auteurs ont rapporté un autre cas d'un homme de 73 ans diagnostiqué de la MA en Janvier 2015, ayant également bénéficié de CT cérébraux, associés cette fois à une évaluation clinique régulière par Mini-Mental State Examination (MMSE) (118). Il est à noter qu'un score MMSE inférieur ou égal à 23/30 signe généralement la présence de troubles cognitifs (125). Avec un score MMSE initial de 22/30 en Février 2016, le patient a réalisé un 1<sup>er</sup> CT (46 mGy) en Avril 2016. Trois semaines après, son MMSE augmente timidement à 24/30. Il a réalisé un 2<sup>ème</sup> CT deux mois après le premier, et son MMSE a continué de progresser à 26/30 lors de l'évaluation de Septembre 2016. Les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> CT ont précédé un autre score MMSE à 26/30 en Février 2017, qui a néanmoins diminué à 25/30 en Mars puis 24/30 en Avril. Deux CT supplémentaires (5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup>) ont été réalisés jusqu'en Octobre 2017. Le patient a ensuite progressivement décliné son état général, et est finalement décédé le 7 Septembre 2020, à l'âge de 77 ans.

Dans la continuité de ces deux *case reports* (118-121), Cuttler et al. ont alors entrepris une étude clinique mono-bras chez quatre patients (âge : 81-90 ans) atteints de MA sévère mais stable (126). Les patients ont reçu deux CT cérébraux à la fois au cours d'une même séance de traitement (80 mGy au total), puis un 3<sup>ème</sup> (40 mGy) deux semaines après, et un 4<sup>ème</sup> et dernier (40 mGy) deux semaines après. Trois des quatre patients ont montré de légères améliorations cognitivo-comportementales sur des mesures quantitatives, notamment : un score Severe Impairment Battery (SIB) passant de 21% à 31% chez un des patients ; activités de base de la vie quotidienne (ADL) de 26.7% à 30% chez un autre patient. Bien que ces brèves améliorations post-CT n'aient produit aucun bénéfice à long terme pour les patients, elles pourraient refléter un effet biologique significatif des faibles doses de RI sur la MA.

Le Tableau 2 décrit les différentes tentatives cliniques de LDRT "anti-Alzheimer", à doses scanographique (fondée sur les *case reports*) ou radiothérapeutique (émanant d'études *in vivo*). Notons enfin que des explications mécanistiques de LDRT anti-MA émergent au niveau cellulaire sur des modèles animaux, mais qu'il n'existe toujours pas de rationnel moléculaire chez les patients.

**Tableau 2.** État de l'art de la radiothérapie par faibles doses (LDRT) pour la maladie d'Alzheimer (MA). MMSE = mini-mental state examination. SIB = severe impairment battery. ADL = basic activities of daily living.

	Cible	Design de l'étude	Schéma d'irradiation	Réponse	Référence
<b>Doses scanographiques</b>					
Patiente MA de 81 ans	Cerveau	Case report	5 x 40 mGy/CT sur 3 mois	Amélioration cognitive permettant un arrêt des soins de support	(119-121)
Patient MA de 73 ans	Cerveau	Case report	6 x 45-50 mGy/CT sur 18 mois	Augmentation du score MMSE de 22/30 à 26/30	(118)
4 patients MA	Cerveau	Simple bras (étude pilote)	4 x 40 mGy/CT sur 1 mois	Discrètes améliorations cognitivo-comportementales basées sur des scores quantitatifs (SIB, ADLs)	(126)
<b>Doses de radiothérapie</b>					
30 patients MA	Cerveau	Phase I (étude pilote simple bras)	5 x 2 Gy par séance 10 x 2 Gy par séance	Suspendue pour limitations budgétaire et en personnel	NCT02359864 (William Beaumont Hospitals, MI, USA)
5 patients MA	Cerveau	Phase IIa (étude pilote simple bras)	5 x 2 Gy par séance 10 x 2 Gy par séance	Performances cognitives (score MMSE) à un an : améliorées chez 3 patients, stables chez 1 patient	(124)
20 patients MA	Cerveau	Randomisée, monocentrique, prospective (étude pilote)	5 x 2 Gy par séance	Recrutement en cours depuis 2017	NCT03352258 (Hôpitaux Universitaires de Genève, Suisse)
10 patients MA	Cerveau	Randomisée, monocentrique, prospective	3 x 1.8 Gy par séance 5 x 1.8 Gy par séance	Recrutement en cours depuis 2019	NCT04203121 (Kyung Hee University Hospital de Gangdong, Corée du Sud)

#### I.1.4. Effet anti-inflammatoire

Lors de la première tentative RT en 1896, Victor Despeignes décrit chez son patient une diminution de la douleur, probablement liée à la décompression de la tumeur contre les tissus avoisinants (5, 6). À l'instar de leur efficacité anticancéreuse, les rayons X peuvent en effet être utilisés à visée symptomatique, dans une large gamme de pathologies souvent médiées par l'inflammation (127).

En réponse à un stress (traumatisme, corps étranger, cellule cancéreuse,...), les cellules du système immunitaire (mastocytes, macrophages, cellules dendritiques,...)

sécrètent divers médiateurs de l'inflammation. Parmi eux, les cytokines pro-inflammatoires stimulent l'expression de molécules d'adhésion (prostaglandines, leucotriènes,...) au niveau des cellules endothéliales (128). En résultent plusieurs phénomènes vasculaires :

- une vasodilatation (afflux de sang chaud au site d'agression) entraînant *chaleur* et *rougeur* locales,
- une augmentation de la perméabilité vasculaire : l'exsudation du plasma vers la matrice interstitielle se traduit cliniquement par un *œdème*, tandis que la stimulation (mécanique par pression, ou chimique via l'arrivée des cytokines) des nocicepteurs engendre une *douleur* (129),
- une diapédèse leucocytaire.

Grâce à cette première phase vasculaire s'engage ensuite la réparation des tissus lésés, qui conclut normalement la réponse inflammatoire. À l'inverse, une inflammation chronique entretient les quatre signes cardinaux pré-cités, dits "de Celse", à savoir : *œdème*, *chaleur*, *rougeur* et *douleur* (130). La cascade d'évènements moléculaires survenant au cours d'une réaction inflammatoire offre ainsi de nombreuses cibles thérapeutiques. On citera par exemple la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), enzyme stimulée par l'interleukine 1 (IL-1) (131), catalysant la production de prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), et inhibée par l'acide acétylsalicylique (*Aspirine*) (132) ; ou encore le TNF $\alpha$  dont le taux sérique est diminué par les anticorps monoclonaux anti-TNF $\alpha$  tels que l'infliximab ou l'éta nercept, largement utilisés à l'encontre de maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, psoriasis sévère et sa forme rhumatismale, rectocolite hémorragique, maladie de Crohn,...) (133).

Parallèlement à ces traitements médicamenteux, plusieurs études ont montré que la radiothérapie par faibles doses (LDRT) pouvait être employée à visée symptomatique, et notamment antalgique, dans diverses maladies rhumatologiques (134). Historiquement, des pionniers de la RT comme Sokolow (1897), Stenbeck (1899), Albers-Schönberg (1900), Stembo (1900) et Moser (1903) ont décrit une réduction significative de la douleur après RT contre l'arthrite aiguë (135-139). Après les années 1930, un certain nombre de protocoles de RT anti-inflammatoire ont prospéré, tout en limitant la dose totale au vu du risque de cancers radio-induits et/ou de séquelles à long terme (140). La RT contre la spondylarthrite

ankylosante est ainsi devenue une routine entre les années 1930 et 1950 (141). Actuellement, les douleurs ostéo-articulaires inflammatoires telles que la synovite, l'épicondylite latérale du coude (*tennis elbow*), un conflit sous-acromial, la bursite trochantérienne, la fasciite plantaire et l'arthrose (bien que l'arthrose ne soit pas toujours associée à une inflammation), peuvent être soulagées par une dose totale d'environ 3–6 Gy, délivrée en 0.5 à 1 Gy par séance (142). Dans une étude prospective, Micke et al. ont décrit un effet antalgique de la LDRT (6 Gy délivrés en 0.5–1 Gy par séance) chez 166 patients atteints de troubles articulaires dégénératifs (143). Une étude plus récente est parvenue à la même conclusion après avoir irradié 196 patients souffrant d'arthrose douloureuse de la cheville et du pied, selon un schéma LDRT (3–6 Gy délivrés en 0.5–1 Gy par séance) (144). À l'inverse, trois essais cliniques contrôlés et randomisés ont invalidé ce bénéfice supposé de la LDRT chez les patients souffrant d'arthrose de la main et de gonarthrose (145-147). D'autres études prospectives se poursuivent malgré tout à travers le monde, permettant notamment de comprendre le comportement de biomarqueurs de l'inflammation en réponse à la LDRT (NCT02653079, University of Erlangen-Nürnberg Medical School, Allemagne, avec son analyse intermédiaire (148)).

Plus récemment, une autre application importante de LDRT a émergé avec la pandémie de coronavirus 2019 (COVID-19). Selon le tableau de bord COVID-19 de l'OMS, le syndrome respiratoire aigu sévère à coronavirus 2 (SARS-CoV-2) est responsable de près de 7 millions de décès dans le monde au 8 Septembre 2023 (149). D'un point de vue physiopathologique, l'inflammation pulmonaire semble occuper un rôle majeur dans les symptômes et la mortalité liés au COVID-19 (150-152).

Depuis le début de la pandémie, de nombreux auteurs ont évalué l'utilisation de la LDRT chez les patients COVID-19, probablement inspirés par les propriétés anti-inflammatoires des rayons X à partir des données ci-dessus et/ou par des observations empiriques après des examens de tomodensitométrie (150, 153). Dans deux essais prospectifs, une dose unique de 0.5 à 1 Gy aux poumons entiers a produit une amélioration clinique significative (rapport saturation oxymétrique de pouls [SatO<sub>2</sub>] / fraction d'oxygène inspiré [FiO<sub>2</sub>]) et ce, sans radiotoxicité (154, 155). Dans un essai de phase II, Ganesan et al. ont rapporté certains bénéfices pulmonaires (le rapport SatO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> s'est significativement amélioré et l'apport d'oxygène a diminué de manière significative) chez 88 % des patients COVID-19 après un

LDRT délivré en une seule séance de 0.5 Gy aux poumons entiers bilatéraux (156). Ces résultats étaient en accord avec ceux publiés par Rodríguez-Tomàs et al., chez 30 patients soumis au même schéma LDRT unique de 0.5 Gy (157), mais pas avec ceux d'un essai randomisé délivrant 1 Gy chez 20 patients (158). Deux essais cliniques randomisés en cours évaluent actuellement d'autres schémas de traitement : 1.5 Gy en dose unique (NCT04433949, Emory University, USA, avec son analyse intermédiaire (159)), et 0.35 Gy ou 1 Gy en dose unique (NCT04466683, Ohio State University Comprehensive Cancer Center, USA).

Dans un état des lieux récent, en insistant à nouveau sur la faible quantité de données disponibles (nombre de patients traités, variété des traitements, diversité des paramètres moléculaires et cellulaires utilisés), Rödel et al (2020) ont souligné l'importance d'un délai approprié d'irradiation avec le fractionnement de dose et la succession des différentes étapes observées lors d'une infection au COVID-19. Par conséquent, même si la LDRT semble être efficace contre l'inflammation après une infection au COVID-19, une surveillance stricte et un traitement adapté à la phase de la maladie basé sur des marqueurs objectifs comme l'IL-6 et les D-dimères dans le sérum sont nécessaires (160).

De manière plus anecdotique, l'orbitopathie rencontrée dans la maladie de Basedow (ou *Graves' disease* dans le monde anglophone) et répondant généralement au sélénium et aux anti-inflammatoires stéroïdiens (corticothérapie), peut également être traitée par radiothérapie (161). Le fractionnement le plus souvent utilisé de 10 x 2 Gy/séance semble pouvoir être délivré en toute sécurité (162) et permettre une bonne réponse dans 60% des cas (161). D'autres schémas utilisant la LDRT ont également été proposés, tels que 1 Gy/séance hebdomadaire sur 10 ou 20 semaines, avec la même efficacité (163).

Au total, les tentatives et résultats de la LDRT dans les pathologies liées à l'inflammation (rhumatologie, COVID-19 et orbitopathie basedowienne) sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3.** État de l'art de la radiothérapie par faibles doses (LDRT) pour les pathologies médiées par l'inflammation. COVID-19 = coronavirus SARS-CoV-2. SAFI = SatO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>.

Cible	Design de l'étude	Schéma d'irradiation	Réponse	Référence
-------	-------------------	----------------------	---------	-----------

<b>Rhumatologie</b>						
166 patients souffrant de troubles squelettiques douloureux (calcanéodynie, n=51; achillodynie, n=8; gonarthrose, n=80; bursite trochantérienne, n=27)	Ostéo-articulaire	Prospective	0.5-1 Gy par séance (6 Gy total)	Bonne réponse chez 37.3% (62/166) patients au décours immédiat de la RT; et chez 49.5% (54/109) patients après un suivi median de 29 mois (p=0.001)	(143)	
196 patients souffrant d'arthrose de cheville/pied	Articulations	Prospective	0.5-1 Gy par séance (3-6 Gy total) sur 3 semaines	Amélioration subjective de 80-100% chez 37% (71/196) patients	(144)	
125 patients souffrant de douleurs rhumatismales	Articulations	Prospective	0.5 Gy en séance unique	Amélioration significative des douleurs rhumatismales	(148)	NCT02653079 (University of Erlangen-Nürnberg Medical School, Allemagne) (148)
56 patients souffrant d'arthrose de genou/main	Articulations	Randomisée, contrôlée contre placebo	6 x 1 Gy par séance ou placebo	Pas de bénéfice significatif de la LDRT	(147)	
55 patients souffrant de gonarthrose	Articulations	Randomisée, double aveugle, contrôlée contre placebo	6 x 1 Gy par séance ou placebo	Pas de bénéfice significatif de la LDRT	(145)	
56 patients souffrant d'arthrose de mains	Articulations	Randomisée, aveugle, contrôlée contre placebo	6 x 1 Gy par séance ou placebo	Pas de bénéfice significatif de la LDRT	(146)	
<b>COVID-19</b>						
36 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Prospective	1 x 0.5 Gy par séance	Amélioration de l'index SAFI de 255 mmHg à : 283 mmHg à 24h, et 381 mmHg à une semaine	(154)	
41 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Prospective phase I-II	1 x 1 Gy par séance	Amélioration significative de l'index SAFI à J+3 et J+7 (p<0.01)	(155)	
25 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Phase II	1 x 0.5 Gy par séance	Amélioration significative de l'index SAFI entre pré-RT et post-RT J+2 (p<0.05), J+3 (p<0.001) et J+7 (p<0.001); Diminution significative de l'oxygénothérapie entre pré-RT et post-RT J+2 (p<0.05), J+3 (p<0.001), et J+7 (p<0.001)	(156)	
30 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Multicentrique, prospective, observationnelle	1 x 0.5 Gy par séance	Amélioration significative de l'index SAFI; Diminution de l'oxygénothérapie	(157)	
20 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Randomisée, double-aveugle	1 x 1 Gy par séance ou placebo	Diminution significative du nombre de lymphocytes après LDRT (p<0.01) ; Pas d'amélioration significative de la survie globale à J+28 post-RT (p=0.69) dans les deux bras	(158)	
100 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Phase II, randomisée	1 x 0.35 Gy par séance ou 1 x 1 Gy par séance ou placebo	Recrutement en cours depuis 2020		NCT04466683 (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, USA)
52 patients COVID-19	Poumons bilatéraux	Phase III, randomisée	1 x 1.5 Gy par séance ou placebo	Recrutement en cours depuis 2020	(159)	NCT04433949 (Emory University, USA) (159)
<b>Maladie de Basedow</b>						
65 patients euthyroïdiens, atteints d'une orbitopathie basedowienne	Orbites bilatérales	Randomisée, simple-aveugle	20 x 1 Gy/f hebdomadaire ou 10 x 1 Gy/j ou 10 x 2 Gy/j	Meilleure réponse clinique (diminution du diamètre oculaire, de la pression intra-oculaire et des douleurs oculaires) avec le schéma sur 20 semaines	(163)	

Au total, la LDRT a montré son efficacité dans trois grands domaines nosologiques : en oncologie, à l'encontre de certaines maladies neurodégénératives, et en rhumatologie. L'élaboration des protocoles de LDRT reste néanmoins souvent empirique, de sorte qu'il apparaît aujourd'hui indispensable de rationaliser les observations cliniques afin de sécuriser voire optimiser l'application de la LDRT en routine.

## I.2. BASES DE RADIOBIOLOGIE

*Conformément à la politique de notre Unité de Recherche de délivrer un message clair et univoque pour les aspects essentiels de la réponse aux RI, certains chapitres de radiobiologie générale de ce manuscrit (partie I.2) pourront être communs à d'autres thèses de doctorat déjà soutenues dans notre laboratoire.*

La radiobiologie est l'étude des effets biologiques des RI, couvrant tous les aspects physiques, chimiques, moléculaires, cellulaires, tissulaires et même réglementaires de la réponse aux rayonnements. Cette partie s'efforce de retracer l'essentiel des connaissances sur les événements radio-induits qui surviennent dans une cellule.

L'une des approches les plus didactiques pour l'aborder est de suivre l'ordre chronologique des événements qui surviennent immédiatement après une irradiation : d'abord physiques, puis chimiques, puis biologiques, et enfin cliniques.

### I.2.1. Radiobiologie cellulaire

#### *I.2.1.1. Des dépôts d'énergie aux dommages de l'ADN*

*Echelles temporelles et spatiales en radiobiologie*

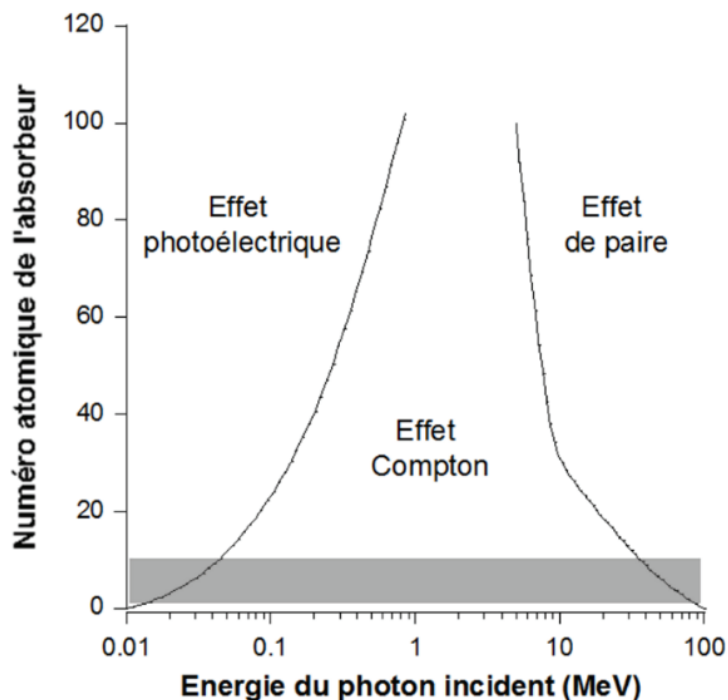
Comme nous l'avons vu précédemment, les RI se caractérisent par l'énergie qu'elles délivrent à la matière irradiée (cf. § I.1.1.1). Toutefois, la nature des phénomènes radio-induits dépend également de l'espace (échelle des molécules, de la cellule, du tissu/organe, de l'individu) et du temps (période qui suit l'irradiation). Ces deux notions sont étroitement liées lors de la réponse biologique à une irradiation. En effet, comme on l'a déjà dit plus haut, les phénomènes radio-induits, qui sont généralement d'abord *physiques*, puis *chimiques* puis *biologiques*, évoluent respectivement sur une échelle nanoscopique (atomes, molécules), microscopique (cellules) et *macroscopique* (tissus/organes, individus, populations). Les premiers événements radio-induits se déroulent selon un ordre bien établi : de  $10^{-18}$  à  $10^{-12}$  s après irradiation, on observe les événements d'origine physique. Pendant cette période, l'irradiation entraîne la formation de *microdépôts d'énergie* aléatoirement répartis dans la matière. Puis, de  $10^{-12}$  à 1 s, les événements deviennent chimiques : les ionisations induites dans la matière par les microdépôts d'énergie entraînent des changements moléculaires à travers le phénomène dit de *radiolyse de l'eau*, l'eau étant le principal constituant de la



matière vivante. Comme évoqué plus haut, la radiolyse de l'eau aboutit à la formation de certaines espèces chimiques radicalaires généralement à fort pouvoir oxydant (ex : radicaux hydroxyles  $\text{OH}^\bullet$ , superoxydes  $\text{O}_2^\bullet$ ) mais à durée de vie relativement limitée (cf. § 1.1.1.1). Ensuite, perdurent des produits de radiolyse plus stables comme notamment le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ou eau oxygénée), capable de casser l'ADN (164). Les dommages radio-induits de l'ADN appartiennent à la phase biochimique de la réponse aux RI. L'étape biologique proprement dite commence quand les processus de signalisation et de réparation des dommages radio-induits de l'ADN s'activent et font apparaître un facteur individuel : « nous ne sommes pas égaux face aux radiations ». Ainsi, les phénomènes physico-chimiques sont communs à tous les individus, voire à toutes les espèces alors que les phénomènes biologiques naissent avec les diversités inter-individuelles et une certaine complexité des mécanismes. Les phénomènes physico-chimiques sont plus homogènes et régis généralement par des lois de proportionnalité avec la dose alors que les relations entre la dose et les effets biologiques sont généralement non linéairement liées à la dose et de plus en plus multi-paramétriques. Étudions en détails les phases physiques, chimiques et biologiques de la réponse aux radiations.

#### *Évènements physiques radio-induits (de $10^{-18}$ à $10^{-12}$ s)*

Les trois effets principaux de l'interaction rayonnement-matière sont : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la création de paires (Fig. 10). L'effet Compton prédomine pour les numéros atomiques des principaux composants organiques (C, H, O, N) de la matière vivante. De plus, l'effet Compton est le mode principal d'interaction pour des photons d'énergies comprises entre 1 et 5 MeV. Pour des énergies plus basses, l'effet Compton domine aussi pour les matériaux légers (eau, composants organiques) (165). Un tel effet libérant à la fois un photon de recul et un électron produit excitations et ionisations dans le milieu irradié : c'est pourquoi l'irradiation se résume généralement dans la matière vivante à des dépôts d'énergies tellement variées que leur spectre peut être considéré comme large et continu plutôt que discret et quantique. L'effet Compton est ainsi principalement responsable de la diversité des événements radio-induits sur la matière vivante.



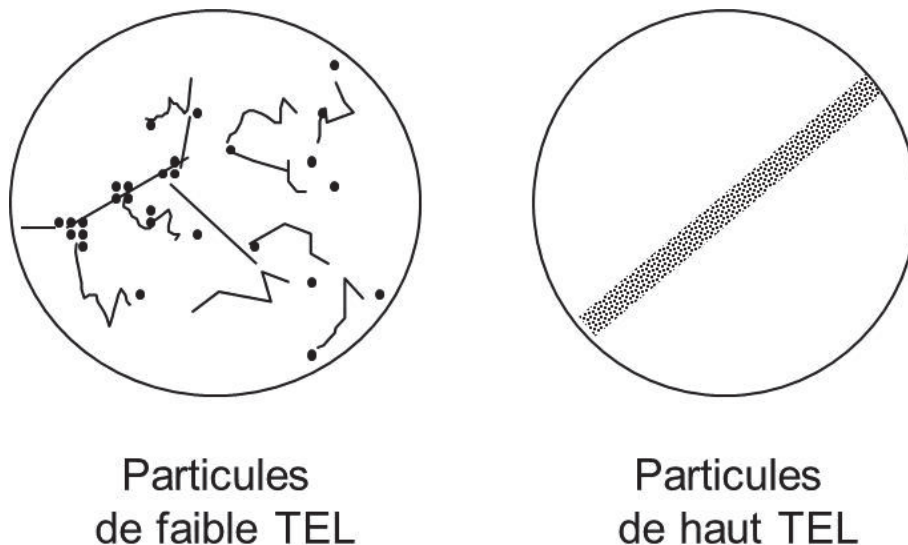
**Figure 10.** Importance relative des effets d'interaction rayonnement-matière en fonction de l'énergie. D'après (165). La zone grisée correspond aux numéros atomiques des principaux composants organiques C, H, O, N.

À l'échelle *nanoscopique*, c'est-à-dire à l'échelle de l'ADN, l'énergie n'est pas délivrée de façon homogène mais *stochastique*, variant dans le volume irradié en nombre et en densité d'énergie sous la forme de *microdépôts d'énergie*. Toutefois, alors que la notion de dose absorbée est définie en Joules par kilogramme (unité : le Gray [Gy]), cette définition montre ses limites pour apprécier un effet biologique aux plus petites échelles car le Joule par kg est une unité bien trop grande (166). Bien que la microdosimétrie et la nanodosimétrie ne soient pas le sujet de cet ouvrage, approfondissons néanmoins la notion de microdépôts d'énergie. Dans les années 1980, l'algorithme de Monte-Carlo a permis de simuler des trajets de particules dans des volumes de l'ordre du nanomètre (167). À partir de ces études, les structures tridimensionnelles d'un nombre de trajets statistiquement représentatifs ont été analysées avec des dimensions inférieures à 1 nm (168). Certaines simulations de Monte-Carlo suggérèrent notamment qu'une forte concentration d'ionisations pouvait créer plusieurs types de dommages de l'ADN appelés dommages multiples hautement localisés (*localized multiple damage sites, LMDS*) (164). Dans les années 80-90, alors que les LMDS furent le sujet de très nombreuses publications, l'existence des LMDS commença à être controversée, notamment pour des doses faibles et des rayonnements de faible énergie. En effet, en 1987, Ito montra que la probabilité que 2 radicaux hydroxyles radio-induits

surviennent sur des brins adjacents de l'ADN est très faible et requiert des doses de l'ordre du MGy (c'est-à-dire des doses 1 million de fois plus élevées que celles utilisées en radiothérapie !). Autrement dit, *une CDB radio-induite ne peut pas être le résultat de 2 cassures simple-brin (CSB) produites l'une après l'autre* (169, 170). Ainsi, plus de 98% des cassures double-brin de l'ADN (CDB) seraient causées par une peroxydation instantanée des 2 brins. L'hypothèse de l'existence des LMDS ne résista pas non plus à ces calculs : la probabilité de formation de plusieurs types de dommages physiquement induits au même endroit est infime à des doses d'irradiation "raisonnables". En revanche, on peut imaginer que des dommages de l'ADN, notamment des cassures, puissent être créées *pendant* la réparation de certains dommages radio-induits. Les LMDS trouveraient alors une réalité mais à des temps (biochimiques) bien plus tardifs que ce que la physique aurait pu produire.

Les simulations de microdépôts d'énergie dans une cible cylindrique de 2nm de diamètre et de longueur, aléatoirement positionnée dans de l'eau uniformément irradiée montrent que (Fig. 11) :

- la fréquence d'un impact particulaire sur une cible unique est extrêmement faible ( $10^{-6} \text{ Gy}^{-1}$ ) : ainsi, comme on l'a dit plus haut, la probabilité de superposition de 2 trajets est donc négligeable, sauf pour des doses supérieures à  $10^5 \text{ Gy}$ .
- le nombre total de segments d'ADN touchés est très élevé (plus de 10000 par Gy), avec une forte prédominance pour les petits dépôts, chacun correspondant à seulement quelques excitations ou ionisations.
- le nombre des dépôts de densités d'énergie supérieures à  $100 \text{ eV.nm}^{-3}$  correspond au nombre initial de CDB généralement observé (169) ; ce sont des événements rares.
- les dépôts les plus importants sont effectués par des radiations de haut TEL mais la diversité des dommages de l'ADN sur un même site est limitée (171).



**Figure 11.** Représentation schématique de la trajectoire des radiations de faible (ex : rayons X) et haut TEL (ex : ions lourds). Inspiré de (172).

#### *Évènements chimiques et enzymatiques (de $10^{-12}$ à 1 s)*

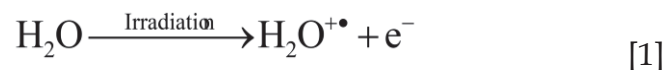
##### *- Effets directs et indirects*

L'une des grandes controverses de la radiobiologie est l'usage des termes "effets directs" et "effets indirects" pour décrire, soit la formation immédiate ou différée de dommages de l'ADN, soit l'influence des molécules d'oxygène dans la formation d'espèces radicalaires. La plupart des "radiobiologistes-physiciens" considèrent comme "directs" (= spontanés) les dommages induits par une particule primaire, et "indirects" (= différés dans le temps) les dommages induits par une particule secondaire (c'est-à-dire résultant de l'interaction entre la matière et la particule primaire). La plupart des "radiobiologistes-chimistes" considèrent les 2 types d'événements décrits précédemment comme spontanés. Alors qu'ils définissent comme "directs" les dommages produits par l'impact direct des particules primaires ou secondaires, ils désignent par "indirects" les dommages produits par la formation d'un radical oxydant lui-même issu de l'impact d'une particule. La confusion liée à l'usage de ces termes est d'autant plus grande que les théories de l'impact de l'oxygène sur la formation des dommages de l'ADN ont été basées sur des expériences réalisées dans des conditions bien peu physiologiques (gaz sous haute pression ou usage d'antioxydants à dose toxique) (173). On notera enfin que les physiciens introduisent plutôt la notion de temps alors que les chimistes considèrent l'origine chimique de l'événement.

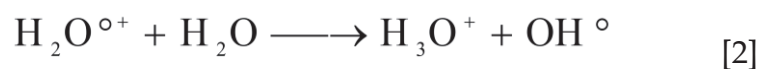
Dans un ouvrage collectif publié en 1991 par l'Organisation du Traité de l'Atlantique-Nord (OTAN), certains spécialistes proposaient déjà de proscrire l'usage des termes d'effets "directs" ou "indirects" car ceux-ci mêlent les descriptions d'événements physiques et chimiques complémentaires et non exclusives (174). Ainsi, dans ce manuscrit, nous avons délibérément choisi d'éviter l'utilisation de ces termes, d'autant plus qu'on sait désormais que les CDB ne peuvent être causées par des mécanismes "en deux temps" (169, 170).

- La radiolyse de l'eau

Les molécules d'eau représentent plus des deux tiers du poids du corps humain. La décomposition de l'eau par les RI est donc à considérer avec attention pour une meilleure compréhension des phénomènes radio-induits. Comme on l'a dit plus haut, l'ionisation d'une molécule d'eau nécessite environ 13 eV (175-178).

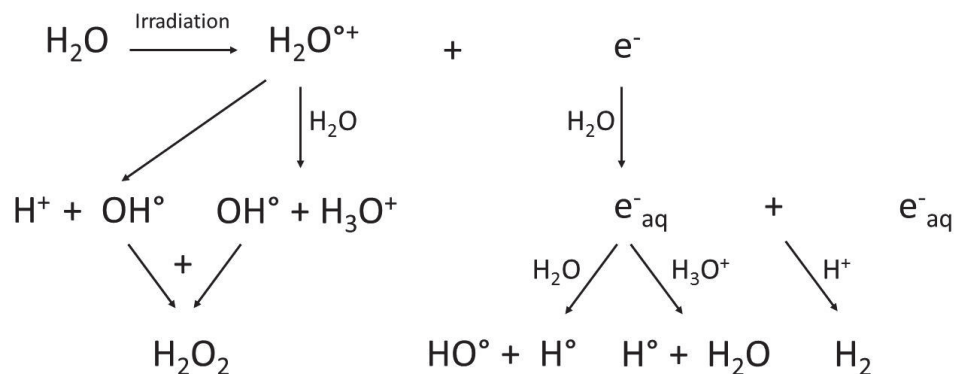


Elle aboutit rapidement à la formation de deux ions radicaux très instables qui donnent ensuite naissance à des radicaux neutres stables. L'ion  $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$  dont la durée de vie est de  $10^{-10}$ s, subit une réaction ion-molécule bien connue en spectroscopie de masse :



La formation de l'ion ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) entraîne une acidification du milieu. Le radical  $\text{OH}^\circ$ , un oxydant très puissant, possède une grande réactivité chimique sur toutes les molécules avoisinantes (oxygène ou organique). Rappelons que le point "°" signifie qu'un électron n'est pas apparié sur la molécule. L'électron formé perd progressivement son énergie cinétique initiale dans d'autres ionisations ou dans des excitations. Lorsqu'il est ralenti en deçà du premier potentiel d'excitation de l'eau ( $\approx 6.6$  eV), les électrons primaires et secondaires produisent des électrons de *sous-excitation* jusqu'à ce qu'ils deviennent *thermalisés* ( $\approx 0.02$  eV). Les électrons thermiques se stabilisent dans le milieu et forment des électrons aqueux et réducteurs très puissants. Ainsi, le résultat des collisions décrites dans la Figure

12, est la présence presque exclusive de  $e^-_{aq}$ ,  $OH^\circ$ ,  $H^\circ$ , et de  $H_3O^+$  dans l'eau qui proviennent de la radiolyse (175-178).



**Figure 12.** Les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.

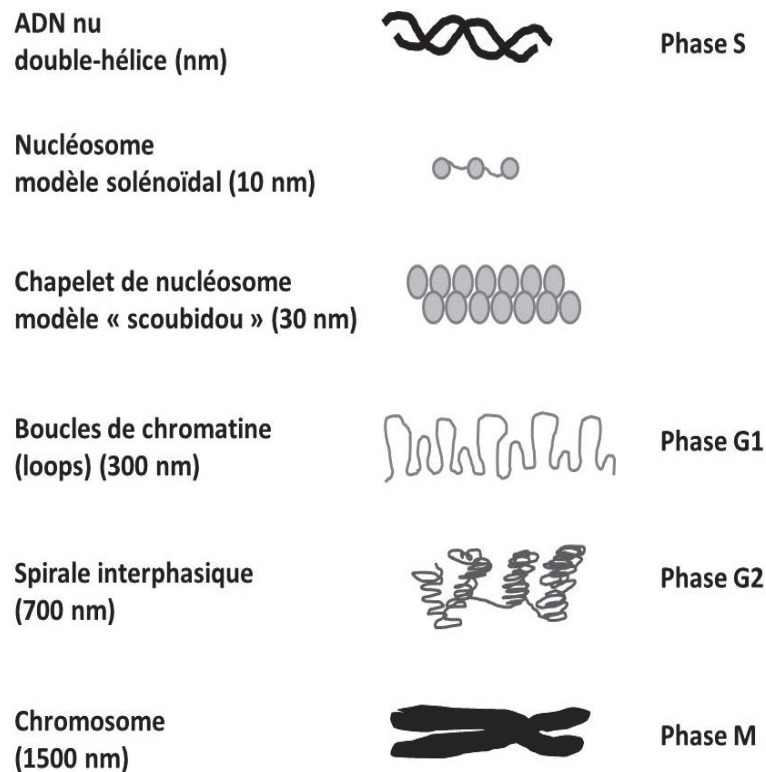
#### *Les différents dommages radio-induits de l'ADN*

##### *- L'ADN et ses différents degrés de compaction*

L'ADN est l'un des constituants essentiels des organismes vivants, représentant plus d'un dixième du poids sec des cellules. Un noyau cellulaire humain moyen d'environ 30  $\mu\text{m}$  de diamètre contient 3 mètres d'ADN. Toutefois, l'ADN n'est pas organisé de la même façon selon la phase du cycle cellulaire. Ainsi, en mitose (phase M), l'ADN est sous forme chromosomique, le plus haut degré de compaction alors qu'en phase de synthèse (S), l'ADN est sous la forme d'une double hélice telle qu'elle a été décrite par Watson et Crick : celle-ci constitue le degré de compaction le moins élevé. Au cours du cycle cellulaire, la double-hélice s'enroule sur des protéines cylindriques appelés histones pour former le "collier de perles" ou modèle solénoïdal. Puis, l'ADN s'enroule encore sur lui-même pour former un "scoubidou". Une fois tenu par des protéines d'attachement de la matrice nucléaire (*Matrix attachment region (MAR) proteins*), l'ADN est formé de boucles qui occupent le maximum d'espace dans le noyau.

C'est ce degré de compaction que l'on retrouve dans les cellules quiescentes (en phase G0/G1), c'est-à-dire dans la très grande majorité des cellules de notre corps (à l'exception de l'épithélium intestinal). Il est à d'ailleurs à noter que *même pour les enfants, la majorité des cellules sont en phase G0/G1* : c'est seulement lors du développement embryonnaire (passage embryon/fœtus) que cette proportion devient minoritaire au profit des cellules en synthèse ou en mitose. De même, à l'éventuelle exception de certaines métastases, la quasi-totalité

des tumeurs, même proliférantes, contiennent une majorité de cellules en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Ainsi, en dehors de l'intestin, le modèle le plus représentatif pour étudier la réponse aux radiations reste bien les cellules quiescentes. Suivant le degré de compaction (et donc la phase du cycle cellulaire), l'endommagement pour une même dose de radiation n'est pas le même et donc la réponse aux radiations dépend de la phase du cycle cellulaire (Fig. 13) (cf. § 1.2.1.3).



**Figure 13.** Les différents degrés de compaction de l'ADN, les dimensions moyennes et la phase dans du cycle cellulaire dans laquelle on les rencontre le plus souvent.

- Dépôts d'énergie et sévérité des dommages

Lors de leur développement, les cellules font face à des dommages de l'ADN qu'elles peuvent créer elles-mêmes. C'est le cas notamment des cassures de l'ADN en phase S, des cassures chromosomiques lors de la mitose ainsi que de certaines cassures spécifiques lors de la production des immunoglobulines (recombinaison V(D)J) (179). De plus, certains agents physiques ou chimiques, dits *génotoxiques* (UV, RI, drogues chimiothérapeutiques) sont à l'origine de plusieurs types de dommages de l'ADN. Comme on l'a vu plus haut, les RI produisent de larges spectres de dépôts d'énergie. Par les excitations et les ionisations qu'ils induisent dans la matière, les microdépôts d'énergie sont donc la cause de la formation

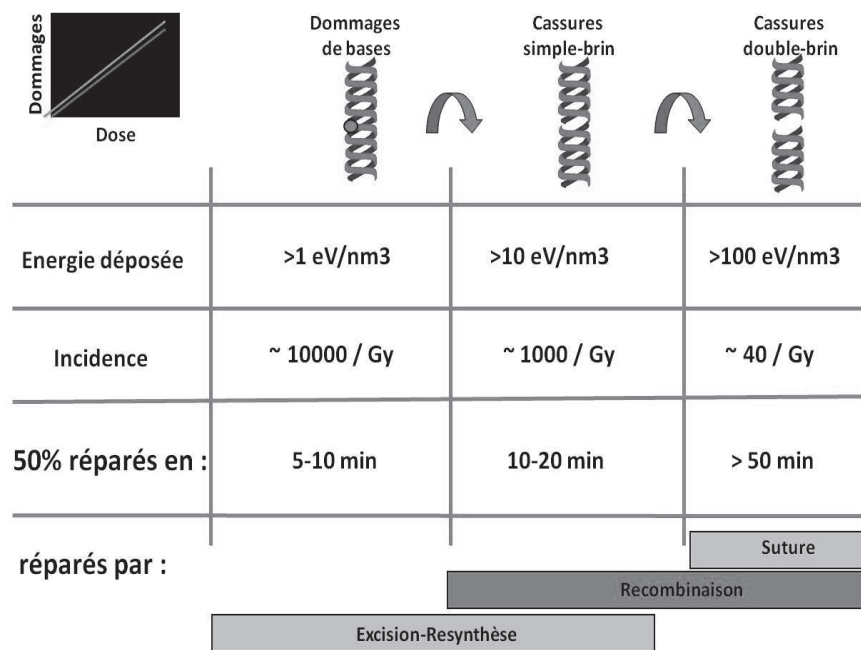
d'une grande diversité de radicaux libres, eux-mêmes à l'origine de la formation d'une grande diversité de lésions de l'ADN (180, 181).

Les principaux dommages de l'ADN induits par les RI sont les dommages de bases (DB), les cassures simple-brin (CSB) et les cassures double-brin (CDB). La présence de ces dommages radio-induits peut avoir des conséquences très différentes selon leur nature (182) :

- il se produit environ 1000 à 10000 DB par Gy pour une irradiation X ou gamma (183). Leur réparation est rapide et généralement exécutée en moins de quelques minutes. Le mode de réparation prédomine selon la nature du DB : les adduits sont réparés par excision-resynthèse (ou NER pour *nucleotide excision repair*), les mésappariements par *mismatch repair* (MR), et les alkylations par réversion directe (DR) (184).
- les CSB représentent environ 1000 dommages par Gy pour une irradiation X ou gamma (183). Leur réparation est exécutée en quelques dizaines de minutes par des processus d'excision-resynthèse (ou BER pour *base excision repair*) et de recombinaison (184).
- les CDB sont plus rares, de l'ordre de 40 par Gy pour une irradiation X ou gamma (183). Les CDB non réparées peuvent conduire, dans certains cas, à la perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone altérée (185), et potentiellement à la mort radiobiologique de la cellule (cf. § I.2.1.4).

À partir des études évoquées précédemment (169, 170), un parallèle a été établi entre la nature biochimique des lésions radio-induites de l'ADN et les microdépôts d'énergie. Les DB (1000 à 10000 par Gy) sont avec les CSB (1000 par Gy), les événements biochimiques radio-induits les plus fréquents : on estime à 1-10 eV.nm<sup>-3</sup> l'énergie nécessaire pour créer un DB et 10-100 eV.nm<sup>-3</sup> pour une CSB. Les pontages ADN-protéines (150 par Gy) et surtout les CDB (40 par Gy par cellule humaine diploïde de type fibroblastique) sont des événements plus rares (185). Pour créer une seule CDB, il faut plus de 100 eV.nm<sup>-3</sup> environ. Ainsi, la nature biochimique des lésions de l'ADN dépend de la densité d'énergie des microdépôts induits par les RI (186) (Fig. 14).





**Figure 14.** Les différents types de dommages radio-induits et leurs caractéristiques physiques, biochimiques et biologiques (cours de N. Foray).

Alors que les RI produisent un large spectre de dommages de l'ADN de réparabilité différente, la nature des mécanismes de réparation et le rythme avec lequel ils sont réparés font que de nombreux autres dommages sont créés *après l'irradiation pendant* la réparation, comme on l'a dit plus haut. En particulier, les DB, excisés après reconnaissance par la voie d'excision-resynthèse, se transforment en CSB : quelques minutes après la fin de l'irradiation, un nombre non négligeable de CSB apparaît dans les cellules. Si un trop grand nombre de CSB est produit et qu'elles sont opposées à moins de 40 paires de bases de distance, alors une CDB peut être formée (187).

#### - La phase d'induction des CDB

L'induction des CDB par les RI est considérée comme spontanée à l'échelle des temps biologiques. Leur nombre est limité par la taille du génome (cible = noyau) et par l'énergie nécessaire pour induire au moins une CDB. Le nombre de CDB radio-induites ne dépend pas de la radiosensibilité individuelle. Le nombre de CDB physiquement induites par les rayons X (ou gamma) immédiatement après l'irradiation (donc sans effet de réparation), est linéairement dépendant de la dose avec une valeur d'environ 40 ( $37 \pm 5$ ) CDB par Gy par fibroblaste diploïde humain quiescent et non-transformé (188, 189). Ce taux d'induction de CDB dépend de la taille du noyau, de la condensation de la chromatine, du TEL des

radiations utilisées et des conditions biochimiques dans lesquelles a été faite la mesure (190). Par exemple, le nombre de CDB par Gy est réduit à quelques CDB pour 100 Gy dans les levures et les bactéries et à 20 CDB par Gy pour des lymphocytes humains, ce qui correspond à une loi globalement proportionnelle au volume de la cellule quelle que soit l'espèce.

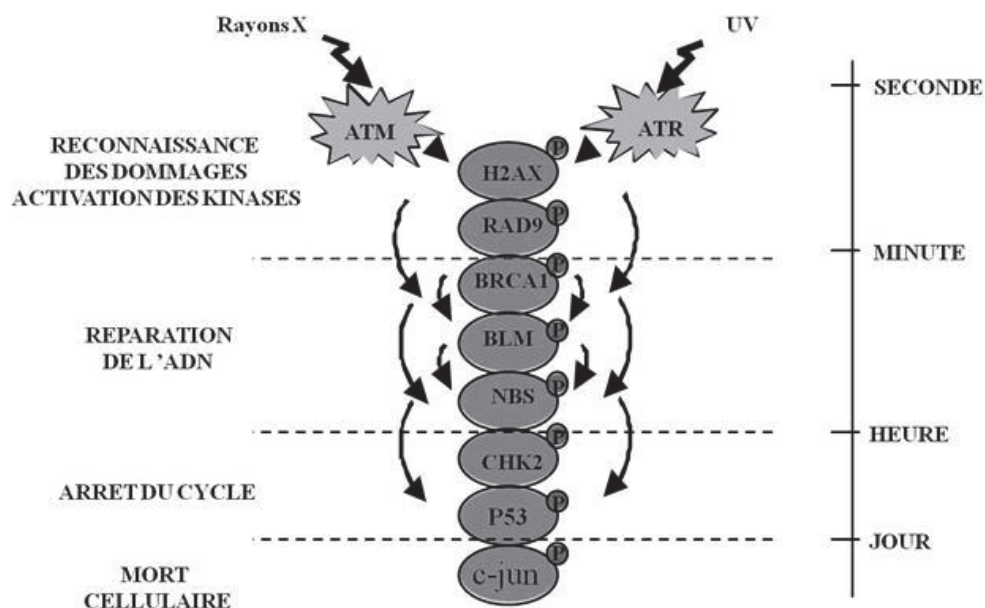
### ***1.2.1.2. Reconnaissance et quantification des CDB***

#### *Reconnaissance des CDB*

La phase de reconnaissance des CDB : pendant cette phase, le nombre de CDB reconnues par les systèmes de réparation augmente jusqu'à atteindre une valeur maximale à un rythme, une valeur et un temps post-irradiation qui dépendent de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel.

L'oxydation qui crée les dommages de l'ADN induits par les RI déclenche une cascade de phosphorylations liées de façon causale entre elles et ordonnées temporellement. Ces phosphorylations jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des dommages, leur réparation, le retard du cycle, le déclenchement de la mort cellulaire, ainsi que dans le maintien de la stabilité génomique (191). Pour rappel, les réactions de phosphorylation, qui correspondent à l'adjonction d'un groupement phosphate ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) de l'ATP à une autre molécule, sont catalysées par des phosphotransférases, dont les protéines kinases.

Dans les années 2000, les observations sur des mutations successives de protéines substrats de phosphorylation des protéines ATM et ATR ont permis d'établir une hiérarchie temporelle et fonctionnelle entre les phosphorylations : si un substrat en amont n'est pas phosphorylé, le substrat qui aurait dû être phosphorylé en aval immédiatement après lui ne le sera pas et cette absence de phosphorylation aura une conséquence fonctionnelle précise. Ainsi, en mutant un des substrats, ou en empêchant sa phosphorylation, on peut vérifier sa place dans la hiérarchie fonctionnelle et ordonnée des phosphorylations radio-induites (191) (Fig. 15).



**Figure 15.** Hiérarchie des événements après un stress génotoxique dépendant d'ATM ou d'ATR (Cours de N. Foray).

Les protéines kinases ATM et ATR jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et dans les phosphorylations radio-induites (192, 193). Ces kinases sont activées différemment : ATM réagit au stress oxydatif qui provoque l'induction des CDB, alors qu'ATR s'active en réponse à d'autres formes de dommages de l'ADN tels que ceux observés dans les fourches de réplifications bloquées (192, 194).

Lors de l'activation des sérine-thréonine kinases ATM ou ATR (193, 195), des résidus SQ (sérine + glutamine) ou TQ (thréonine + glutamine) sont phosphorylés (pour la kinase DNA-PK ce sont les résidus SQE/TQE, E étant l'acide glutamique). Or, il se trouve que le variant X de l'histone H2A, un des principaux supports de l'ADN, porte de tels résidus (196-198). La phosphorylation de ces résidus par les sérine-thréonine kinases fait partie des événements les plus précoces qui suivent la formation physique des CDB. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de l'histone H2AX ( $\gamma$ H2AX), montre la présence de nombreux *foci* dans le noyau des cellules irradiées. Il existe une étroite corrélation entre le nombre de *foci*  $\gamma$ H2AX et le nombre de CDB induites après irradiation (199, 200). Une corrélation directe a été observée entre le nombre de *foci* et le nombre de CDB produites par la désintégration de  $^{125}\text{I}$  incorporé dans l'ADN de cellules, démontrant que chaque *focus* représente une cassure et que chaque CDB forme un *focus* (201).

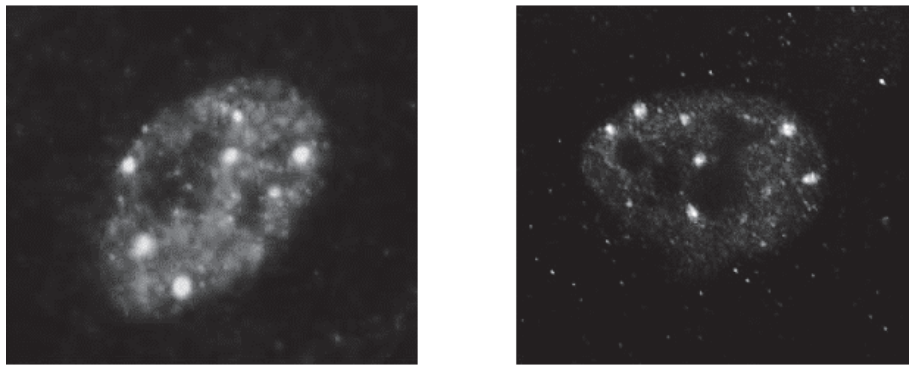
Il est aussi important de noter que la phosphorylation de H2AX est étroitement liée à la reconnaissance des CDB qui seront réparées par un mode très spécifique : la réparation *par suture*. Comme la suture est le mode de réparation très majoritaire chez les mammifères et les cellules quiescentes (état très majoritaire des cellules humaines), il est logique d'observer avec les foci  $\gamma$ H2AX la totalité des CDB radio-induites. Il faut donc aborder aussi la notion de réparation des dommages de l'ADN pour mieux comprendre la forme de la relation dose-effet.

#### *Techniques de quantification des CDB*

Plusieurs méthodes ont été développées depuis les années 70 dans le but de quantifier le nombre de CDB. Jusque dans les années 2000, les CDB étant "des trous dans l'ADN", les techniques eurent toutes en commun le fait de ne jamais mesurer directement les CDB, mais plutôt des fragments d'ADN à travers leurs propriétés mécaniques et électrophorétiques ou par le degré de relaxation de la chromatine que ces cassures peuvent produire. Le calibrage (c'est-à-dire la déduction du nombre réel de CDB à partir des données expérimentales) se faisait généralement grâce à de l'ADN marqué radioactivement avec de l' $^{125}\text{I}$ . En effet, chacune des cascades Auger produites donne une énergie suffisante pour former une seule CDB (202-204). Toutefois, le point faible de la plupart de ces méthodes est le fait de nécessiter des doses importantes (plusieurs dizaines de Gy) pour obtenir un grand nombre de fragments pour pouvoir mesurer un signal, alors qu'il suffit de quelques Gy pour induire la létalité cellulaire (205). La connaissance du lien entre la dose et l'effet apparaît donc cruciale.

L'immunofluorescence est la technique la plus utilisée actuellement. Elle est basée sur l'hybridation de sondes fluorescentes avec des anticorps dirigés contre des protéines d'intérêt. C'est notamment le cas pour les protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des CDB, comme on le verra pour pATM (formes phosphorylées de la protéine ATM) et  $\gamma$ H2AX (formes phosphorylées du variant H2AX de l'histone H2A) qui se relocalisent de façon ponctuelle en formant des foci lumineux sur les sites de ces cassures (Fig. 16) (200). Alors que la plupart des foci nucléaires sont quantifiables pour des doses de l'ordre du Gy, la limite de cette technique se trouve à la fois dans la difficulté du comptage des foci pour des doses élevées mais aussi dans les artéfacts de la fluorescence. De plus, des

artéfacts spécifiques ont été observés dans le cas de la co-immunofluorescence : quand deux couleurs sont utilisées, on observe souvent une superposition des foci qui suggère une co-localisation des protéines. Pourtant, une telle superposition est principalement causée par les chevauchements des spectres d'émissions et d'excitation des marqueurs de protéines utilisés. Cet artéfact de co-immunofluorescence appelé en anglais *bleed-through* est à l'origine de nombreuses fausses interprétations (206).



**Figure 16.** Exemple d'immunofluorescence par marquage avec un anticorps anti- $\gamma$ H2AX. Chaque foci reflète un site de CDB (données du laboratoire).

### 1.2.1.3. Réparation des CDB

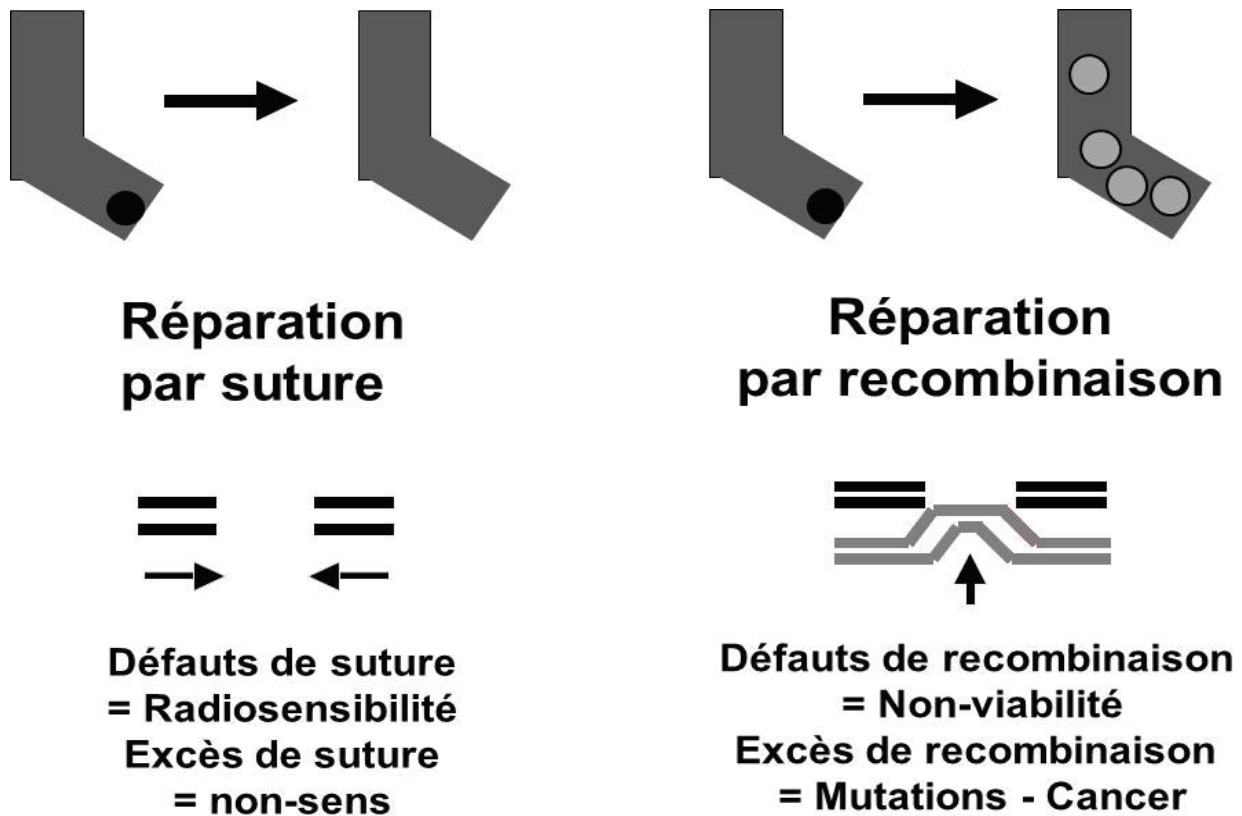
Pendant la phase de réparation des CDB, le nombre de CDB diminue jusqu'à une valeur résiduelle, à un rythme qui dépend de plusieurs paramètres tels que la dose et le facteur individuel.

Pour les mammifères, il existe deux modes de réparation des CDB :

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

Les cellules de mammifères sont en grande majorité dans la phase G0/G1. Ainsi, la prédominance de la réparation par suture, principalement active en G0/G1, en fait une spécificité des mammifères. Par ailleurs, cette dualité de voies de réparation peut être illustrée par "le modèle dit de la chaussette" : « *comme le raccommodage des chaussettes, 2 techniques sont possibles pour réparer l'ADN : la suture, qui consiste à rapprocher les brins cassés et les lier ; et le rapiéçage (ou recombinaison) qui consiste à insérer un brin coupé dans le trou formé par la première cassure. Ce mode de réparation produit donc 2 autres cassures. C'est donc un mode de réparation qui casse* » (207). Le modèle de la chaussette permet de mieux comprendre les

conséquences cliniques de non-réparation ou de mauvaise réparation suivant le mode de réparation choisi (Fig. 17).



**Figure 17.** Représentation du "modèle de la chaussette". Une CDB est soit suturée (sans échange de brins), soit "rapiécée" (recombinée, avec échange de brins). Les conséquences cliniques des défauts ou des manques de contrôle des 2 modes de réparation sont précisées. La recombinaison s'accompagne souvent de l'induction d'autres cassures, elles-mêmes subissant la recombinaison (phénomène d'hyper-recombinaison) (207).

#### La réparation par recombinaison homologue

La réparation par recombinaison consiste à remplacer la séquence endommagée par une séquence d'ADN prise "au hasard". En fait, dans le cas de la mitose, au moment où des régions chromosomiques sont bien définies, ou dans le cas des petits génomes, cette séquence peut être identique et homologue (RH, *recombinaison homologue*) (208). Dans le cas inverse (non-homologue), on parle alors de recombinaison illégitime ou *non-homologue* (209). La reconnaissance des CDB réparées par recombinaison est assurée par les anneaux heptamériques Rad52 qui coulisent le long de l'ADN. Une fois l'anneau proche de la cassure, la protéine Rad51 est recrutée et forme un nucléofilament qui rapproche les brins homologues (ou non-homologues) près du site de réparation. La formation de ce nucléofilament met en jeu une multitude de protéines comme les protéines RPA (*Replication*

*Protein A*), XRCC2 et XRCC3 ainsi que les protéines BRCA1 et BRCA2 (Fig. 18). Cependant, les étapes exactes suivant la reconnaissance des CDB par Rad52-Rad51 sont encore méconnues dans les cellules humaines (210).

Alors que l'absence de toute recombinaison homologue est létale chez les mammifères (non-viabilité), il a été montré qu'un manque de contrôle de la recombinaison pouvait contribuer à une forte instabilité génétique : c'est l'*hyper-recombinaison* (211, 212). Par ailleurs, la surexpression de Rad51 a été observée dans de nombreuses cellules tumorales induisant un fort taux de recombinaison. Les aberrations chromosomiques typiques d'un manque de contrôle de la recombinaison sont les translocations, souvent associées à différents types de cancer (192).

#### *La réparation par suture NHEJ*

Pour les cellules de mammifères, la réparation par suture (non-homologous end-joining [NHEJ]) est le principal système de réparation des CDB. La protéine Ku80 s'associe à la protéine Ku70 (213), et cet hétérodimère coulisse le long de l'ADN. Au niveau de la cassure, il recrute la protéine DNA-PKcs. Ces trois protéines forment le complexe DNA-PK, qui a une fonction de kinase essentielle dans le processus de réparation NHEJ : cette kinase phosphoryle certaines protéines *histones*. Les protéines de réparation (Ligase 4 et XRCC4) sont ensuite recrutées pour liguer les deux extrémités de l'ADN (Fig. 18). Les erreurs chromosomiques typiques d'un défaut de suture NHEJ sont généralement des délétions qui peuvent être associées à une forte radiosensibilité et une immunodéficiences sévère (214). Ce modèle très populaire oublie de façon surprenante la protéine ATM alors que celle-ci est requise dès les premières minutes de l'irradiation. D'ailleurs, la mutation de DNA-PK n'entraîne un changement de rythme de réparation qu'à partir de la première heure alors que la mutation d'ATM concerne tous les temps de la cinétique de réparation (190, 215).

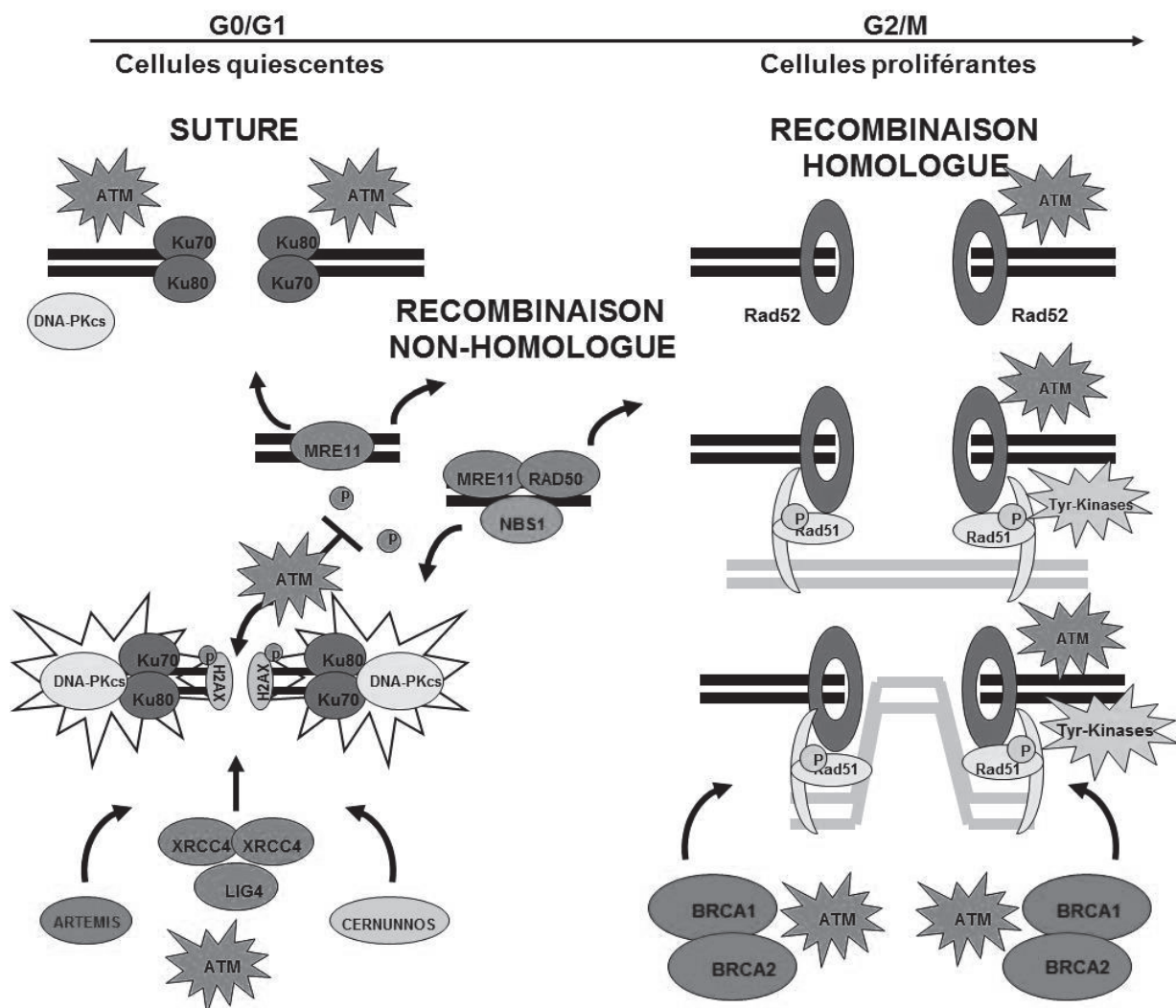
#### *Le paradigme actuel de la réparation des CDB*

Une fois ces principes généraux énoncés, il faut évoquer les aspects historiques liés à ces 2 modes de réparation. En effet, prône aujourd'hui une *vision duale* qui oppose la recombinaison homologue de la suture non-homologue. Pour expliquer ce paradigme, un rappel sémantique s'impose. La recombinaison est le premier mode de réparation qui a été

mis en évidence, très probablement parce que les données sur les bactéries et les levures étaient plus abondantes que celles issues des cellules humaines et que les micro-organismes se prêtaient mieux aux manipulations génétiques.

Pour ces micro-organismes caractérisés par un petit génome et toujours en prolifération intense (donc avec une phase G2/M prépondérante), la recombinaison est plutôt *homologue* et possède une forte probabilité d'être fidèle car les séquences échangées seront moins variées (190, 216).

Dans les années 1980, quand la réparation par suture fut mise en évidence, la recombinaison homologue était si présente dans les esprits que le terme suture fut affublé de l'adjectif *non-homologue*. Pourtant la notion d'homologie des brins n'a pas de sens en G0/G1 (que signifierait "suture homologue" ?). Cette dualité recombinaison homologue/suture non-homologue constitua alors le seul paradigme possible pendant des années (217).



**Figure 18.** Principales voies de réparation des CDB (Cours de N. Foray).



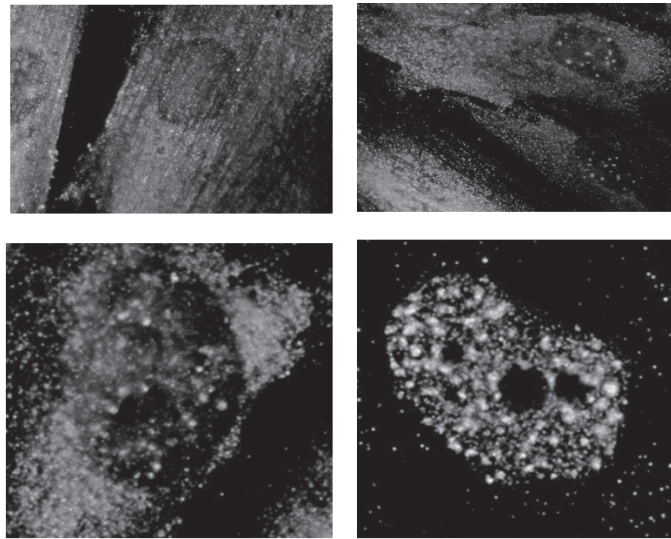
Toutefois, la NHEJ tout comme la RH ne pouvaient expliquer la propagation des erreurs et la transformation cellulaire liée à une mauvaise réparation si ces deux modes étaient considérés comme fidèles. En effet, une telle vision excluait l'existence d'un troisième mode de réparation, une recombinaison qui s'effectuerait au hasard, ou du moins avec un échange de brins d'une grande variété, tout-à-fait possible en G0/G1 par l'action de nucléases. Notre modèle a intégré cette remarque importante (190, 216, 218) et nous y reviendrons dans les chapitres suivants.

#### *Rôle de la protéine ATM dans la réponse aux dommages de l'ADN*

Le rôle de ATM a été mis en évidence à partir de 1995, année de la découverte de la mutation du gène ATM causant l'ataxie télangiectasique (AT), syndrome associé à une hyper-radiosensibilité et une forte prédisposition au cancer (219). ATM est présente sous forme de dimères dont les monomères se phosphorylent mutuellement. On parle d'*autophosphorylation* alors que ce terme est impropre et devrait être remplacé par *trans-phosphorylation*. L'induction des CDB a été reliée à la dissociation des dimères d'ATM sous forme de monomères (220). C'est également ainsi que la protéine ATM serait activée. En particulier, ATM phosphoryle la protéine NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome) qui fait partie du complexe MNR (Mre11/NBS/Rad50) présent au niveau des sites de dommages. La phosphorylation de NBS stabiliserait le complexe MNR et permettrait le recrutement de molécules ATM supplémentaires au niveau du dommage (221). Le complexe MNR augmenterait ainsi l'activité kinase d'ATM "par rétro-contrôle" (feed-back) (222). ATM ainsi suractivée interviendrait au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire, en phosphorylant un grand nombre de substrats, comme les protéines de checkpoint Chk1 et/ou Chk2 (Checkpoint kinase 1 ou 2) et la protéine p53. De nombreux modèles d'action d'ATM comme celui-ci ont déjà été établis. Toutefois, ceux-ci sont généralement basés sur des cellules transformées, sans réelle recherche d'un lien quantitatif avec la dose de radiation en particulier ou de stress génotoxique en général. Ils ont également été établis à partir d'immunoblots effectués sur des extraits protéiques "totaux" c'est-à-dire mêlant cytoplasme et noyau et dans des conditions de stress souvent irréalistes (217). Nous nous proposons donc dans cet ouvrage de ne retenir que les conclusions dépourvues, dans la

mesure du possible, de tout artéfact technique ou de conditions expérimentales qui correspondent à la réalité clinique.

En 2015, il existait un consensus ou plutôt un paradigme concernant la localisation de la protéine ATM : celui de la considérer comme nucléaire, simplement parce que le rôle de cette kinase est majeur dans la réparation des CDB de l'ADN et plus généralement dans la réponse au stress génotoxique (223, 224). Ce paradigme faisait écho à celui qui considérait que la radiosensibilité trouvait ses causes dans les défauts de réparation de l'ADN. Pourtant, aucune publication sur des extraits uniquement nucléaires ou des observations par immunofluorescence ne venait consolider ce paradigme. En d'autres termes, sans preuve expérimentale, la plupart des chercheurs considéraient la localisation cytoplasmique de ATM en immunofluorescence comme non-spécifique ou artéfactuelle (Fig. 19). Quelques études avaient pourtant montré qu'ATM se trouvait majoritairement dans le cytoplasme de certaines cellules, notamment dans les cellules de cervelet humain et des souris Purkinje (225, 226). Mais ces travaux étaient peu cités. De plus, chez les patients souffrant d'AT, certains traits sont liés à des fonctions cytoplasmiques : le niveau élevé de facteurs de croissance (227), l'insulino-résistance (228), la modification du cytosquelette (229), le déficit de l'immunité humorale (230), les modifications de la régulation des canaux K<sup>+</sup> (231). Là encore, jamais ces observations cliniques ne venaient troubler l'hypothèse "nucléaire" d'ATM. D'ailleurs, si des formes d'ATM sont cytoplasmiques, il faut aborder la possibilité que celles-ci puissent passer dans le noyau, en réponse ou non à un stress. Ainsi, certaines études se focalisèrent sur un mode de transport actif impliquant des séquences de localisations nucléaires (site NLS pour Nuclear Localization Sites) portés par ATM, et qui seraient responsables du transit cyto-nucléaire de la kinase (232). Là encore, il n'existait aucun consensus sur un éventuel passage de ATM du cytoplasme au noyau et encore moins sur son mode d'action : en fait, les NLS s'avérèrent de piètres indices pour les radiobiologistes car ils restent intacts après irradiation, suggérant que la notion de transit cyto-nucléaire radio-induit doit impliquer d'autres processus actifs.



**Figure 19.** Images d'immunofluorescence avec un anticorps anti-pATM sur des fibroblastes cutanés. On observe notamment une partie importante de marquage cytoplasmique (Données du laboratoire).

#### *1.2.1.4. Mort ou survie cellulaires*

##### *Prédominance des CDB dans la létalité cellulaire*

En dépit du fait que les CDB sont les dommages radio-induits de l'ADN les plus rares, elles sont les événements-clés de la létalité cellulaire. Ce lien privilégié entre CDB non-réparées et mort cellulaire peut être illustré par au moins trois arguments :

- chez les bactéries comme chez les levures, une CDB résiduelle est létale (203). Par exemple, la souche rad 54-3 qui répare les CDB à 23°C est radiorésistante quand elle est irradiée à cette température. A l'inverse, incapable de réparer les CDB à 36°C, cette souche devient alors 100 fois plus radiosensible (185).
- dans la période 1980-2000, une déficience de réparation des CDB a été observée pour plusieurs lignées cellulaires humaines. Ce fut le cas des lignées ATM<sup>-/-</sup> (233, 234), de la lignée fibroblastique 180BR qui provient d'un patient leucémique radiosensible LIG4<sup>-/-</sup> (235), des lignées tumorales DNA-PK<sup>-/-</sup> M059J (236), BRCA1<sup>-/-</sup>HCC1937 et BRCA2<sup>-/-</sup> Capan-1 (237) : les taux de CDB résiduelles à 24 h sont de l'ordre de 40% alors qu'ils ne sont plus mesurables chez les témoins. Ces quatre lignées déficientes pour la réparation des CDB sont hyper-radiosensibles (survie à 2 Gy de l'ordre de 1 à 5%). Enfin, en 2008, une étude systématique de 8 syndromes humains radiosensibles majeurs a montré qu'il existe une relation entre le taux de CDB non réparées et la radiosensibilité (189) : les syndromes génétiques liés à un défaut de réparation des CDB étant systématiquement associés à une radiosensibilité (238).

- une CDB non réparée conduit à une cassure chromosomique puis à un micronoyau si celle-ci n'est pas réparable. Or, il existe une relation quantitative entre les cassures chromosomiques et micronoyaux et la létalité cellulaire (239).

À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la plupart des types de morts cellulaires était connue, grâce aux pionniers, qui patiemment décrivent avec force détails ce qu'ils observaient au microscope (240, 241). Ainsi, on ne parlait pas de "la" mort cellulaire mais bien "des" morts cellulaires. Avec l'usage des rayons X, s'est posée la question des spécificités de chaque type de morts et de leur contribution relative à la mort globale en fonction de la dose de radiation. Comme on le verra plus loin, il existait peu de points communs entre ces morts à l'exception d'une notion fondamentale : l'arrêt de prolifération, ou plutôt l'arrêt de la clonogénicité, c'est-à-dire la capacité à donner des cellules-filles. La mort radiobiologique d'une cellule fut donc définie *par convention* par la *perte définitive de sa capacité de division*. Ainsi, une cellule rendue stérile par l'irradiation est considérée comme morte. Cette définition entraîne des conséquences importantes :

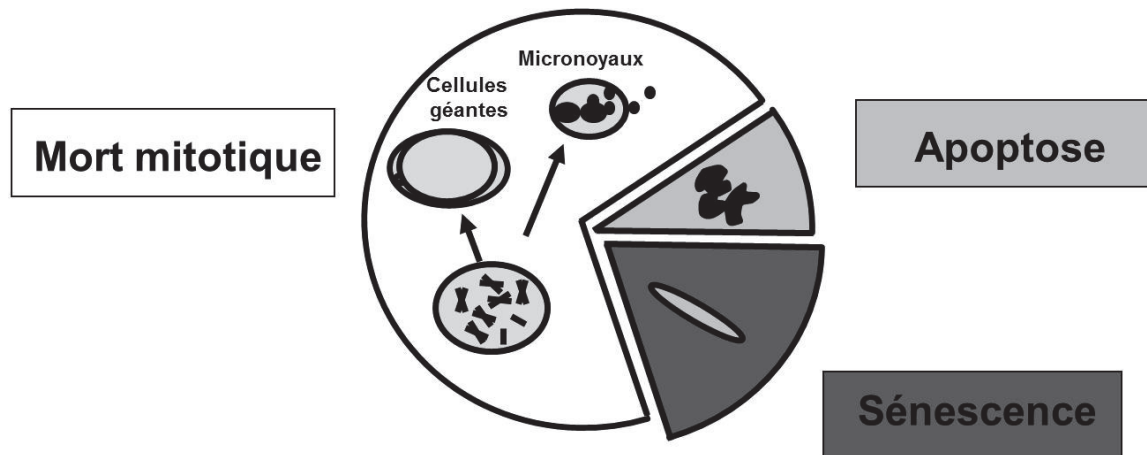
- on oublie souvent qu'une cellule "condamnée à mort" peut, avant sa disparition physique, continuer à *métaboliser* et notamment à *réparer* les dommages induits dans l'ADN (190). Par exemple, après des doses 4 à 20 fois supérieures à la dose létale moyenne, les cellules sont mortes (stérilisées) mais réparent leur ADN (188). En effet, la notion de mort est définie à l'échelle de la cellule, alors que la réparation, qui peut s'effectuer dans un tube à essai contenant, eau, sels, protéines et ADN, est une *notion moléculaire* (la mort "moléculaire" refléterait ici la destruction des protéines et de l'ADN).
- cette définition convient bien à la radiothérapie anti-cancéreuse qui tente de stopper définitivement la prolifération de la tumeur, sans pour autant exiger une disparition physique immédiate. En effet, une tumeur, contrainte dans son volume pendant un certain temps, peut montrer des signes de destruction et disparaître. A l'inverse, des cellules mortes peuvent poursuivre quelques cycles cellulaires et stopper ensuite définitivement leur croissance : c'est le cas des *clones abortifs* qui montrent l'aspect de petites colonies. Il a fallu définir la notion de "colonie". Par convention, on considère qu'une colonie est le résultat d'au moins 50 cellules filles, c'est-à-dire qu'elle a été produite par au moins 5 doublements ( $2^5 = 32$  ;  $2^6 = 64$ ) (178).

La perte de capacité de division est la conséquence de plusieurs types de réponses aux RI. En effet, trois types de morts radio-induites *définies fonctionnellement* ont été répertoriés : la mort mitotique, la mort par sénescence et la mort apoptotique :

- **La mort mitotique** : Le fragment chromosomique issu d'une cassure de l'ADN est soumis aux mêmes phénomènes d'aspiration que les chromosomes entiers. Cependant, si le fragment ne porte pas de centromère (il est dit *acentrique*), il est expulsé du noyau sous la forme d'un *micronoyau* (c'est l'*exonucléose*). Il peut rester dans le cytoplasme un certain temps, voire pendant un ou deux cycles et subir, comme le noyau principal, les condensations/décondensations de la chromatine suivant les phases du cycle. L'*exocytose* du *micronoyau* est la dernière étape de ce phénomène appelé *mort mitotique*. La mort mitotique est considérée comme le type de mort radio-induite le plus répandu. Le nombre de micronoyaux augmente linéairement avec la dose. Il a été corrélé à l'effet létal des radiations ionisantes (205, 242) (Fig. 20).
- **L'apoptose** : L'*apoptose* est une mort dite *programmée* déclenchée par une CDB non réparée (243). Elle se traduit par une libération d'endonucléases qui digèrent massivement l'ADN (244, 245). L'apoptose requiert généralement une protéine p53 fonctionnelle (246). Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent *en interphase* (G1, G2) (Fig. 20).
- **La sénescence** : Plus récemment encore, l'*arrêt irréversible en G1* a été décrit lui aussi comme une cause de mort radiobiologique (247). L'arrêt irréversible en G1 est également associé à une CDB non réparée et dépend de p53 mais surtout de p21 (248). A l'inverse de l'apoptose, il est abondant chez les fibroblastes témoins (en moyenne, 67% de cellules sont définitivement arrêtées avec une dose de 4 Gy) et il est compatible avec une existence prolongée de la cellule (on la compare souvent à une forme de vieillissement, la *sénescence*) (Fig. 20).

On peut ajouter à cette liste un quatrième type de mort, l'*intercinèse*, qui décrit la disparition physique quasi-immédiate de la cellule après des doses de radiations de plusieurs milliers de Gy, doses à partir desquelles l'effet thermique des radiations devient dominant. D'autres termes de mort cellulaire (comme l'*oncosé* ou la *pyknose*) ont été définis

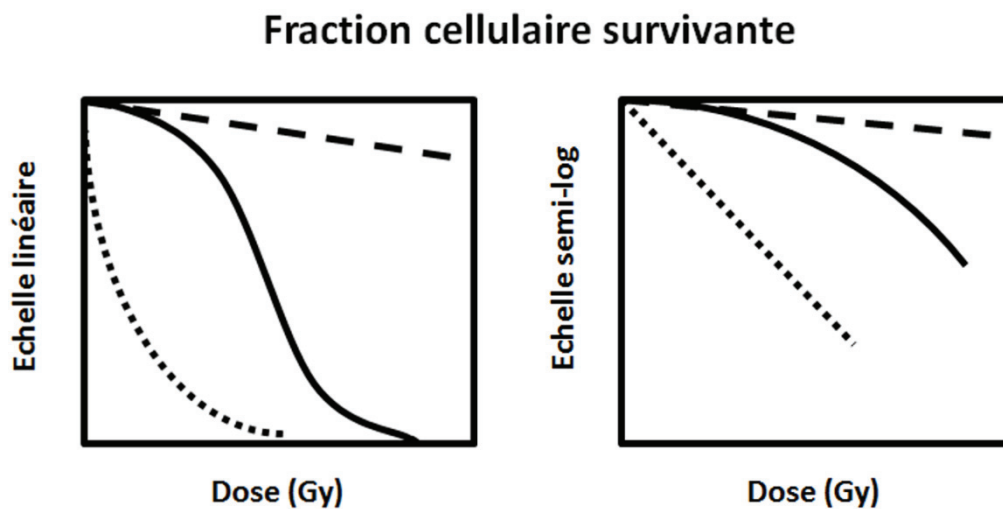
après observation au microscope et correspondent plutôt à des états particuliers des morts précédentes, notamment au niveau des tissus plutôt qu'au niveau de cellules individuelles. L'autophagie (249) ainsi que l'ontose (250) sont également citées mais la fréquence de ces types de mort pour des doses de radiations "raisonnables" semble bien inférieure aux trois types de morts précitées.



**Figure 20.** Représentation schématique de la contribution relative des différents types de mort cellulaire dans une population de cellules non-lymphocytaires et en croissance exponentielle après irradiation. La mort par sénescence serait majoritaire si les cellules étaient irradiées en quiescence.

#### *Le test de clonogénicité : technique de référence en radiobiologie*

La définition de la mort cellulaire est à la base du test de référence de la radiobiologie : la *méthode des colonies* ou *test clonogénique*. Ce test consiste à irradier un nombre connu de cellules puis à en quantifier les colonies issues des cellules filles (en respectant la définition des colonies expliquée plus haut) (251). Plus les colonies sont nombreuses, plus la cellule est radiorésistante. Les courbes de survie sont représentées dans un graphe semi-logarithmique et illustre la relation dose (abscisse linéaire) - survie (ordonnée logarithmique) (Fig. 21).



**Figure 21.** Représentation schématique de la survie clonogénique en fonction de la dose de radiation en utilisant l'échelle semi-logarithmique ou linéaire. La courbe en pointillés représente une lignée radiosensible, la courbe en traits représente une lignée radiorésistante.

En 1956, Puck et Marcus proposèrent d'utiliser le test *in vitro* des colonies pour quantifier la radiosensibilité. Les premiers tests clonogéniques *in vivo* furent proposés par H.B. Hewitt et C.W. Wilson (252). Comme on le verra dans les prochains chapitres, chaque lignée cellulaire est caractérisée par une seule réponse propre ou *radiosensibilité intrinsèque* (253).

La relation entre la survie clonogénique  $S$  et la dose  $D$  de radiation est l'une des formules mathématiques les plus importantes de la radiobiologie. Depuis les années 1970, elle est décrite comme l'exponentielle négative d'un polynôme du second degré par la formule suivante :

$$S(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad [3]$$

où  $\alpha$  et  $\beta$  sont des variables d'ajustement.

Un rapport  $\alpha/\beta$  élevé ( $> 5$  Gy) signe classiquement une sensibilité à une forte dose totale et serait vecteur d'effets radio-induits précoces, tandis qu'un rapport  $\alpha/\beta$  faible (0.5-5 Gy) traduit plutôt une sensibilité à une forte dose par séance et favorable à une radiotoxicité tardive (176, 254) ; le tout expliquant l'effet différentiel précédemment décrit (cf. § 1.1.2.1).

Ce modèle dit linéaire-quadratique (LQ) a fait l'objet d'intenses recherches dans le but d'apporter une interprétation biologique aux paramètres  $\alpha$  et  $\beta$ . Jusqu'en 2016, aucune théorie n'a pu convaincre la communauté scientifique (255-257).

La méthode des colonies, bien que contraignante, chronophage, et nécessitant un savoir-faire en culture cellulaire, est restée à ce jour la méthode de référence de mesure de la radiosensibilité cellulaire. Pourtant, l'inconvénient d'attendre 7 à 17 jours que les colonies se forment a incité certains scientifiques à développer d'autres tests : les tests d'exclusion, de non-exclusion ou tests dits de *viabilité cellulaire*. Certaines drogues, comme le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), possèdent la propriété d'incorporer le cytoplasme ou le noyau si la cellule métabolise ou ne métabolise plus au sens électrique (mitochondrial) du terme (258). Ainsi, dans le cadre d'un test d'exclusion, si les cellules sont colorées, elles sont considérées comme "non viables donc mortes". L'avantage de cette technique est que la coloration est immédiate. Il faut toutefois insister sur la confusion qu'il peut y avoir entre la notion de non-viabilité et celle de mort cellulaire. En effet, comme on le verra plus loin avec la sénescence, une cellule irréversiblement arrêtée en G0/G1 est considérée comme morte mais les tests de non-viabilité resteront négatifs dans ce cas : les tests de non-viabilité peuvent donc sous-estimer la mort radiobiologique.

## I.2.2. Radiobiologie clinique : de la mort cellulaire à l'individu irradié

### I.2.2.1. La radiosensibilité individuelle

*Radiosensibilité : histoire d'un mot*

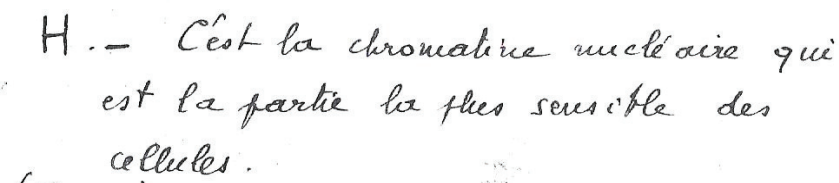
À l'exception de Victor Despeignes en Juillet 1896 et de quelques tentatives isolées de radiothérapie (5), les rayons X furent surtout utilisés au début du XX<sup>ème</sup> siècle pour la radiographie voire pour la radio-épilation (259, 260). C'est probablement surtout cette dernière approche inattendue qui a documenté directement ou indirectement les réactions tissulaires radio-induites que l'on appelait alors "brûlures radiques". La fréquence de ces événements tissulaires ont conduit les radiobiologistes à faire l'hypothèse de la nocivité des rayons X et de la sensibilité des tissus aux rayons X (261, 262). Toutefois, l'origine du mot "radiosensibilité" remonte probablement à la naissance du terme "radioactivité" inventé par les Curie à la même période. Il faut en effet rappeler certaines études pionnières :

- la communication de 1901 où Pierre Curie relate l'expérience qu'il a faite sur lui-même avec une fiole contenant du baryum radifère déposée sur son avant-bras (263) ;



- les travaux de Louis Tribondeau et Jean Bergonié à Bordeaux en 1906 (264) aboutissant à la loi dite de Tribondeau et Bergonié (265), qui s'avéra fausse (215) ;
- les travaux que mena Claudius Regaud à Lyon de 1906 à 1911 et qui posèrent les bases de la radiobiologie (241). En 1908, Regaud écrit « *C'est la chromatine nucléaire qui est la partie la plus sensible des cellules* » (Fig. 22).

Ainsi, alors que l'on parle volontiers au début du XX<sup>ème</sup> siècle de la notion de "sensibilité aux rayons", le premier usage du mot "radiosensibilité" se perd dans la décennie 1900-1910. Dans le corpus de la Bibliothèque Nationale de France, la première occurrence de "radiosensibilité" est observée paradoxalement en Mars 1910 sur la traduction d'une communication du médecin allemand Joseph Wetterer sur la radiothérapie des néoplasmes sous-cutanés, communication présentée lors du Congrès International de Physiologie à Paris (266). Il a été difficile de trouver des études contenant "Strahlenempfindlichkeit", traduction allemande du terme "radiosensibilité" dans cette même période. En fait, ces occurrences, qu'elles soient françaises ou allemandes apparaissent dans des citations, sans doute apocryphes, des communications de la décennie 1900-1910 mais datant des années 1920-30 et donc ne peuvent constituer une preuve d'usage de cette époque pionnière.



H. - C'est la chromatine nucléaire qui est la partie la plus sensible des cellules.

**Figure 22.** Notes manuscrites de Claudius Regaud (Archives Fonds Regaud de l'Institut Curie).

*Radiosensibilité : dermites, cancer ou cataractes ?*

Comment définir aujourd'hui le terme radiosensibilité. Il apparaît en effet qu'à chaque fois que l'on retrouve ce terme, une signification différente apparaisse. Ainsi, quand on parle de radiosensibilité de la peau, on parle généralement de dermites. Mais quand on parle de radiosensibilité du sein, c'est le cancer radio-induit du sein dont on veut parler. Enfin, quand on parle de la radiosensibilité de l'œil, c'est aux cataractes que l'on pense. Or, biologiquement, des dermites, un cancer du sein ou une cataracte sont des notions très différentes (238).

Reyennons qu'une analyse syntaxique plus fine, menée dans notre Unité de Recherche par Manon Britel, suggère plusieurs périodes dans l'utilisation et le sens du terme "radiosensibilité". Depuis la découverte des rayons X jusqu'en 1929-30, date du premier congrès international de radiologie, le terme "radiosensibilité" désigne plutôt la survenue des réactions tissulaires après irradiation. Après 1924, date du premier Congrès de Radiologie, la confusion existe entre l'acception historique et le risque de cancer radio-induit, probablement liée à l'usage du terme anglophone "radiosensitivity". D'ailleurs, cette confusion existe toujours puisque les phrases citées dans les documents de la Commission Internationale de Radioprotection (CIPR) comme « *Les enfants sont plus radiosensibles que les adultes* » ou « *le sein est l'organe le plus radiosensible* » où la signification de la radiosensibilité est plutôt relative au risque de cancer radio-induit qu'à la survenue de réactions tissulaires. Une telle confusion pose le problème de la compréhension du lien possible entre radiosensibilité et prédisposition au cancer. Ce lien est complexe : les syndromes caractérisés par une grande radiosensibilité, comme l'ataxie télangiectasique, sont associés à de fortes prédispositions au cancer. En revanche, certains syndromes, comme le syndrome de Li-Fraumeni, causé par des mutations hétérozygotes de p53, sont également associés à une forte prédisposition au cancer mais sans qu'il y ait de radiosensibilité tissulaire significative (238) : dans ce cas précis, on n'interdira donc pas la radiothérapie mais on limitera le champ d'irradiation pour atteindre le moins de tissus sains possibles.

Afin de mettre fin à la confusion entre les différentes acceptions du terme "radiosensibilité" (risque de réactions tissulaires radio-induites ou risque de cancers radio-induits ou phénomènes de vieillissement radio-induit), nous avons été à l'initiative de la proposition suivante (267) (Fig. 23) :

- conserver la définition historique de "**radiosensibilité**" en le définissant comme la capacité ou la prédisposition à montrer des réactions tissulaires après irradiation ou toutes conséquences cliniques d'une irradiation liées directement à la *mort cellulaire*;
- proposer le terme "**radiosusceptibilité**" pour désigner la capacité ou la prédisposition à montrer des cancers radio-induits, ou toutes conséquences cliniques d'une irradiation liées directement à la *transformation cellulaire*;
- proposer le terme "**radiodégénérescence**" pour désigner la capacité ou la prédisposition à montrer une maladie neurodégénérative ou toutes conséquences cliniques d'une irradiation liées directement à un *vieillissement cellulaire* accéléré.

**RADIOSENSIBILITE**

CDB non réparées  
Mort cellulaire  
Réactions tissulaires  
Ex : peau, intestin

**RADIOSUSCEPTIBILITE**

CDB mal réparées  
Transformation cellulaire  
Cancers radioinduits  
Ex : sein, tissus mous

**RADIODEGENERESCENCE**

CDB tolérées  
Vieillissement accéléré  
Maladies neurodégénératives  
Ex : œil, cerveau

**Figure 23.** Les 3 conséquences cliniques majeures d'une irradiation (267).

Ainsi, à chaque type de conséquences cliniques d'une irradiation, on peut associer une définition claire en relation avec la réponse biologique aux radiations. Mais une telle vision révèle des faits importants :

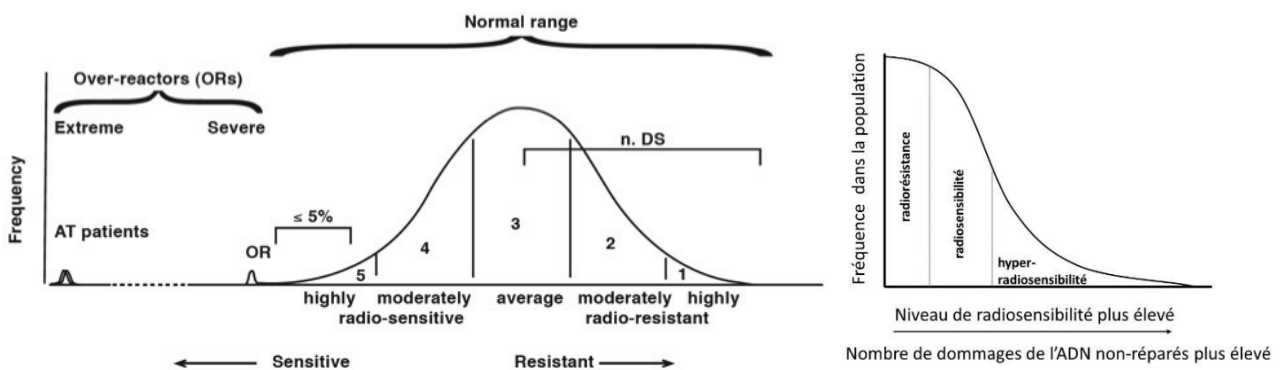
- d'une part, on s'aperçoit que certains organes ou tissus montrent des risques spécifiques pour au moins l'une des 3 notions prédéfinies. Par exemple, le cristallin est plutôt associé au vieillissement accéléré avec les cataractes (pas de cancer du cristallin ?) alors que la rétine est plutôt associée au cancer (rétinoblastome, pas de vieillissement de la rétine ?). De même, alors que le cancer du muscle cardiaque est extrêmement rare, on peut observer des phénomènes de vieillissement du système cardio-vasculaire. En revanche, pour la peau, on peut à la fois observer du vieillissement et des cancers (ex : mélanomes).
- d'autre part, au niveau des individus, il semble que radiodégénérescence et radiosusceptibilité s'excluent mutuellement pour un organe donné mais peuvent ensemble caractériser un individu. Par exemple, le syndrome de Rothmund-Thomson est caractérisé par des cataractes juvéniles mais aussi des ostéosarcomes. Et ce syndrome est associé à une radiosensibilité modérée mais significative. On peut donc parler de syndrome radiosensible associé, suivant les organes, à la radiosusceptibilité ou bien à la radiodégénérescence (267). Les exemples donnés plus haut montrent que le syndrome de Li-Fraumeni n'est pas associé à une radiosensibilité significative mais plutôt caractérisé par une très forte

radiosusceptibilité. Les mutations homozygotes du gène *ATM* qui causent l'ataxie telangiectasique conduisent à une très forte radiosensibilité (la plus élevée chez l'homme), à une forte radiosusceptibilité (prédisposition aux lymphomes et aux leucémies) mais aussi à une radiodégénérescence (destruction des cellules de Purkinje) (267).

#### *Radiosensibilité : son existence et son impact*

La réponse interindividuelle de la population générale à une dose standardisée de RI est aujourd'hui décrite par certains auteurs influents comme une courbe gaussienne, caractérisée par une valeur moyenne et sa déviation standard. Toutefois, aucun essai systématique n'a étayé une telle représentation (268) (Fig. 24). D'ailleurs, la représentation de la Figure 24A implique l'existence d'individus hyper-radiorésistants en nombre équivalent à celui des individus hyper-radiosensibles et que, toujours suivant cette hypothèse, le tableau clinique le plus probable est une radiosensibilité intermédiaire. Cette théorie "symétrique" ne va pas dans le sens dans le consensus adopté par la CIPR depuis plusieurs décennies (radiatorésistance uniforme de la population). Cette théorie ne va pas non plus dans le sens du faisceau d'hypothèses suivant : si la cellule meurt car elle n'a pas réparé un nombre suffisant de dommages de l'ADN, la mort peut intervenir pour n'importe quel nombre de dommages pour peu que celui-ci soit au-dessus d'un certain seuil. En revanche, ces situations ne peuvent ne pas être équiprobables : il serait plausible que présenter un nombre faible de dommages non-réparés soit plus fréquent que de montrer un taux élevé de dommages non-réparés. Ainsi, *plus la radiosensibilité serait marquée, plus elle serait rare*. Cette hypothèse va également dans le sens de l'épidémiologie génétique : des syndromes comme l'ataxie telangiectasique liée à l'hyper-radiosensibilité ont une incidence de 1/100 000 dans la population alors que les mutations de BRCA1 ou BRCA2 liés à une radiosensibilité tissulaire beaucoup plus faible ont une incidence de 1/500 à 1/1000 (261). Concernant la radiatorésistance, quand tous les dommages de l'ADN sont réparés en-dessous du seuil évoqué plus haut, la cellule ne peut réparer plus et donc ne peut survivre plus. Ainsi, même si on peut imaginer une radiatorésistance extrême et une radiosensibilité extrême, un nombre-seuil de quelques dommages de l'ADN par cellule impliquerait nécessairement une hyper-radiatorésistance "butoir" mais une plus grande variété dans les niveaux de radiosensibilité. Si « *plus la radiosensibilité est marquée, plus elle est rare* » est une

assertion vraie, on devrait obtenir alors une représentation semi-gaussienne de la radiosensibilité dans la population générale, telle que la Figure 24B le montre. La sous-population des hyper-radiosensibles ataxiques qui présente une discontinuité dans la représentation que propose Burnet et al. en 1998, s'intégrerait alors dans la représentation asymétrique que nous proposons : la population serait alors globalement radiorésistante, c'est-à-dire sans réaction tissulaire, ce qui corroborerait les données épidémiologiques (262) et suggérerait l'existence non négligeable d'une sous-population à la radiosensibilité significative mais modérée. Enfin, cette hypothèse obéirait au continuum des réponses aux radiations qu'on observe chaque jour et qui est attendu par les mathématiciens- statisticiens.



**Figure 24.** (A) Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale d'après (268). Les doses maximales recommandées sur les patients souffrants de réactions tissulaires prescrites sont calquées sur les 5% de patients radiosensibles, sujets à des réactions inhabituellement sévères. (B) Répartition de la radiosensibilité individuelle au sein de la population générale d'après notre théorie. En considérant une hyper-radiorésistance "butoir" et une population plutôt radiorésistante, plus la radiosensibilité est élevée, plus elle est rare.

### Quantification de la radiosensibilité au niveau clinique

La radiothérapie peut produire des effets secondaires qui s'expriment au niveau tissulaire sous plusieurs formes suivant l'organe irradié, la dose, le rapport dose-volume et l'individu : saignements, dermites, rectites, troubles neurologiques, etc... (269). Alors que la communauté scientifique considère que les réactions tissulaires radio-induites pourraient être le résultat de cassures de l'ADN non-réparées, les mécanismes qui sous-tendent ce lien ne sont pas encore consensuels (270). En parallèle, une réflexion générale sur les causes inhérentes de la nature précoce ou tardive des réactions post-radiothérapeutiques a été engagée depuis au moins 20 ans. En particulier, il est proposé que les effets précoces puissent avoir une nature inflammatoire, dues au changement de la perméabilité des cellules et à la libération de médiateurs inflammatoires. Ils peuvent aussi être causés par la perte des

cellules (ex : inflammation des muqueuses) (271, 272). Les réactions tardives pourraient, quant à elles, avoir 2 causes : soit une blessure directe du tissu cible (ex: occlusions vasculaires induisant une nécrose profonde), ce sont des effets dits "génériques" (273) ; soit des réactions précoces assez sévères (infection chronique, problèmes intestinaux causés par des ulcères sévères), ils sont alors des effets dits "conséquentiels" ou indirects (273).

Une telle classification est basée sur des critères temporels (réactions précoces avant 3-6 mois post-traitement ; tardifs après 3-6 mois) et sur des modalités de radiothérapie standard. Toutefois, aucun mécanisme biologique particulier ne vient étayer cette catégorisation avec la limite des 3-6 mois. De plus, on peut imaginer qu'une réaction tardive chez un patient plutôt radiorésistant devienne plutôt précoce chez un patient radiosensible. De même, des doses plus fortes, moins espacées ou un traitement réalisé avec des protons plutôt qu'avec des rayons gamma pourrait changer la nature des réactions tissulaires. Des investigations plus poussées s'avèrent donc nécessaires pour élucider le caractère tardif ou précoce de ces événements.

Une dernière réflexion concernant l'usage de certains termes doit être également menée. En effet, les anglophones parlent de "acute" (pour aigu) et "late" (pour tardif). En toute rigueur, c'est le terme "early" (pour précoce) qui devrait être choisi pour désigner les réactions précoces. Ainsi, le double sens de "acute" (aigu ou précoce ?) est à l'origine d'une certaine confusion.

À ce jour, et dans le cas de la radiothérapie, seule l'expérience du clinicien permet de prendre des actions concernant les réactions radio-induites, sans être pour autant basées sur des critères biologiques et moléculaires. Plusieurs échelles de grades de sévérité de ces réactions ont donc été développées, notamment à partir de 1979 avec l'échelle WHO (World Health Organization), suivies de CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Effects) dès 1983, RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) dès 1984, LENT (Late Effects in Normal Tissues) dès 1995 et leurs évolutions plus récentes. Aujourd'hui, les échelles CTCAE et RTOG dominant (269, 274, 275). Ces échelles s'efforcent de proposer des grades de sévérité valables quel que soit l'endroit du corps où est reçue la dose de radiation et quel que soit le type de tissu réagissant. Ainsi, de fait, ces échelles de sévérités permettent avec la cotation d'un grade (généralement allant de 0 : pas de réaction à 5 : décès du patient) de gommer toute spécificité tissulaire puisque qu'une réaction d'un grade donné sur un tissu

précis correspond en gravité à une autre réaction sur d'autres tissus. Bien que nécessairement subjective, ces classifications limitent les artefacts et les erreurs entre observateurs. En effet, en pratique, elle laisse au moins 3 grades (2, 3 et 4 ; le grade 1 restant assez subjectif en pratique) pour quantifier la gravité de réactions tissulaires ce qui laisse une assez grande latitude dans les descriptions des plaies (ex : rougeurs, érythème, érythème exsudatif, nécrose, ...). De plus, un classement par plus de 2 catégories permet d'exclure en analyse mathématique les phénomènes binaires de "tout-ou-rien". Quant aux grades extrêmes 0 et 5 (pas de réactions notables ou décès), les erreurs d'observation sont évidemment impossibles. Ainsi, sans *a priori* des aspects mécanistiques et phénoménologiques en amont des réactions tissulaires, et indépendamment du caractère précoce ou tardif des réactions tissulaires radio-induites, les échelles de sévérité sont des outils précieux pour quantifier la réponse clinique des tissus sains après irradiation.

En 1981, Fertil et Malaise ont montré que la radiocurabilité des tumeurs (quantifiée par le contrôle local) pouvait être prédite par la survie clonogénique à 2 Gy (surviving fraction at 2 Gy ; SF2) (253) ou encore la  $\bar{D}$  qui représente l'intégrale de S(D) (aire sous la courbe) (276).

#### *Maladies génétiques et radiosensibilité*

On compte aujourd'hui plus d'une trentaine de syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative. Soit ces maladies ont été identifiées après des effets délétères observés après radiothérapie, c'est le cas spectaculaire des enfants ataxiques dans les années 1970 (277), du patient porteur d'une mutation de la ligase IV (235, 278) et de certains patients atteints du syndrome de Nimègue (151). En revanche, dans la plus grande majorité des cas après 1970, la radiosensibilité a été observée en effectuant des courbes de survie. On peut même penser que c'est en réponse aux nombreux cas cliniques répertoriés dans les années 70 par les radiothérapeutes qu'un engouement général des radiobiologistes s'est porté sur tout type de syndromes à tester, sans véritables raisons autres que certaines anomalies cytogénétiques (279, 280). A la fin des années 90, Deschavanne et Fertil ont pu dresser une longue liste de syndromes génétiques associés à des SF2 inférieures à 50% environ (67). Le Tableau 4 montre que parmi tous ces syndromes, la très grande majorité est causée par des mutations de gènes impliqués dans la réparation des CDB. Cette conclusion va bien dans le sens d'une implication forte de ce type de dommages de l'ADN dans la létalité cellulaire.

Pourtant, la liste du Tableau 4 comporte des surprises : pourquoi la progeria, se place dans les 3 premières hyper-radiosensibilités humaines alors que la lamine A n'est pas une protéine de réparation ? De même, pourquoi la neurofibromine (NF1) induit-elle une forte radiosensibilité alors que cette protéine se trouve dans le cytoplasme (217, 218) ?

**Tableau 4.** Principales maladies génétiques associées à une radiosensibilité.

Syndrome	Gène muté	SF2 (%)	Grade CTCAE attendu
Ataxie télangiectasie (homoz. classiques)	ATM	1-5	5
Syndrome Ligase IV	LIG4	2-6	5
Syndrome de Nimègue	NBS1	5-9	5
Syndromes progeroïdes	Lamin A	8-20	5
Ataxie télangiectasie (homoz. variants)	ATM	10-15	4-5
Syndrome d'Usher	Gènes USH	15-20	4-5
Syndrome de Cockayne	Gènes CS	15-20	4-5
Xeroderma Pigmentosum	Gènes XP	15-30	3-5
Syndrome ATLD	MRE11	15-30	2-4
Chorée de Huntington	HTT	18-30	2-4
Neurofibromatose type 1	NF1	18-30	2-4
Syndrome de Gardner	APC ?	20-30	2-4
Syndrome de Turcot	hMSH2 ?	20-30	2-4
Anémie de Fanconi	Gènes FANC	20-40	1-4
Mutations hétéroz. BRCA2	BRCA2	20-40	1-4
Radiorésistance		>50	0

### 1.2.2.2. La radiosusceptibilité

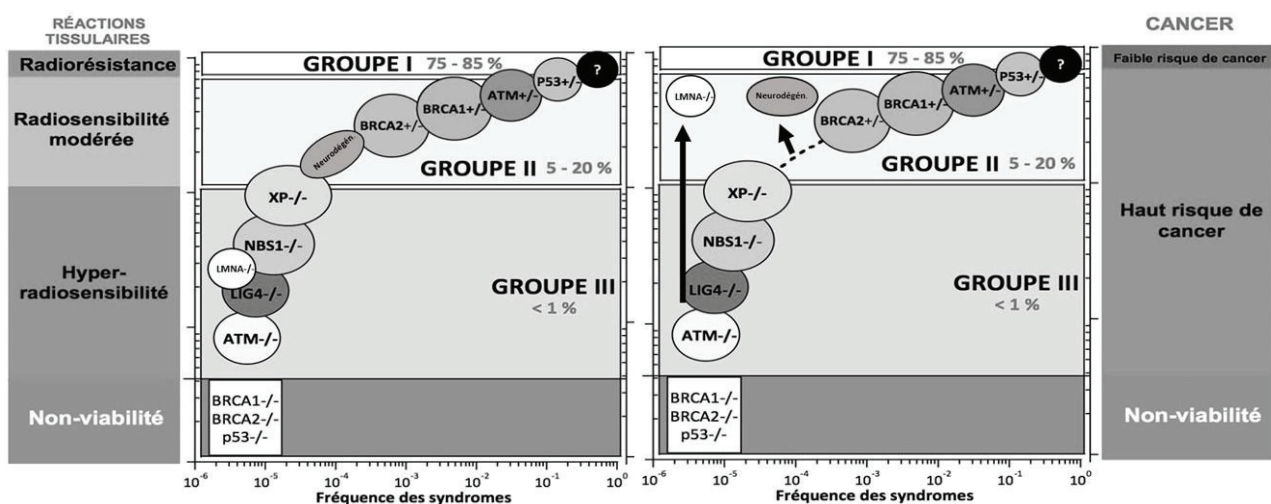
Ce manuscrit n'a pas la vocation de décrire en détails les mécanismes de la cancérogénèse. Cependant, il faut retenir 4 points importants :

- la plupart des modèles mécanistiques de cancérogénèse sont basés sur une mauvaise réparation des CDB : la majorité des maladies génétiques associées à un risque de cancer devraient donc liées à des dysfonctionnements de réparation et de signalisation des CDB (267) ;



- comme les RI produisent des CDB, les maladies associées à un haut risque de cancer sont par définition aussi associées à un haut risque de cancer radio-induit (267) ;
- quand on recense les syndromes associés à une radiosensibilité, on remarque que plus la radiosensibilité est forte, plus le risque de cancer est élevé, à l'exception des maladies neurodégénératives, consolidant le principe que les notions de radiosusceptibilité et de radiodégénérescence pourraient être mutuellement exclusives, pour un tissu donné (Fig. 25) ;
- plus la dose est forte, plus le risque de cancer augmente, puisqu'il y a plus de CDB par cellule. Toutefois, plus la dose est forte, plus le nombre de CDB non-réparées peut également augmenter. Il en est donc de même pour la létalité cellulaire radio-induite. Or, la létalité cellulaire l'emporte toujours vis-à-vis de la transformation : *une cellule morte ne fait pas de cancer*. Ainsi, pour chaque condition d'irradiation et statut individuel, il existe une dose-seuil où le risque de cancer radio-induit diminue face à la létalité radio-induite. C'est donc normalement aux doses faibles que le risque de cancer radio-induit sera le plus observable.

La Figure 25A montre les syndromes majeurs associés à la radiosensibilité en fonction de leur fréquence et de la SF2 correspondante. On voit bien que plus la radiosensibilité est élevée, plus les syndromes sont rares comme on l'a dit plus haut. En revanche, si on les recense en fonction du niveau de risque de cancer, on voit que la relation mathématique ne change pas mais ne concerne plus les maladies neurodégénératives (Fig. 25B).



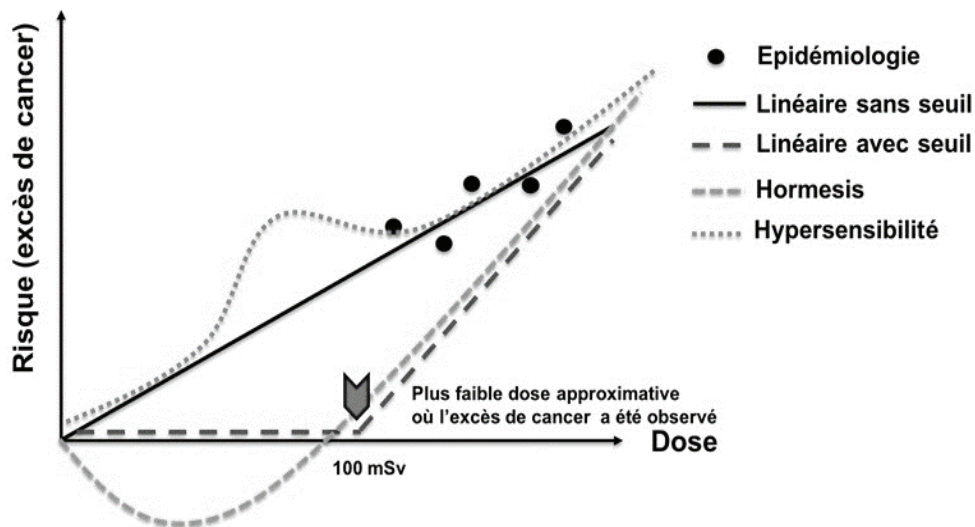
**Figure 25.** Principaux syndromes génétiques associés à une radiosensibilité (A) et/ou une prédisposition au cancer (B) en fonction de leur fréquence. On remarquera que seuls les syndromes associés au vieillissement accéléré (ex : LMNA-/- ou Neurodégén.) n'obéissent pas à la même relation mathématique.

*Les modèles de risque de cancers radio-induits*

Malgré des décennies de recherche sur les effets biologiques et cliniques des RI, il subsiste de nombreuses incertitudes quant à la quantification du risque de cancer radio-induit et plus particulièrement pour les faibles doses (définies comme étant inférieures à 100 mGy) (281). En plus d'un intérêt scientifique, cette question soulève des interrogations dans la société, notamment à cause de la place prise par l'exposition médicale aux RI dans notre quotidien. La tâche des épidémiologistes n'a pas été facile car, en plus du caractère nécessairement rare des événements radio-induits après faibles doses, s'ajoute le caractère stochastique de la carcinogénèse. Ainsi, l'approche privilégiée des épidémiologistes depuis les années 50 est d'avoir considéré de très grandes cohortes d'individus irradiés pour augmenter les chances d'observer un nombre significatif de cas de cancer radio-induit. Toutefois, jusqu'à présent, ces études se sont effectuées sans tenir compte du facteur individuel qui complexifierait les modèles mathématiques par un excès de risque pour une sous-population spécifique. Encore aujourd'hui, 2 modèles mathématiques de risque s'imposent, sous la forme de 2 relations dose-effet : le modèle linéaire sans seuil (Linear No-Threshold model : LNT) et le modèle non-linéaire avec seuil (Non-Linear Threshold model : NLT) (Fig. 26). Le modèle linéaire sans seuil (Linear No-Threshold model : LNT) est basé sur l'hypothèse que le risque de cancer radio-induit est strictement proportionnel à la dose et n'est nul qu'en l'absence d'irradiation : c'est la forme mathématique du *principe de précaution*. Le LNT a été adopté par la CIPR à la fin des années 1950 et au début des années 1960 (282) à la fois pour des questions pratiques de simplification, pour des raisons de prudence face au manque de modèles mécanistiques de réponse aux radiations et de carcinogénèse mais surtout pour des raisons historiques liées à la personnalité de Hermann Müller et son discours de réception pour son prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1946 (283, 284). L'utilisation de ce modèle est toujours préconisée (285, 286). Soutenant un risque radio-induit non-négligeable même pour les très faibles doses, le modèle LNT est également à l'origine du principe de radioprotection ALARA ("*As Low As Reasonably Achievable*", "aussi bas que raisonnablement possible").

En analysant les retombées des bombes d'Hiroshima et Nagasaki qui restent encore à ce jour associées aux cohortes les plus documentées des effets des radiations, il apparut que l'incidence des cancers induits par des faibles doses pouvait être surestimée par le modèle LNT. Un deuxième modèle avec seuil fut donc proposé (Non Linear Threshold model : NLT) sur la base d'un risque toujours proportionnel à la dose mais seulement à partir d'un certain seuil de dose. En-deçà du seuil, le risque est considéré comme négligeable. C'est à partir du développement du modèle LNT qu'une controverse sur le risque lié aux faibles doses émergea. En effet, alors que les données de Hiroshima montraient un seuil (très consensuel) de risque à 100 mSv pour les leucémies et à 200 mSv pour les cancers solides radio-induits, tout l'enjeu des discussions résidait dans la mesurabilité et la significativité des risques associées à des doses inférieures à ces seuils. Il existe notamment des données épidémiologiques montrant une augmentation du risque de cancer à partir de doses situées entre 10 mSv et 50 mSv délivrées en une irradiation unique et de doses de l'ordre de 50 à 100 mSv délivrées en plusieurs fois ou sur une longue période (287, 288) mais les querelles techniques des épidémiologistes sont toujours à la base des controverses actuelles.

En plus de ces deux modèles, d'autres phénomènes spécifiques aux faibles doses rendent l'évaluation des risques encore plus complexe. En particulier, l'hypothèse de l'*hormésis* soutient que l'exposition à des doses inférieures à 100 mSv pourrait diminuer le risque de cancer, soutenant donc un effet bénéfique des radiations (289, 290). A l'inverse, le phénomène d'*hypersensibilité aux faibles doses* suggère un effet plus délétère pour une fenêtre de doses centrée sur 100-200 mSv (291). Ces deux hypothèses créent ainsi des discontinuités notables dans la relation dose-effet, mettant à mal la validité des modèles NLT et LNT. Toutefois, la communauté scientifique semble encore négliger ces deux phénomènes, d'autant plus qu'ils sont plutôt documentés par des expériences *in vitro* que des données épidémiologiques. On peut même affirmer aujourd'hui que la controverse entre les pro-NLT et les pro-LNT ne s'est pas encore alimentée des connaissances de ces deux effets spécifiques des faibles doses (Fig. 26) : le débat entre pro-NLT et pro-LNT reste essentiellement une querelle d'épidémiologistes.



**Figure 26.** Schéma des différents modèles de risque aux expositions aux faibles doses d'irradiation.

Pourtant, de façon intéressante, l'importance du facteur individuel et l'existence de ces phénomènes radiobiologiques spécifiques aux faibles doses remettent en cause la linéarité de la description du risque dans la gamme de doses faibles dans laquelle se trouve le radiodiagnostic (292). Nous verrons plus loin comment le modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM a permis de mieux comprendre l'hormésis et l'hypersensibilité aux faibles doses.

Au niveau épidémiologique, deux scénarios d'exposition à de faibles doses de radiations concernent directement les cancers radio-induits :

- L'explosion atomique ou les accidents nucléaires (293)
- Les expositions médicales et notamment, en premier lieu, celles dues aux examens scanographiques (294).

#### *Nécessité de la prise en compte du facteur individuel*

Le fait qu'un enfant subisse un scanner pour diagnostiquer un cancer et plusieurs autres pour suivre son évolution avant ou après une thérapie pourrait d'abord être une conséquence d'une prédisposition individuelle. Celle-ci primerait sur le recul que l'on a sur la vie entière pour détecter un cancer.

La différence des effets de l'exposition aux RI en fonction de l'âge est une question complexe. Les modèles publiés et appliqués à presque tous les types de tumeurs qui supposent un risque relatif accru de cancérogenèse radio-induite chez les enfants par rapport aux adultes

sont des généralisations, sans soutien scientifique documenté (281). Cette brève revue de la littérature suggère plutôt l'importance des caractéristiques de l'exposition, de l'âge au moment de l'exposition, de la dose absorbée dans certains tissus, de l'âge au moment de l'évaluation et des effets radiobiologiques spécifiques des faibles doses dépendant fortement du facteur individuel. Actuellement, il n'existe pas de projections satisfaisantes du risque sur toute la vie pour des sites tumoraux particuliers après une exposition à un jeune âge. Les estimations actuellement utilisées ne tiennent pas suffisamment compte des variations connues et des travaux supplémentaires sont nécessaires, comme le conclut l'UNSCEAR (281). En effet, son comité scientifique reconnaît la nécessité de poursuivre les recherches pour déterminer l'ampleur et l'expression des effets et des risques liés à l'exposition pendant l'enfance par rapport à l'âge adulte. En revanche, les études à long terme qui suivront l'exposition des enfants seront confrontées à d'importantes difficultés en raison de l'absence de liens entre les dossiers médicaux, d'obstacles administratifs et politiques et de considérations éthiques et de protection de la vie privée. Ce sont d'importants défis qu'attendent les épidémiologistes. Pour les radiobiologistes, ils doivent aujourd'hui faire progresser les connaissances sur les effets spécifiques des faibles doses qui concernent les scanners et mettre en œuvre des méthodologies rigoureuses pour évaluer l'importance du facteur individuel qui est quasiment négligé par les épidémiologistes depuis 50 ans dans les descriptions mathématiques du risque.

### *1.2.2.3. La radiodégénérescence*

Des trois notions précitées, radiosensibilité, radiosusceptibilité et radiodégénérescence, c'est la dernière qui est la moins documentée. En effet, alors que l'on commence à mieux connaître les mécanismes moléculaires aboutissant à la mort cellulaire, avec des biomarqueurs de la réparation et de la signalisation des CDB suffisamment spécifiques, alors qu'on perçoit mieux que le processus de transformation cellulaire est lié à une mauvaise réparation des CDB, les processus de vieillissement cellulaire et ses biomarqueurs spécifiques manquent d'un consensus et d'une validation scientifique. Ce qui rend nécessairement ce chapitre très incomplet. Pourtant, une des conséquences cliniques d'un vieillissement accéléré est bien connue du grand public : les cataractes.

Ces effets radio-induits spécifiques sont connus depuis plus d'un siècle et ils apparaissent à des doses faibles (272, 295-299) mais qui restent du même ordre que pour la

radiosusceptibilité : de l'ordre de 0.1 Gy. Il faut également noter que les effets de radiodégénérescence peuvent s'observer après une répétition de doses sublétales (exposition chronique) voire une exposition continue à faible débit de doses du moment que l'on n'atteint pas des doses létales. L'un des exemples les plus représentatifs est la cohorte des astronautes soumis à environ 0.4 mSv par jour de mission (environ 146 mSv/an, c'est-à-dire 2 fois la radioactivité naturelle la plus élevée sur terre (Ramsar, Iran, environ 70 mSv/an) et qui montrent des cataractes pour plus de 80 % d'entre eux (300).

Les premières observations des cataractes radio-induites ont été enregistrées en même temps que celles des brûlures radiques et des cancers radio-induits, c'est-à-dire quelques mois après la découverte des rayons X (301, 302). La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) recommanda en 1955 une première dose-seuil (303) qui n'a cessé de diminuer (272, 304). Elle est fixée aujourd'hui à 0.5 Gy. Cette dose produirait une opacité du cristallin chez 1 % des personnes exposées moins de 20 ans après l'exposition (272). De façon intéressante, alors que les cellules composant la lentille de l'œil croissent naturellement, il n'a pas été observé chez les humains de cas de tumeurs correspondant à ce tissu particulier (305, 306), suggérant que la mauvaise réparation n'est pas permise pour ce type de cellules. C'est exactement l'inverse pour la rétine où l'on observe des rétinoblastomes (307).

Les mécanismes de la cataractogenèse radio-induite sont encore peu connus. Toutefois, des études chez la souris montrent que les homologues de certains gènes humains déjà cités plus haut seraient impliqués. C'est le notamment le cas de *ATM*, *BRCA1*, *PTCH1*, suggérant une fois encore le rôle majeur de la réparation et de la signalisation des cassures de l'ADN (308-314). Enfin, il a été trouvé une augmentation significative de cataractes radio-induites chez les porteurs de mutation hétérozygotes d'*ATM* parmi les survivants d'Hiroshima (315). En dépit de certaines controverses, la cataractogenèse est considérée comme issue de mécanismes différents de la létalité cellulaire, les cellules épithéliales de la lentille montrant la même radiosensibilité que les fibroblastes (316, 317). Cette dernière conclusion pourrait cependant être remise en cause par de nouvelles données obtenues sur des cellules humaines dans notre laboratoire (cf. § I.3). Il a été suggéré que les cataractes radio-induites pouvaient être expliquées par une mauvaise différenciation cellulaire, une mauvaise réponse au stress oxydant et/ou un raccourcissement des télomères bien qu'aucun biomarqueur prédictif ne soit consensuel. Le seul modèle *a minima* qui fasse

consensus est que l'opacité du cristallin soit liée à une vitesse trop lente pour éliminer les déchets cellulaires causés par la sénescence. Évidemment, de nouvelles investigations sont nécessaires pour mieux construire un modèle de cataractogenèse qui soit cohérent (318-321).

Il existe d'autres modèles de vieillissement cellulaire, le système cardiovasculaire étant le plus cité après les cataractes. Cependant, les progrès de l'exploration spatiale ont montré que le système osseux était lui aussi radiosensible et radiodégénérescent :

- Les données épidémiologiques des patientes atteintes d'un cancer du sein ont montré que plus de 50% des femmes sont à risque de crise cardiaque pendant 10 ans après la radiothérapie (322-325). De tels exemples suggèrent que le système cardiovasculaire peut être affecté mécaniquement par les radiations et sensible aux faibles doses. À ce jour, il n'y a aucune preuve de maladie cardiovasculaire chez les astronautes qui serait causée par une exposition aux radiations spatiales à travers des missions longues (326, 327). D'ailleurs, la contribution de la microgravité doit être séparée de la contribution du rayonnement dans le processus de vieillissement potentiel du système cardiovasculaire qui manque aussi de biomarqueurs (328).
- La perte de masse osseuse des astronautes, en particulier dans les os porteurs, est une observation courante effectuée après chaque mission spatiale, pouvant entraîner des conséquences sur le système immunitaire. On a émis l'hypothèse que la perte de masse osseuse était similaire à l'ostéoporose (329-332). Bien que les mécanismes inhérents à cette perte aient été basés sur des données de modèles animaux, il semble qu'une fonction ostéoblastique réduite entraîne une diminution de la formation osseuse tandis que la résorption osseuse est inchangée ou augmentée. La perte de masse osseuse a longtemps été attribuée à la microgravité (332). Cependant, alors que les voies moléculaires et cellulaires par lesquelles la microgravité peut agir sur les signaux biochimiques sont encore inconnues, certaines données émergentes suggèrent que les RI peuvent également affecter les os (333). Fait intéressant, en caractérisant radiobiologiquement certains syndromes génétiques associés à une dysmorphie faciale, les ostéoblastes se sont révélés plus radiosensibles que les fibroblastes de peau, pour un même donneur, ce qui peut suggérer que la contribution des radiations spatiales à la perte de masse osseuse des astronautes a effectivement été sous-estimée (334) : des études complémentaires sont donc

nécessaires pour documenter la radiodégénérescence osseuse en réponse à un faible débit de dose.



### I.3. APPORT MOLÉCULAIRE DU LABORATOIRE INSERM U1296

#### I.3.1. Justification des choix de notre approche

##### I.3.1.1. Choix des tests fonctionnels de la réparation des CDB

Depuis les années 1990, trois grandes approches étaient adoptées pour déterminer les bases moléculaires de la radiosensibilité (267) :

- L'approche génomique, qui consiste à déterminer, par la connaissance des *séquences des gènes*, certaines mutations qui seraient la cause de la radiosensibilité. C'est le cas de la recherche des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP).
- L'approche protéomique, qui consiste à déterminer, par la connaissance de *l'expression des gènes*, des protéines dont la régulation conditionnerait la réponse aux RI.
- L'approche fonctionnelle, qui consiste à déterminer, par la connaissance des *fonctions de gènes* si et comment le rôle biologique de certaines protéines peut être impliqué dans la radiosensibilité.

Dans les années 2000, les données de littérature de plus en plus nombreuses montraient que les CDB sont les dommages de l'ADN les mieux corrélés à la létalité cellulaire et à la toxicité, – si elles ne sont pas réparées, – et à l'instabilité génomique et au risque de cancer, – si elles sont mal réparées (267). A l'origine établie pour les CDB radio-induites, une telle conclusion semblait être valable aussi pour tous les agents cassants de l'ADN. Dès lors, une évaluation du risque toxique et cancérogène basée sur la quantification des CDB et des fonctionnalités de leur voie de réparation apparaissait donc comme logique. Outre les conclusions de la littérature, ces constats se basaient sur trois constats essentiels :

- La très grande majorité des syndromes associés à une radiosensibilité significative sont causés par la mutation de de protéines impliquées dans la réparation et la signalisation des CDB directement ou indirectement (335).
- Les CDB sont à l'origine des cassures chromosomiques, événement cytogénétique dont l'implication dans la létalité ou la transformation cellulaire fait consensus (336).
- De tous les dommages radio-induits de l'ADN, les CDB sont les seules dont l'induction et/ou le rythme de réparation est modulé, comme la radiosensibilité, par l'oxygénation, l'hyperthermie, ou le transfert linéique d'énergie (336).

En dépit de ces arguments, la popularité des expériences de génomique ou de protéomique (notamment expliquée par leur rapidité et leur simplicité) a occulté l'intérêt des tests fonctionnels concernant les CDB dans la détection de la radiosensibilité. D'ailleurs, ces derniers devenaient de moins en moins accessibles car leur mise en place fait souvent appel à un "savoir-faire" technique important. En parallèle, en ne suivant toujours aucune logique, les tests apoptotiques à partir de lymphocytes devenaient également populaires en dépit d'artéfacts techniques qui ne se révélèrent que très récemment (267). Bien que très documentée, l'approche de notre laboratoire, délibérément basée sur des tests fonctionnels de la réparation et de la signalisation des CDB ne pouvait apparaître que comme une démarche à contre-courant.

#### *1.3.1.2. Choix des modèles cellulaires*

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

- L'homologie *de séquence* et encore moins l'homologie *fonctionnelle* des gènes des espèces animales sont loin d'être vérifiée avec les gènes humains correspondants. D'ailleurs, l'homologie des gènes entre espèces est généralement basée sur une simple affirmation d'un groupe d'auteurs sur l'existence de certains domaines en commun voire identique. L'exemple représentatif est le gène *brca1* du rongeur qui n'a que 58% d'identité avec le gène humain BRCA1. La mutation de *brca1* chez le rongeur ne conduit à aucune prédisposition au cancer du sein alors que chez l'homme, les mutations hétérozygotes BRCA1+/- augmentent d'un facteur 6 à 10 le risque de cancer du sein (267).
- La taille du noyau des modèles animaux est généralement inférieure à la taille d'un noyau humain. Par voie de conséquence, la cible étant plus petite, les animaux sont plus radiorésistants que l'homme (ex : la dose létale moyenne est de 15 Gy chez le rat alors qu'elle est de 4,5 Gy chez l'homme). Ainsi, toutes les courbes effet-dose et les valeurs de

seuil sont différentes suivant les espèces et le passage de l'une à l'autre ne suit pas une loi forcément linéaire (337).

Ainsi, en dépit des difficultés pratiques de culture cellulaire, le laboratoire d'accueil a délibérément choisi de n'utiliser que des cellules humaines non-transformées. En revanche, le choix pouvait se porter sur les lymphocytes ou les fibroblastes de peau. Outre le test de clonogénicité (cf. § I.2.1.4), deux autres méthodes fonctionnelles peuvent permettre de prédire la radiosensibilité individuelle : le test d'apoptose lymphocytaire radio-induite (ou RILA pour *radiation-induced lymphocyte apoptosis*) développé par Mahmut Özsahin et David Azria (338), ainsi que la vitesse de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (ou RIANS pour *radiation induced ATM nucleoshuttling*) émanant de notre unité (339) et que nous décrirons plus loin (cf. § I.3.2.2) (340).

Là encore, cette démarche qui a beaucoup de contraintes, est à contre-courant de la pratique d'autres laboratoires qui favorisent l'utilisation de lignées transformées ou animales qui poussent très rapidement mais sans s'assurer des artéfacts causés par les facteurs évoqués (267).

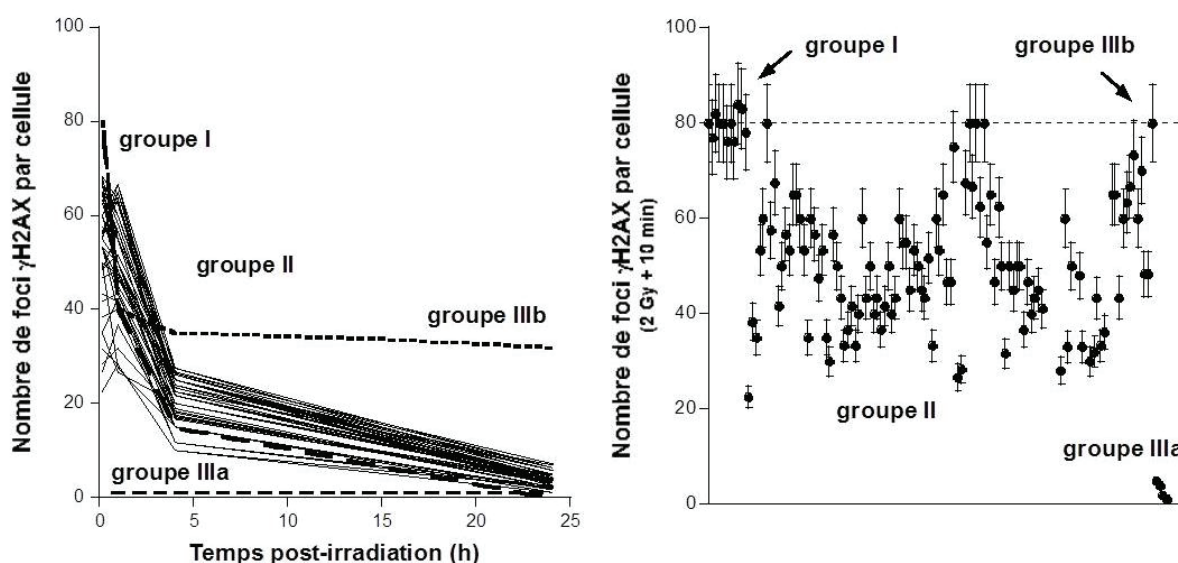
### I.3.2. Genèse du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

#### I.3.2.1. Pourquoi ATM ?

En 2016, en réunissant des fibroblastes de peau de patients ayant montré des complications après radiothérapie (collection COPERNIC), nous avons appliqué la technique d'immunofluorescence  $\gamma$ H2AX et pATM sur les fibroblastes COPERNIC irradiés à 2 Gy. Une fois obtenues, les données radiobiologiques avaient été confrontées aux grades de sévérité CTCAE ou RTOG notés par deux médecins indépendants (339). La mise en commun des données radiobiologiques et cliniques s'était donc effectuée sans aucun *a priori*. L'étude du nombre de foci  $\gamma$ H2AX résiduels, mesuré 24 h après 2 Gy avait permis de distinguer 4 groupes définis arbitrairement en fonction de la réponse aux RI : les témoins radorésistants (groupe I), le cas hyper-radiosensible du syndrome LIG4 (groupe IIIb), les cas hyper-radiosensibles du syndrome AT (groupe IIIa) et tous les autres cas, c'est-à-dire les patients du groupe II.

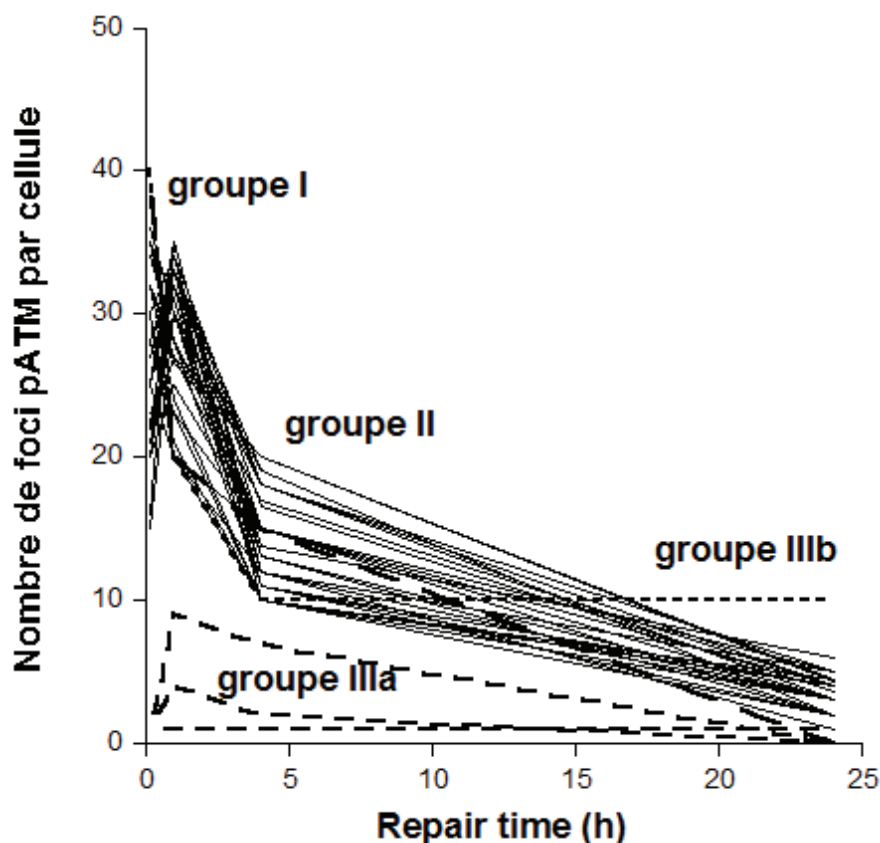
Les cinétiques d'apparition/disparition des foci  $\gamma$ H2AX des cellules de patients souffrant de radiosensibilité de groupe II montrèrent des valeurs numériques à 10 min et à 1 h *plus*

basses que celles des témoins radio-résistants (Fig. 27). Une première interprétation de ces données pouvait être que le nombre de CDB radio-induites était plus faible dans les lignées plus radiosensibles que dans les lignées radio-résistantes. Mais de très nombreuses données obtenues avec d'autres techniques avaient montré que le taux d'induction de CDB par Gy était indépendant de la radiosensibilité mais dépendant plutôt de la géométrie de la cible et du type cellulaire : environ 40 CDB par Gy de rayons X pour des fibroblastes humains ou environ 25 CDB par Gy de rayons X pour des lymphocytes humains (cf. § I.2.1.1 et (339)).



**Figure 27.** Cinétiques d'apparition/disparition de foci  $\gamma$ H2AX en fonction du temps post-irradiation pour les lignées COPERNIC. Les barres d'erreur ont été omises. Le panneau de droite montre les points à 10 min post-irradiation pour les mêmes lignées. La ligne en pointillés repère l'incidence de 80 CDB pour 2 Gy, valeur attendue d'après la littérature. D'après (339).

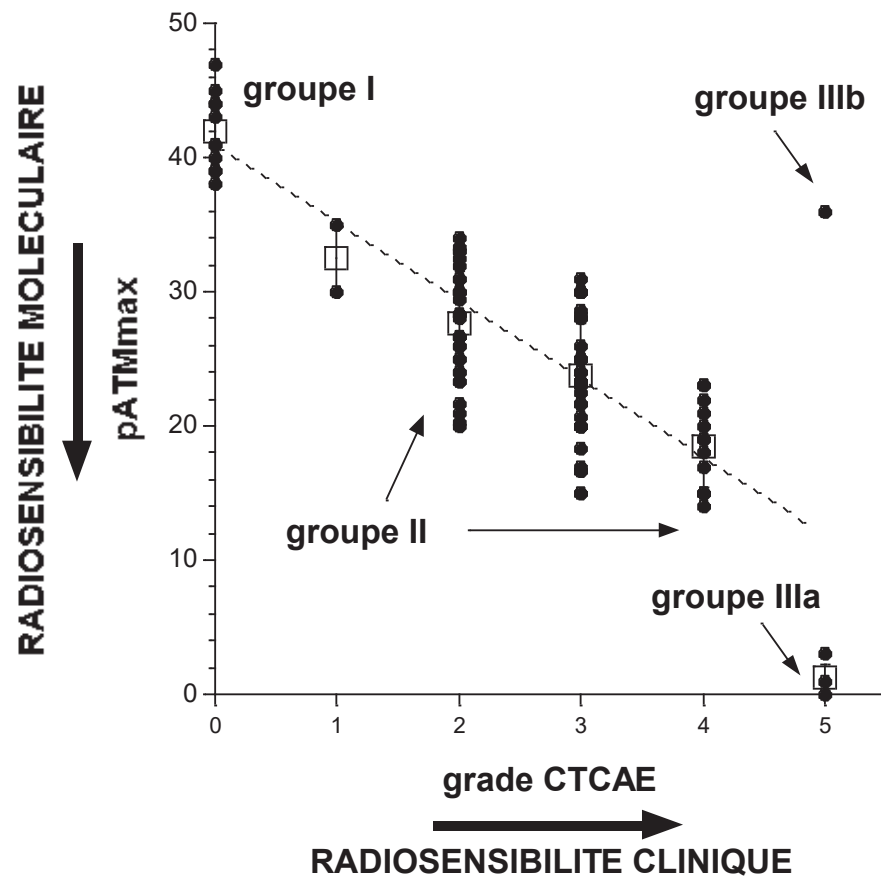
La phosphorylation  $\gamma$ H2AX est ATM-dépendante : un nombre plus faible de foci  $\gamma$ H2AX doit donc être interprété comme une baisse de l'activité nucléaire de la protéine ATM. Si l'on considère que la phosphorylation  $\gamma$ H2AX est le signe d'une reconnaissance des CDB avant réparation par suture, les CDB seraient alors *moins reconnues* dans les cellules radiosensibles. Nous avons abouti à la même conclusion avec les foci pATM (Fig.28).



**Figure 28.** Cinétiques d'apparition/disparition de foci pATM en fonction du temps post-irradiation pour les lignées COPERNIC. Les barres d'erreur ont été omises. Inspiré de (339).

Des immunoprécipitations et des immunoblots ATM et pATM furent réalisés sur des extraits cytoplasmiques, nucléaires et totaux de lignées COPERNIC : les quantités des formes cytoplasmiques d'ATM ou de pATM ne variaient pas significativement quel que soit le temps de réparation et que les cellules soient irradiées ou non, suggérant une forte abondance de ATM dans le cytoplasme. A l'inverse, les quantités des formes nucléaires de pATM variaient significativement en fonction du temps, principalement pour 10 min et 1 h. Toutes ces données suggérèrent que la protéine ATM passe du cytoplasme au noyau très précocement après l'irradiation. Le nombre de foci pATM reflétant logiquement l'activité kinase dans le noyau, nous avons fait alors l'hypothèse que le maximum du nombre de foci pATM entre les données 10 min et 1 h (pATMmax) refléterait le mieux l'activité kinase précoce d'ATM dans le noyau. La corrélation entre pATMmax et les grades de sévérité CTCAE et RTOG observés sur les patients correspondants aux fibroblastes apparut significative et discrimina 5 catégories de cellules : groupe I, groupe II, groupe IIIa, groupe IIIb (ANOVA  $p < 0.0001$ ) (Fig. 29). Nous avons vérifié la significativité de cette relation en réduisant l'analyse aux patients souffrant de tumeurs au sein, de prostate, du système

nerveux de l'enfant ou du système oto-rhino-laryngologique pédiatriques. Pour chacune de ces sous-classes, la corrélation apparut significative et caractérisée par les mêmes paramètres numériques. Idem pour les réactions précoces et tardives et, là encore, la même corrélation quantitative resta valable (339).



**Figure 29.** Relation entre pATMmax et le grade CTCAE pour les lignées COPERNIC. Les carrés blancs représentent les moyennes numériques pour chaque grade. Notons que la lignée 180BR (LIG4<sup>-/-</sup>), seul cas mondial de groupe IIIb n'obéit pas à la relation mais est aisément détectable par le nombre de foci  $\gamma$ H2AX résiduels. Inspiré de (339).

### I.3.2.2. Les principes généraux du modèle du transit cyto-nucléaire d'ATM

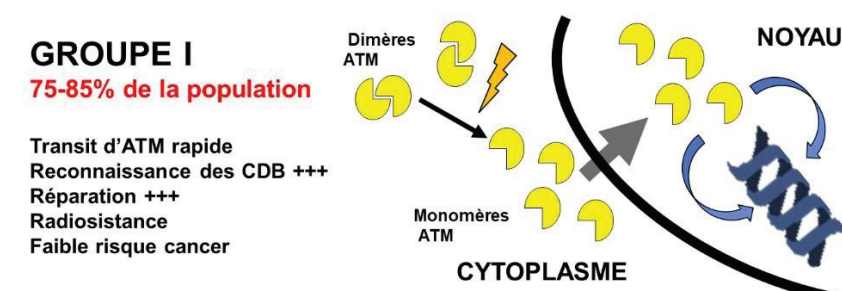
Comme nous l'avons montré depuis 2014 dans une littérature assez abondante qu'a produit l'Unité, le modèle mécanistique proposé, pour rester cohérent avec les données radiobiologiques décrites plus haut, est basé sur les étapes moléculaires suivantes de la réponse au stress des cellules quiescentes de mammifères: i) le stress oxydatif radio-induit entraîne à la fois l'induction de CDB dans le noyau et la monomérisation des dimères ATM cytoplasmiques; ii) les monomères ATM résultants diffusent du cytoplasme au noyau; iii) les monomères ATM phosphorylent les histones H2AX, ce qui produit des foci  $\gamma$ H2AX

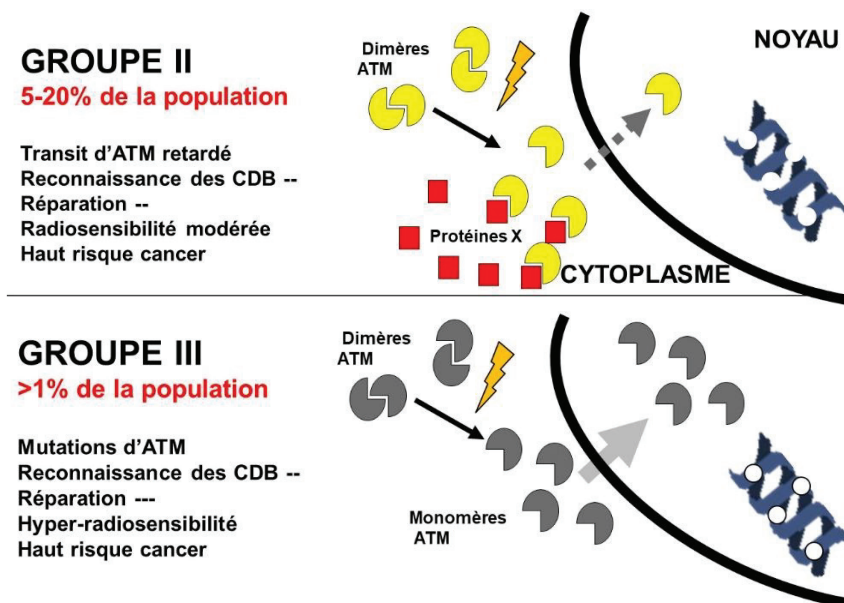
nucléaires au niveau des sites de CDB (facilement visibles et quantifiables par immunofluorescence) et contribuent à la reconnaissance des CDB par la voie de suture non homologue (NHEJ), prédominante chez les cellules humaines quiescentes; iv) une réparation complète de CDB produit la trans-autophosphorylation des protéines ATM (pATM) qui forment des dimères ATM dans le noyau, reflétés par des foci pATM au niveau des sites CDB, encore une fois facilement visibles et quantifiables par immunofluorescence (218).

Un retard de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (ou RIANS pour *radiation-induced ATM nucleoshuttling*) peut être causé par une surexpression cytoplasmique de certaines protéines-substrats de phosphorylation d'ATM (les protéines X) (218, 335). Les protéines X séquestrent les monomères ATM dans le cytoplasme. En conséquence, soit les CDB non reconnues restent non réparées et participent à la mort cellulaire, soit les CDB sont mal réparées par des voies de type recombinaison sujettes aux erreurs et participent à la transformation cellulaire et au cancer (218, 335).

Le modèle RIANS a permis de définir trois groupes de radiosensibilité (Fig. 30) (339) :

- Groupe I : individus radiorésistants à faible risque de cancer ; RIANS rapide (10 min après 2 Gy). Il représente 75-85% des individus (Fig. 30A).
- Groupe II : individus affectés par une radiosensibilité modérée mais significative ; à haut risque de cancer. RIANS retardé (>10 min après 2 Gy). Il représente 5-20% des individus (Fig. 30B).
- Groupe III : individus affectés par une hyper-radiosensibilité d'origine généralement génétique (syndromes généralement pédiatriques) avec des réactions fatales après radiothérapie. Il représente moins de 1% des individus (Fig. 30C).





**Figure 30.** Représentation graphique des 3 groupes de radiosensibilité définis par le modèle RIANS.

### 1.3.2.3. Protéines cytoplasmiques et radiosensibilité

Comme on l'a dit plus haut, certains syndromes génétiques associés à une radiosensibilité significative ont la particularité d'être causés par la mutation d'une protéine cytoplasmique ou qui reste dans le cytoplasme après irradiation. C'est notamment le cas de la chorée de Huntington (341), de la tubéreuse de Bourneville (342), de certaines mutations de Xeroderma Pigmentosum D (343), du rétinoblastome (307), du syndrome de Maccune-Albright (344) ou du syndrome PROS (334). La grande majorité de ces syndromes de groupe II sont causés par des mutations hétérozygotes et montrent une radiosensibilité dite "modérée". Toutefois, n'oublions pas que l'ataxie telangiectasique, maladie typique du groupe III est causée par les mutations homozygotes de la protéine ATM, elle aussi majoritairement cytoplasmique (218). Pour la première fois en radiobiologie, une explication compatible avec le rôle crucial de la réparation de l'ADN dans la létalité cellulaire après irradiation pouvait être proposée pour expliquer comment une protéine cytoplasmique pouvait influencer sur la létalité cellulaire. En effet, le modèle du transit d'ATM est basé sur la diffusion des monomères radio-induits d'ATM du cytoplasme à travers le noyau des cellules irradiés. L'étape de monomérisation d'ATM, étape biochimique, reste identique à un type cellulaire donné, quelle que soit la radiosensibilité des lignées. En quelque sorte, cette étape sert de dosimètre biologique avec un rendement sigmoïdal, comme on le verra dans le chapitre suivant. À l'inverse, l'étape de diffusion fait toute la



différence entre individus, avec la présence ou non de protéines X, substrats de phosphorylation d'ATM, qui sont liées directement ou indirectement à la maladie. Ainsi, dans la très grande majorité des cas, les protéines X sont celles, mutées, qui causent la maladie. Mutées à l'état hétérozygote, elles sont très généralement surexprimées à l'état spontané et/ou dès les premières minutes de l'irradiation et séquestrent les monomères d'ATM dans le cytoplasme. Le flux des monomères d'ATM qui arrivent dans le noyau est donc réduit, ce qui se traduit par une reconnaissance partielle des CDB et donc une réparation par suture qui ne concerne pas toutes les CDB. Selon que les CDB non-reconnues sont *mal-réparées* ou *tolérées*, la radiosusceptibilité ou bien la radiodégénérescence s'associe à la radiosensibilité (218).

#### ***1.3.2.4. La notion de reconnaissance des CDB***

Les techniques anciennes de mesure des CDB nécessitaient des doses de plusieurs dizaines de Gy, ne permettaient pas facilement les investigations pour les temps précoces après l'irradiation et rendaient difficiles la quantification des dommages cellule par cellule (188, 205). La technique de l'immunofluorescence  $\gamma$ H2AX allait faire disparaître ces contraintes. L'une des conséquences rapides de ce changement fut la comparaison des courbes de réparation des CDB obtenues par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) et par immunofluorescence. L'article princeps de Rothkamm et Löbrich (200) ne montrait que des cinétiques de réparation des CDB issues des fibroblastes radiorésistants (groupe I) et des fibroblastes hyper-radiosensibles (groupe III) mutés pour la ligase IV (lignée 180BR) : le hasard fit que l'allure des courbes de réparation pour chacune de ces lignées ne changeait pas avec la technique (immunofluorescence ou PFGE) car les lignées testées montraient toutes une reconnaissance des CDB normale. Rappelons également que les lignées issues de patients AT ne montrent pas de foci  $\gamma$ H2AX (234). Il apparut dès 2003 dans notre laboratoire que les cellules de radiosensibilité intermédiaire étaient caractérisées non seulement par un taux de CDB plus faible que les 40 CDB induites par Gy attendues immédiatement après irradiation mais aussi par des allures de courbes se rapprochant de la fonction Gamma (montée croissante du nombre de foci aux temps précoces et maximum atteint après 10 min post-irradiation) plutôt que des exponentielles biphasiques décroissantes (189). Très peu de radiobiologistes s'intéressèrent à cette question.

Après analyse, l'existence de deux parties (montante et descendante) de la cinétique des foci  $\gamma$ H2AX s'avéra commune aux cinétiques de foci formés par d'autres protéines (215). La partie descendante de la cinétique de foci  $\gamma$ H2AX (donc de la disparition des foci) fut logiquement interprétée comme le résultat de la réparation des CDB. C'était également l'explication commune (consensuelle) qui avait été avancée pour décrire les cinétiques de réparation obtenues avec les autres techniques (189). A l'inverse, la partie ascendante de la cinétique des foci, illustre la phosphorylation progressive des sites de CDB. Ainsi, comme il était plausible que la phosphorylation des histones H2AX formant les foci  $\gamma$ H2AX n'était pas un phénomène aussi immédiat que la formation (physique) des CDB, ce processus pouvait s'étendre sur quelques minutes et devenir, dans certains cas, incomplet : la notion de *reconnaissance* de dommages par le système biologique, si indispensable pour comprendre le passage de la physique à la biologie, pouvait donc être avancée. *De facto*, observer une grande variété dans les rythmes d'augmentation du nombre de foci dans les premières minutes suivant l'irradiation suggérait l'existence de taux de reconnaissance de CDB dépendant des lignées cellulaires et donc des individus. Comme ces différences, mesurables à des temps post-irradiation précoces, ne conditionnaient pas forcément la valeur des taux de CDB non-réparées à 24 h, il fallait en conclure que la *reconnaissance et la réparation des dommages étaient quasiment indépendantes*, ce qui signifiait qu'il fallait au moins deux biomarqueurs pour prédire la radiosensibilité (189). La formule de Bodgi fut alors proposée logiquement comme le produit de 3 phénomènes indépendants : l'induction physique des CDB, la reconnaissance des CDB et la réparation des CDB. L'induction était déjà documentée et sa linéarité avec la dose était restée consensuelle (190). La description fidèle des processus cinétiques de la réparation était le résultat de plusieurs publications qui aboutirent à une expression multiphasique des courbes (186, 344, 345). La description cinétique de la reconnaissance s'en inspira et la formule complète devint la formule de Bodgi (215).

Une conséquence immédiate de l'importance de l'étape de reconnaissance des CDB dans la survie cellulaire fut que la réparation *seule*, ne suffisait plus à prédire toute la radiosensibilité. Ainsi, en distinguant mieux les spécificités apportées par les différentes techniques de détection des CDB et l'observation sur la gamme de temps (10min-24h post-irradiation), le *dogme d'une radiosensibilité prédite uniquement par les défauts de réparation*

s'effondrait. L'observation clinique et l'étude des syndromes génétiques allaient consolider cette conclusion.

#### *1.3.2.5. La cellule : un dosimètre de haute précision*

Comme il l'a déjà été dit tout au long de cet ouvrage, le paradigme communément admis pour expliquer la réponse aux radiations était basé sur la prédominance des événements induits dans le noyau cellulaire et sur le fait que la protéine ATM était considérée comme essentiellement nucléaire. Toutefois, comme nous l'avons déjà vu, cette affirmation ne pouvait expliquer la radiosensibilité des syndromes causés par des mutations de protéines cytoplasmiques ni les observations sur des formes cytoplasmiques d'ATM (cf. § 1.2.1.3) (239, 346, 347). Plus tard, viendra l'argument que le traitement de statines et de bisphosphonates (ZOPRA) accélérant le transit cyto-nucléaire d'ATM, augmente la radiorésistance (341, 348).

En plus de l'importance du transit d'ATM lui-même dans notre modèle, il faut insister sur le fait que la réaction de monomérisation, proportionnelle à la dose comme une réaction biochimique, sert de véritable dosimètre de précision à la cellule en fournissant un nombre donné de monomères d'ATM dans le cytoplasme. D'ailleurs, un tel dosimètre fonctionne à la fois :

- "en spontané", en rendant compte du stress oxydatif présent dans le cytoplasme et en le transformant en nombre de monomères d'ATM
- "en radio-induit", en rendant compte du stress oxydatif radio-induit dans le cytoplasme et en le transformant en nombre de monomères ATM que ce soit après une irradiation par rayonnement (X ou gamma ; répartition homogène des microdépôts d'énergie) mais aussi après une irradiation particulière (ex : protons, neutrons, électrons, ions) en cumulant tous les monomères d'ATM créés dans les impacts présents sur le cytoplasme : c'est une véritable dose équivalente (telle qu'on la connaît dans le système Sievert) qui est fournie par la cellule.

À ce titre, notons encore deux éléments importants :

- Le nombre de protéines ATM dans le cytoplasme étant bien plus grand que le nombre de CDB dans le noyau fait que ce "dosimètre cellulaire" est très précis et offre des scénarios très variés : en effet, pour les conditions hormétiques, un flux

significatif de monomères ATM peut subsister avec des doses qui ne créent plus de CDB. C'est le cas pour les doses inférieures à 25 mGy. Pour les CSB, c'est le cas de doses inférieures à 1 mGy. La précision du dosimètre "cellule" est donc bien supérieure aux doses limites de 0.1 Gy pour la mesurabilité de nombreuses techniques radiobiologiques (cytogénétique, immunofluorescence, ...)

- Le volume du cytoplasme des fibroblastes est grand et peut être considéré comme un grand "réservoir" d'ATM mais surtout être une cible significative pour "capter" rayonnement et particules à des doses suffisamment faibles. Il est plus que probable que ces propriétés se retrouvent essentiellement dans la réponse spécifique des tissus aux radiations : des quantités plus faibles d'ATM et un plus petit cytoplasme n'offrent pas le même "rendement" de dosimétrie pour les autres tissus. C'est le cas notamment des lymphocytes, dotés d'un gros noyau mais d'un tout petit cytoplasme.

### *1.3.2.6. Importance des protéines X*

Après avoir été monomérisés en fonction de la dose, les monomères ATM peuvent être captés par les protéines X, souvent surexprimées dans le cytoplasme spontanément mais encore plus après irradiation comme c'est notamment le cas des protéines p53 ou de RB1 (307) (Fig. 31). L'abondance et la nature des protéines X peuvent être considérées comme les premiers facteurs individuels de la réponse aux radiations.

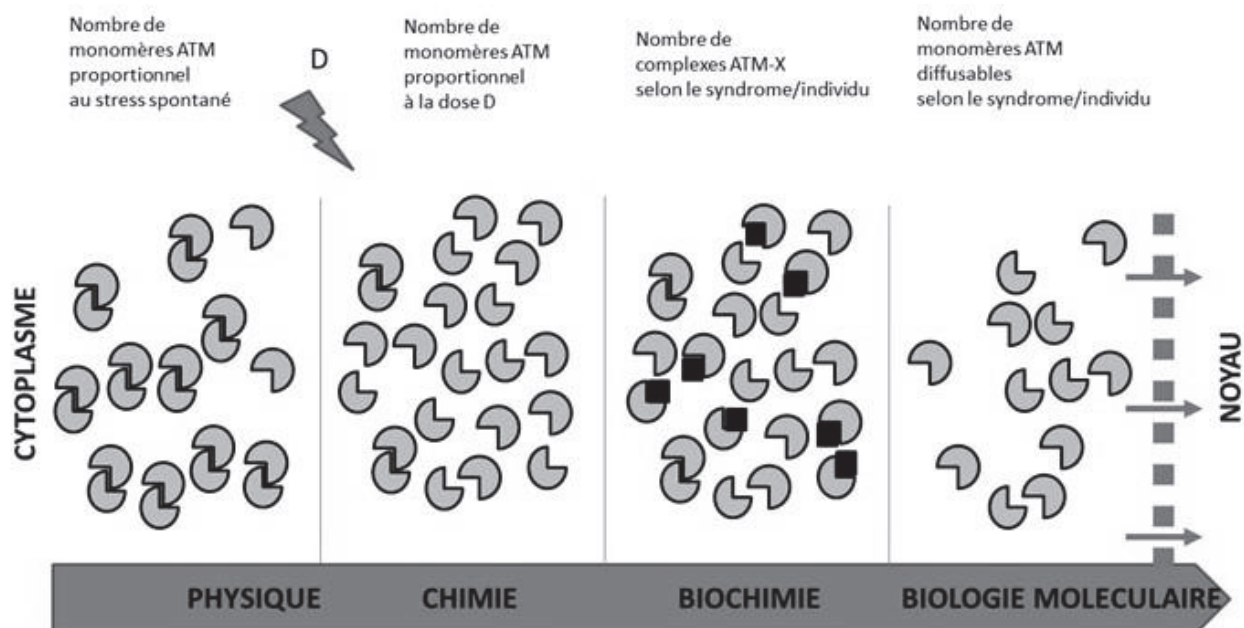
Divers syndromes sont associés à une radiosensibilité modérée alors qu'ils ne sont pas causés par des mutations de protéines de réparation, comme c'est le cas des syndromes progeroïdes (348), de la maladie de Bruton (349), de la neurofibromatose (350), de la chorée de Huntington (341) ou du syndrome d'Usher (67). Une étude récente de notre laboratoire sur la chorée de Huntington suggère que la protéine huntingtine mutée séquestre ATM dans le cytoplasme, ce qui limite la reconnaissance et la réparation des CDB dans le noyau. Ainsi, la huntingtine, comme les autres protéines cytoplasmiques dont la mutation causerait les syndromes précités, pourraient appartenir aux protéines appelées X : après irradiation, ces protéines cytoplasmiques mutées deviennent des substrats des monomères d'ATM, en compétition avec la redimérisation d'ATM. En conséquence, les complexes X-ATM et ATM-ATM empêcheraient la diffusion des monomères ATM vers le noyau.

Il est intéressant de noter que, tout au long des 10 ans d'analyses de la radiosensibilité de plus de 300 patients, notre laboratoire a observé que les fibroblastes d'une grande

majorité de patients subissant des réactions tissulaires radio-induites montrent un retard du transit cyto-nucléaire d'ATM sans pour autant souffrir de syndromes génétiques bien caractérisés ou de mutations de protéines nucléaires (collection COPERNIC). Il est donc possible que la majorité des patients du groupe II, c'est-à-dire ceux qui sont à risque en radiothérapie, puissent souffrir de mutations de protéines X qui s'accompagneraient d'une surexpression dans le cytoplasme. Une telle abondance de protéines X suffirait alors à bloquer les monomères ATM. Elle suffirait aussi à expliquer les taux élevés (5 à 20%) de patients qui sont avérés radiosensibles à la suite d'une radiothérapie sans pour autant montrer un tableau clinique spécifique avant le traitement comme ce pourrait être le cas pour des maladies de la réparation de l'ADN. Cette question, qui bouleverse alors la stratégie de dépistage des patients radiosensibles était suffisamment importante pour faire l'objet d'un tome entier (207).

Un second aspect de la séquestration des monomères d'ATM par les protéines X est la *permissivité* du processus. En effet, dans le cadre des cellules de groupe II, le transit d'ATM n'est jamais totalement bloqué. En revanche, plus les protéines X sont abondantes dans le cytoplasme, moins les monomères ATM diffusables dans le noyau seront nombreux (Fig. 31). Cela dépend du facteur individuel mais aussi cela explique aussi l'importance du facteur tissu/organe car l'abondance des protéines X dans le cytoplasme peut aussi dépendre de la nature du tissu/organe, indépendamment du facteur individuel. Plus récemment encore, des données encore préliminaires du laboratoire nous ont permis de distinguer l'action de protéines X réparties de façon aléatoire/homogène dans le cytoplasme et les protéines X plus proches, voire liées à la membrane nucléaire. Une captation des monomères d'ATM par la première catégorie pourrait permettre une "certaine diffusion résiduelle" des monomères dans le noyau. A l'inverse, la seconde catégorie pourrait former progressivement un encombrement stérique autour de la membrane nucléaire qui pourrait constituer "un mur quasiment infranchissable". Rappelons en effet qu'une trop grande concentration de monomères ATM favorise la redimérisation et donc augmenterait le nombre de complexes ATM-ATM au détriment des complexes X-ATM. De façon intéressante, ces deux scénarios sont également transposables dans les cinétiques de la formation de foci MRE11. MRE11 est une protéine nucléase dont la suractivité a été associée à l'hyper-recombinaison, elle-même liée à la radiosusceptibilité et la susceptibilité au cancer spontané. L'activité nucléasique cesserait après phosphorylation de MRE11 par les

monomères ATM arrivés dans le noyau. Cette étape conduit à la formation des foci nucléaires MRE11 (189). Pour les syndromes associés à la radiosusceptibilité, un excès de foci MRE11 apparaît dans la première heure après irradiation alors que le nombre de foci MRE11 augmente progressivement avec le temps post-irradiation dans les syndromes plutôt associés à la radiodégénérescence (maximum atteint à 24h post-irradiation) (335). On pourrait alors relier la première catégorie des protéines X décrites avec la première catégorie décrite des cinétiques de foci MRE11 et la deuxième catégorie des protéines X, plutôt proches de la membrane nucléaire, avec une accumulation progressive à long terme du nombre de foci MRE11. Ce serait alors la première fois que radiosensibilité, radiosusceptibilité et radiodégénérescence seraient reliées par le modèle du transit d'ATM. Toutefois, de très nombreuses expériences restent à effectuer pour consolider cette hypothèse (335).



**Figure 31.** Représentation schématique des différentes réactions physiques, chimiques, biochimiques et biologiques qui s'effectuent dans le cytoplasme après irradiation.

### 1.3.2.7. Le modèle RIANS et le modèle LQ

Afin de convaincre la communauté scientifique de la pertinence du modèle RIANS, il fallait encore proposer une interprétation biologique des paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  du modèle LQ (cf. équation [3] dans § 1.2.1.4). Même si ce n'est pas directement le sujet de cette thèse (nous renvoyons le lecteur à la publication Bodgi et Foray de 2016 où le modèle RIANS a été

entièrement mathématisé (66), voici les éléments essentiels à retenir. Le modèle LQ peut être considéré comme une expression de la probabilité de Poisson de fournir un nombre de  $N_{\text{let}}$  (D) de CDB létales pour une dose D. L'équation [3] devient :

$$S(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2) = \exp(-N_{\text{let}}(D)) \quad [4]$$

Or, dans le cadre du modèle RIANs, deux types de CDB peuvent être définis :

- le type  $\alpha$ , qui réunit toutes les CDB reconnues par ATM gérées par suture mais non réparables. Nous avons démontré que leur nombre  $N_{\alpha}$  est proportionnel à la dose soit :  $N_{\alpha} = \alpha D$  (66) [5a]
- le type  $\beta$ , qui réunit toutes les CDB non reconnues par ATM et non réparées par suture. Nous avons démontré que leur nombre  $N_{\beta}$  est proportionnel au carré de la dose soit :  $N_{\beta} = \beta D^2$  (66) [5b]

Ainsi le nombre de CDB participant à l'effet léthal,  $N_{\text{let}}(D)$ , peut être exprimé ainsi, et permet de retrouver l'équation [3] et [4] :

$$N_{\text{let}}(D) = N_{\alpha} + N_{\beta} = \alpha D + \beta D^2 \quad [6]$$

Ainsi le rapport  $\alpha/\beta$  désigne la capacité de la cellule à mobiliser ATM pour reconnaître les CDB à une dose D (66).

### 1.3.3. Le modèle RIANs et les effets des faibles doses

Trois effets radiobiologiques ont été décrits spécifiquement aux faibles doses : ce sont l'hormésis, la réponse adaptative et l'hypersensibilité aux faibles doses. Au cours de ces dernières années, nous avons proposé une interprétation biologique de ces trois phénomènes sur la base du modèle RIANs.

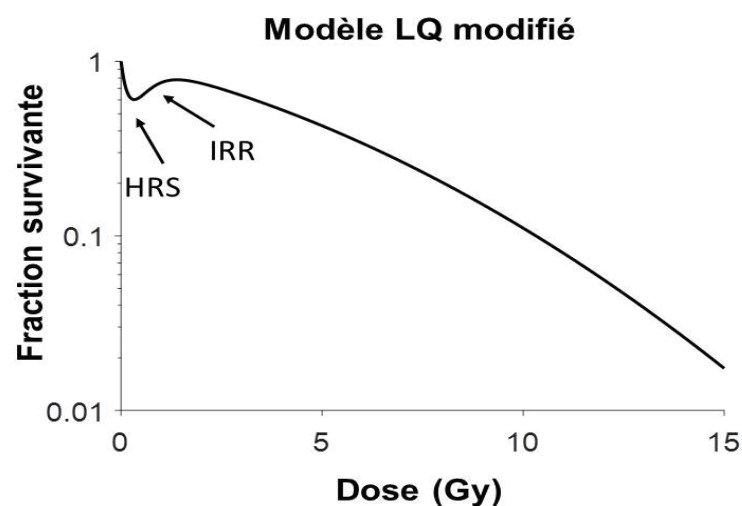
#### 1.3.3.1. L'hyper-radiosensibilité aux faibles doses

Décrite pour la première fois par Lambin et al (351) et Marples and Joiner (352), l'hyper-radiosensibilité aux faibles doses (*hypersensitivity to low dose*, HRS) entraîne, pour une seule dose  $d_{\text{HRS}}$  située entre 1 et 800 mGy, une réduction significative de la survie clonogénique et aboutit ainsi à un effet biologique équivalent à une dose beaucoup plus

forte (353). La dose à laquelle on observe l'effet HRS le plus important sera nommée  $d_{\text{HRSmax}}$ . A des doses supérieures à  $d_{\text{HRSmax}}$ , la survie augmente progressivement et ce phénomène est appelé radiorésistance induite (ou IRR pour induced radioresistance) car de nombreux auteurs ont suggéré que cette remontée de la courbe était due à une activation des processus biologiques aboutissant à la radiorésistance. Pour décrire le phénomène HRS/IRR, Mike Joiner a proposé une modification empirique du modèle LQ pour ajuster les données expérimentales (352, 354) :

$$S(D) = e^{-\alpha_r \left[ 1 + \left( \frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1 \right) e^{-\frac{D}{d_c}} \right] D - \beta D^2} \quad [7]$$

Joiner a ainsi considéré que le paramètre  $\alpha$  du modèle LQ n'est pas constant mais varie en fonction de la dose  $D$ . Le paramètre  $\alpha_s$  représente la pente initiale de la courbe de survie pour les très faibles doses ;  $\alpha_r$  représente la courbe initiale de la courbe de survie décrite par le modèle LQ, donc extrapolée à des fortes doses,  $d_c$  est la dose qui induit le changement entre HRS et IRR, et  $\beta$  la composante quadratique du modèle LQ (Fig. 32).



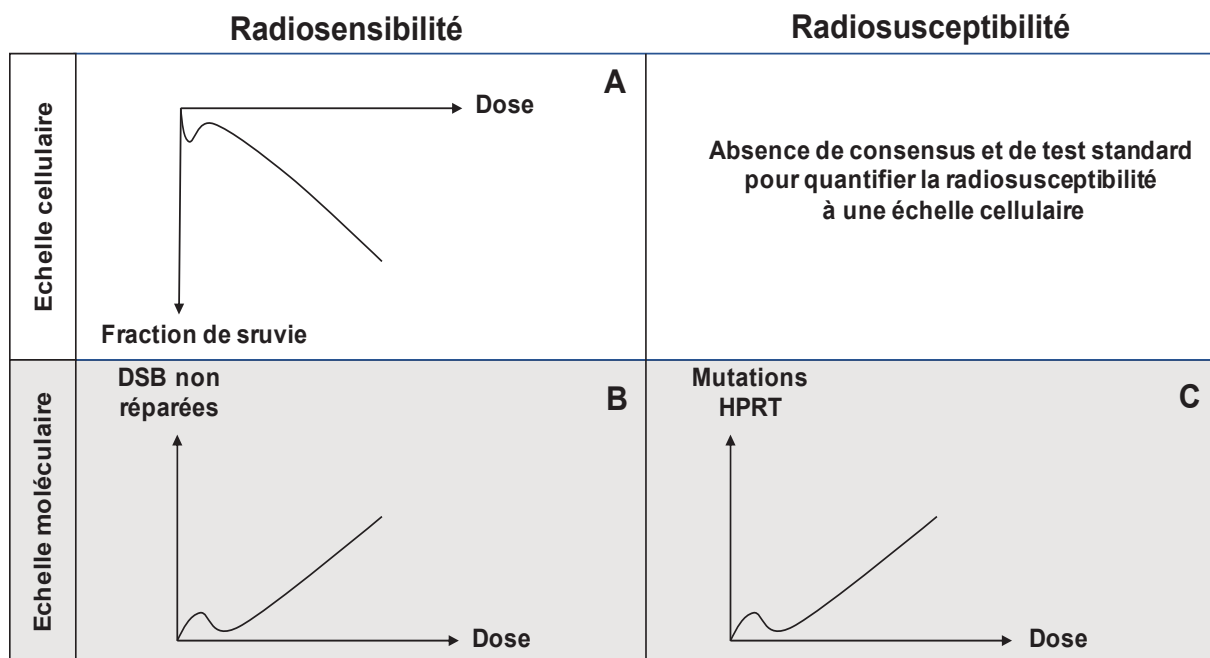
**Figure 32.** Représentation graphique du phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HRS) et du modèle LQ modifié pour le décrire.

Joiner a suggéré que ce phénomène pouvait être dû au changement de la conformation de la chromatine. Le même groupe de recherche a également suggéré qu'il proviendrait d'un défaut des arrêts du cycle G2-M ATM-dépendants. Enfin, d'autres études suggèrent que le



phénomène dépendrait de la réparation des CDB mais sans donner de modèle mécanistique précis (355, 356).

L'hypersensibilité aux faibles doses n'est pas limitée à une diminution de survie cellulaire mais est également associée à une augmentation des CDB non réparées et une augmentation du nombre de micronoyaux. Ce phénomène ne concerne pas uniquement les voies de mort cellulaire et de radiosensibilité. En effet, ce phénomène a également été observé à travers un excès de mutations HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) entre 1 et 500 mGy (357) (Fig. 33).

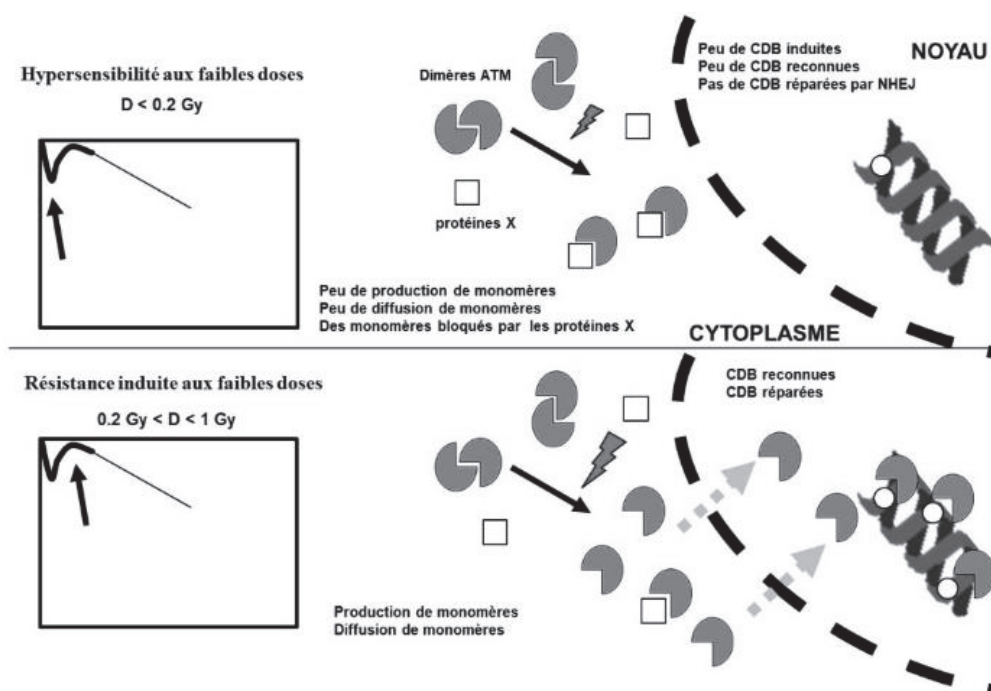


**Figure 33.** Illustration schématique de l'hypersensibilité aux faibles doses (HRS) par la différence entre radiosensibilité et radiosusceptibilité. La survie cellulaire (**A**) et les cassures double-brin (DSB) non réparées (**B**) sont les paramètres les plus pertinents pour quantifier la radiosensibilité (risque de réactions tissulaires attribuables à la mort cellulaire). Le taux des mutations de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyle transférase (HPRT) (**C**) est l'un des paramètres les plus pertinents pour quantifier la radiosusceptibilité (risque de cancer radio-induit). Il convient de noter qu'il n'existe pas encore de paramètre consensuel pour quantifier la transformation cellulaire.

La HRS ne peut pas tuer *spécifiquement* les cellules tumorigènes, comme certains auteurs le suggéraient pour expliquer les aspects bénéfiques des radiations (358) : ce phénomène peut produire un excès de transformation cellulaire (radiosusceptibilité) et/ou un excès de mort cellulaire (radiosensibilité) (357) (Fig. 33). De plus, l'ampleur maximale de la HRS observée dans les cellules humaines est généralement limitée à 25 % de survie cellulaire : même si la HRS tuait spécifiquement les cellules tumorigènes, son action serait

limitée à une minorité de cellules irradiées (353, 359). L'ampleur maximale de la HRS a été observée à une dose de  $d_{HRSmax}$  entre 0.1 et 0.8 Gy (la  $d_{HRSmax}$  la plus fréquente est 0.2 Gy) correspondant à un effet biologique équivalent à une dose 5 à 10 fois plus élevée. De plus,  $d_{HRSmax}$  peut également varier en fonction du débit de dose (353, 359). La HRS a été généralement observée dans des cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire et pas dans des cellules radiorésistantes, ni dans des cellules hyperradiosensibles (66, 359).

Que dit le modèle RIANs ? Si la dose est faible, moins de CDB et moins de monomères ATM seront produits. Pour les cellules de groupe I (RIANs rapide), le nombre de monomères ATM reste encore très important pour reconnaître le peu de CDB induites par les faibles doses : la courbe de survie ne change pas. En revanche pour les cellules de groupe II (RIANs retardé par les protéines X), le nombre de monomères ATM qui diffusent dans le noyau peut être tellement réduit que plus de 2 CDB ne sont pas reconnues (donc seront non réparées) ; la courbe de survie baisse alors brutalement. Si une plus forte dose est émise, le nombre de monomères ATM qui diffusent dans le noyau permettra une meilleure reconnaissance. Nous avons modélisé ces scénarios et montré que le modèle RIANs pouvait expliquer le phénomène HRS et aboutir à la formule [7] vue précédemment (66) (Fig. 34).



**Figure 34.** Illustration schématique du phénomène HRS par le modèle du transit d'ATM. A des doses proches de  $d_{HRSmax}$ , le faible nombre de monomères d'ATM est séquestré par les protéines X dans les cellules de groupe II. Le peu de CDB induites sont alors non reconnues et non réparées. La courbe de survie baisse brutalement. En augmentant la dose, le nombre de monomères d'ATM augmente et certains peuvent passer dans le noyau pour reconnaître les CDB en dépit d'un nombre un peu plus élevé que précédemment.

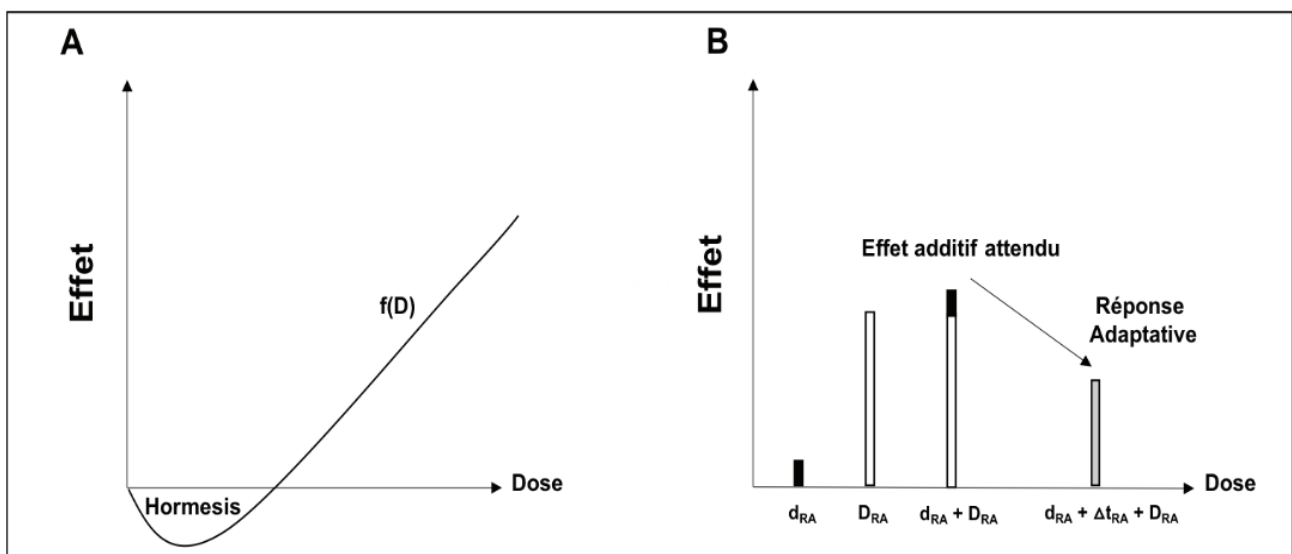
### I.3.3.2. L'hormésis et la réponse adaptative

Le jargon scientifique est souvent source de confusion, notamment lorsque l'emploi actuel d'un terme spécifique ne correspond pas nécessairement à sa définition historique, ou lorsqu'il est utilisé dans un domaine de recherche différent de celui dont il a été défini. Les termes "réponse adaptative" et "hormésis" sont des exemples typiques de cette confusion. Nous avons publié deux publications distinctes sur le sujet (360, 361) :

- **La réponse adaptative (RA)**, est un terme ancien largement utilisé au XIX<sup>ème</sup> siècle en biologie évolutionnaire pour évoquer une adaptation d'un organisme à long terme (pendant quelques générations). Progressivement, la notion de temps nécessaire à l'adaptation a disparu et la définition suivante de la RA est maintenant proposée : la RA est "un processus d'adaptation qui permet de survivre dans des conditions défavorables" (362). En 1984, Olivieri et al. ont introduit pour la première fois ce terme pour décrire un phénomène radiobiologique survenant après deux doses successives (363) : la première dose, appelée "priming dose" ( $d_{RA}$ ), précède une certaine période de temps ( $\Delta t_{RA}$ ), puis une dose plus élevée appelée "challenging dose" ( $D_{RA}$ ). Le phénomène de RA se produit lorsque l'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est inférieur à celui de  $D_{RA}$  (Fig. 35). La dose  $D_{RA}$  produit systématiquement des effets délétères et/ou mortels. La dose  $d_{RA}$  est généralement interprétée comme un stimulus des défenses cellulaires pour répondre à  $D_{RA}$  (364, 365). Cependant, la nature de ces défenses n'avait toujours pas été identifiée jusqu'à présent.
- **L'hormésis** (du grec ancien, stimulus), est plus récent et moins fréquemment utilisé que la RA. Le terme "hormésis" a été introduit pour la première fois en 1943 par Southam et Ehrlich qui ont découvert que les extraits d'écorce de cèdre rouge stimulaient la croissance de certains champignons à de faibles concentrations et étaient toxiques à de fortes concentrations (366). T.D. Luckey a introduit pour la première fois le terme "hormésis" en radiobiologie dans les années 1980 pour décrire un phénomène dépendant de la dose sous la forme d'une fonction mathématique en forme de J ou de U, impliquant que l'hormésis est une fonction continue de la dose (ou débit de dose). Il y existerait donc une dose-seuil en-deçà de laquelle l'exposition au stress est "positive" et au-dessus de laquelle le stress est "nuisible" (367, 368). La nature non linéaire du phénomène hormésis a été un aspect important du débat sur le modèle linéaire sans seuil (369, 370). La notion d'*effet stimulant* a été

progressivement remplacée par la notion d'*effet bénéfique*, par opposition à l'effet toxique observé à fortes doses.

Paradoxalement, la définition de l'hormésis en radiobiologie, suggère l'existence d'une première dose (le "stimulus") alors que le terme d'hormésis n'était pas utilisé comme se produisant après une succession de doses. Réciproquement, la définition de la réponse adaptative suggère une adaptation à long terme alors que le temps entre les doses  $d_{RA}$  et  $D_{RA}$  est court (quelques heures). En revanche, si les données RA sont tracées en fonction de la priming dose  $d_{AR}$ , une courbe en J apparaît (Fig. 35), ce qui démontre que la RA pourrait être considérée comme un phénomène hormétique. Cependant, l'inverse n'est pas vrai : toutes les données d'hormésis ne peuvent être décrites comme un phénomène RA car elles sont principalement obtenues à partir d'une dose unique (361). Par conséquent, ces définitions, fondées sur des données historiques et correspondant à des protocoles expérimentaux spécifiques, suggèrent que la RA peut conduire à une réduction du risque lié à une dose élevée ( $D_{RA}$ ) par une autre dose plus faible ( $d_{RA}$ ), tandis que l'hormésis décrit des effets biologiques bénéfiques sans induction d'une autre dose. De plus, l'hormésis et la RA ne se produisent pas nécessairement dans la même gamme de doses : la dose  $D_{RA}$  est généralement équivalente à quelques Gy, tandis que l'hormésis est observé à des doses beaucoup plus faibles allant du mGy au cGy, tout comme la dose  $d_{RA}$  (290).



**Figure 35.** Différences entre l'hormésis et le phénomène de réponse adaptative. **A** : l'hormésis est définie comme une fonction continue de la dose avec laquelle un effet stimulant (bénéfique ?) se produit à des doses sous-inhibitrices. L'hormésis est l'effet d'une dose unique ou d'un débit de dose (on peut l'observer lors d'une exposition chronique aux rayonnements). **B** : la réponse adaptative (RA) est définie comme un effet infra-additif observé après la succession d'une première faible dose (priming dose)  $d_{RA}$  et d'une plus forte dose (challenging dose)  $D_{RA}$ , séparées par une période  $\Delta t_{RA}$ . (L'effet de  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA} < D_{RA}$ ).

*Réponse adaptative*

En résumé, depuis les années 1980 jusqu'à aujourd'hui, la RA a été observée avec le scénario  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  et avec les valeurs suivantes : (0.001-0.5 Gy) pour les  $d_{RA}$ , entre 1 et 48 h pour le  $\Delta t_{RA}$  et entre 0.1 et 6 Gy pour le  $D_{RA}$ . A l'exception notable des travaux du groupe d'Olivieri qui ont utilisé la thymidine tritiée (363), dans la grande majorité des cas (> 83 %)  $d_{RA}$  est délivrée en moins d'une minute (c'est-à-dire à des débits de dose allant de 1 mGy.min<sup>-1</sup> à 1 Gy.min<sup>-1</sup>). La  $D_{RA}$  est généralement délivrée en moins de 5 min à environ 1 Gy.min<sup>-1</sup>.

Quand on fait la revue des protocoles concernant la RA, il est important de constater que la priming dose  $d_{RA}$  est, dans plus de 90 % des études, inférieure à 0.05 Gy mais supérieure à 0.001 Gy. Comme on l'a vu plus haut, le stress oxydatif causé par 1 Gy de rayons X ou  $\gamma$  induit simultanément environ 10 000 dommages de base (DB), 1000 cassures simple-brin d'ADN (CSB), et 40 cassures double-brin d'ADN (CDB) par cellule diploïde humaine. Ces taux d'induction de dommages de l'ADN ne dépendent pas de la radiosensibilité des cellules (267). Par conséquent, la priming dose  $d_{RA}$  induit généralement moins de 500 DB, 50 CSB, et 2 CDB par cellule. Ces chiffres correspondent à un stress oxydatif significativement plus faible que celui induit par les dommages spontanés de l'ADN habituellement observés dans les cellules radiorésistantes humaines (267). Par conséquent, de tels dommages de l'ADN ne peuvent affecter de façon significative la survie cellulaire ni l'instabilité génomique. En revanche, dans les cellules radiosensibles, le stress oxydatif dû à l'instabilité génomique spontanée cause une quantité faible mais significative de dommages de l'ADN, plus importante que celle observée dans les cellules radiorésistantes. Ainsi, seulement dans les cellules radiosensibles, le stress oxydatif spontané ajouté à celui causé par la dose initiale  $d_{RA}$  peut entraîner une quantité significative de dommages de l'ADN. Si un certain niveau de stress oxydatif est requis pour la survenue d'un phénomène RA, il devrait se produire préférentiellement dans les cellules radiosensibles.

Rappelons que les périodes moyennes de réparation sont d'environ 5 à 10 min pour les DB, 10 à 20 min pour les CSB et 50 à 60 min pour les CDB. L'examen des protocoles de RA révèle que le  $\Delta t_{RA}$  est fortement dépendant des valeurs  $d_{RA}$  et  $D_{RA}$  et qu'il est généralement supérieur à 1 h mais inférieur à 24 h (361). Dans les cellules radiorésistantes, 24 h post-irradiation correspond à une réparation complète de tous les dommages de l'ADN induits par le  $d_{RA}$ . En revanche, dans les cellules radiosensibles, il est possible que certaines

CDB restent non réparées ou mal réparées après  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ . Les protéines de réparation et de signalisation de l'ADN peuvent donc encore être activées pendant et après  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$ . Par conséquent, comme on l'a supposé plus tôt et comme le suggère la littérature, la RA devrait être beaucoup moins fréquente dans les cellules radiorésistantes puisque  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  ne produit pas d'effet biologique significatif avant l'exposition au  $D_{RA}$  (361).

Dans la grande majorité des cas, le  $D_{RA}$  est supérieur à 0.5 Gy et fréquemment de 2 Gy, ce qui correspond à une dose élevée (la dose de 2 Gy est généralement celle administrée par séance de radiothérapie). Comme défini par notre laboratoire, une dose de 2 Gy génère une fraction de survie à 2 Gy (SF2) variant respectivement de 1 à 10 %, de 10 à 60 % et de 60 à 80 % pour les cellules humaines respectivement hyper-radiosensibles (groupe III), modérément radiosensibles (groupe II) et radiorésistantes (groupe I) (67, 189, 207). Lorsque l'on examine la littérature, on n'observe pas de RA dans les cellules dont la SF2 est inférieure à 10 % et supérieure à 60 %, ce qui confirme que la RA est plus souvent observée dans les cellules montrant une radiosensibilité intermédiaire. Cette conclusion est également en accord avec le fait que la radiorésistance est une "notion bornée" : les cellules ne peuvent pas réparer plus de dommages de l'ADN lorsque la réparation de l'ADN est déjà complète et que le SF2 ne dépasse pas 80 % dans les cellules humaines (67, 189, 207). Inversement, dans les cellules hyper-radiosensibles, la quantité de mort cellulaire ou de mutations est si élevée (l'effet du  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  est déjà délétère) que les conséquences biologiques d'une exposition au  $D_{RA}$  sont, de toutes façons, irréversibles.

Dans toutes les publications concernant la RA citées ci-dessus, deux remarques peuvent être faites :

- Dans le cas des expériences publiées avec des lymphocytes circulants, tous les donneurs n'étaient pas nécessairement RA positifs et donc le rapport entre les donneurs positifs et négatifs peut varier selon les études. Aucune explication génétique n'a été fournie.
- Dans les cellules humaines RA positives hormis les lymphocytes circulants répertoriés, plus de 50% sont des lignées cellulaires tumorales, 30% sont des cellules immortalisées ou transformées et plus de 75 % sont connues pour être radiosensibles.

Ces remarques confirment la conclusion selon laquelle l'apparition de la RA est favorisée lorsque les cellules présentent un niveau anormalement élevé d'instabilité génomique et/ou de radiosensibilité.  $\Delta t_{RA}$  est déjà délétère (371). Tous ces exemples suggèrent que la RA se

produit préférentiellement dans les cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire (donc de type groupe II et donc évoquant un retard de transit d'ATM. La RA peut cependant se produire dans les cas de cellules radiorésistantes, mais à des doses non pertinentes sur le plan biologique (372).

### *Hormésis*

Il existe très peu de données concernant l'hormésis sur les cellules humaines. La large majorité de la littérature est composée de critiques de données, de commentaires ou de lettres (361). Les articles contenant des données originales représentent seulement un tiers de l'ensemble des publications et seulement 25% d'entre elles concernent les cellules humaines (369, 370, 373-390). Notre analyse documentaire est conforme à la conclusion selon laquelle les données sur les animaux/plantes/micro-organismes représentent la grande majorité des rapports accumulés sur les effets des expériences à faibles doses et à faibles débits de dose (361). Le taux de croissance, le développement de la croissance, la reproduction, l'immunité, l'incidence du cancer et la durée de vie ont d'abord été considérés par T.D. Luckey comme les principaux paramètres utilisés dans ces données.

Parmi les données humaines sur l'hormésis, les expériences *in vitro* concernent principalement des cellules transformées ou tumorales, ce qui pose la question de la spécificité du phénomène vis-à-vis du type cellulaire. En effet, même si les cellules transformées, immortalisées ou tumorales sont faciles à amplifier *in vitro* grâce à leur capacité de croissance en culture, elles ne reflètent pas toutes les spécificités de la réponse au rayonnement des tissus sains.

Parmi les données "macroscopiques" sur l'hormésis, les études épidémiologiques concernent généralement l'incidence du cancer ou la mortalité par cancer des survivants de la bombe A, ce qui soulève le paradoxe que l'hormésis peut stimuler la croissance cellulaire dans les expériences *in vitro* tout en consistant à réduire l'incidence du cancer lorsque les données épidémiologiques sont considérées. Ces conclusions seront discutées ci-après.

Il existe deux types d'études *in vitro* sur l'hormésis dans les cellules humaines : celles qui concernent les effets à faible dose (FD) ou à faible débit de dose (FDD) et celles qui concernent les protocoles de RA. En ce qui concerne les études FD et FDD, une analyse rapide des données de la littérature montre que les protocoles expérimentaux varient considérablement d'un groupe de recherche à l'autre et qu'il n'existe même pas de consensus

clair quant à la gamme de doses où l'hormésis est observé. En effet, de 1980 à 2018, les FDD étudiées variaient de  $0.1 \text{ mGy}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $0.5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$  (en fait, cette dernière valeur ne peut être considérée comme un débit de dose "faible"). En revanche, les doses les plus fréquentes observées dans l'hormésis se situent entre 20 et 75 mGy (360). Par exemple, en utilisant une lignée fibroblastique pulmonaire humaine d'origine embryonnaire, Velegzhaninov et al. (2018) ont montré qu'une dose unique de 30 à 50 mGy entraînait une diminution de la sénescence (391).

Bien que la prolifération cellulaire ou la clonogénicité soient les critères d'évaluation les plus fréquemment utilisés dans les expériences *in vitro* sur l'hormésis dans les cellules humaines, l'analyse de la littérature suggère que l'hormésis est généralement observé dans des cellules normales mais pas dans les cellules tumorales. Il est intéressant de noter que l'hormésis est considéré comme un phénomène "bénéfique" lorsqu'une prolifération cellulaire accrue est observée alors que le manque de contrôle de la croissance doit être considéré comme négatif, quel que soit le type de cellules. De plus, les lignées cellulaires dans lesquelles l'hormésis a été observé se sont révélées plutôt radiorésistantes. À l'inverse, il convient de rappeler que la RA a surtout été observée dans des cellules radiosensibles, ce qui représente une différence importante entre l'hormésis et la RA (360, 361). Aucun mécanisme consensuel n'est proposé pour expliquer l'hormésis dans les expériences *in vitro*. Les expériences *ex vivo* sur l'hormésis chez l'homme impliquent différents protocoles expérimentaux. Elles consistent généralement à prélever du plasma sanguin ou des cellules sur des individus exposés entre 1 et 15 mSv/an. Cependant, la nature de l'exposition diffère radicalement dans cette série de données : résidents de bâtiments contaminés au cobalt 60 ou vivant à proximité d'une centrale nucléaire, travailleurs exposés, patients atteints d'une maladie neurodégénérative ou habitants des zones à fort rayonnement naturel (361). Comme pour les expériences *in vitro*, il n'y avait pas encore de consensus sur un modèle mécanistique pour expliquer ce phénomène.

L'exemple le plus célèbre d'une mise en évidence de l'hormésis dans les études épidémiologiques est la diminution du risque de leucémie et/ou de la mortalité chez les survivants de la bombe atomique (392, 393). Les données d'Hiroshima suggèrent que le taux de mortalité par leucémie pour 100 000 personnes, déterminé sur une période de 35 ans, diminue significativement autour d'une exposition de 75 mGy (394). Cependant, cette conclusion fait encore l'objet de controverses et de débats (395, 396). Il est intéressant de



noter que d'autres rapports ont également montré que l'incidence du cancer ou la mortalité par cancer diminue lorsque l'exposition se situe entre 20 et 75 mGy, notamment lorsque les cancers des ovaires, du côlon ou du sein sont considérés (385, 392).

En ce qui concerne les données des FDD, seuls trois rapports font état d'une incidence plus faible du cancer. Tous ces rapports concernent des zones surélevées (en altitude) aux États-Unis. Dans ces études, ces zones surélevées ont été considérées comme étant associées à une radioactivité naturelle plus élevée (376, 377). Toutefois, les coefficients de corrélation étaient faibles et le lien direct entre l'altitude et radioactivité naturelle peut être une source d'artéfacts. En outre, une analyse rigoureuse de la signification statistique des différences observées entre les valeurs de radioactivité naturelle n'a pas été effectuée dans ces études. Une étude similaire a été menée en Pologne entre 0.5 et 4.6 mSv/an et présente des données plus convaincantes : pour la première fois, l'effet hormésis a été quantifié avec le débit de dose et défini comme une diminution de 1.17 %/mSv/an de tous les décès par cancer (373). Cependant, cet effet n'est pas statistiquement significatif pour les cancers du poumon, probablement à cause du tabagisme qui représente un facteur de confusion majeur (373). Il est intéressant de noter que ces données quantitatives ne sont pas compatibles avec un phénomène d'hormésis qui serait observé dans des zones de radioactivité naturelle plus élevées : en fait, si nous appliquions la règle de diminution de 1.17%/mSv/an pour tous les décès par cancer, une diminution de plus de 70 % des décès par cancer serait prévue à Ramsar (Iran), la zone la plus radioactive du monde (70 mSv/an), ce qui n'a jamais été observé et aurait été très facile à mettre en évidence. Par conséquent, toutes ces données suggèrent que si l'hormésis est causée par la radioactivité naturelle, elle pourrait ne concerner que des zones à faible rayonnement naturel, ce qui contredit certaines hypothèses et surtout la croyance d'un effet bénéfique liée aux plus hauts rayonnements naturels. En d'autres termes, l'hormésis devrait concerner des zones de radioactivité naturelle inférieure à 2.5 mSv/an, ce qui correspond à la radioactivité naturelle moyenne au niveau mondial et peut expliquer pourquoi l'effet hormésis ne peut être mesuré facilement (360).

En plus des données épidémiologiques, il existe des études cliniques sur l'hormésis, mais, une fois encore, celles-ci ne représentent qu'un nombre très réduit de cas. Les deux rapports référencés concernent un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde traité par source chaude au radon et trois autres patients atteints respectivement de cancer de la

prostate, de cancer de la prostate avec métastases osseuses et de colite ulcéreuse et soumis à un traitement répété à faible dose. En raison du faible nombre de cas et du fait qu'ils ne présentent pas d'arguments quantifiés, ces deux rapports ne peuvent être rigoureusement considérés comme une preuve significative de l'existence de l'hormésis chez l'homme (360). D'après les données publiées sur les faibles doses, quelle que soit leur forme (*in vitro*, *ex vivo*, épidémiologique ou données sur la réponse adaptative), l'hormésis a été observé dans des cellules humaines à des doses spécifiques allant de 20 à 75 mGy administrées à un débit de dose supérieur à 0.1 mGy/min). En ce qui concerne les données FDD publiées, la plupart des études chez l'humain ont révélé un phénomène hormétique à un débit de dose spécifique variant entre 0.4 et 15 mSv/an. Toutefois, il faut souligner que la robustesse statistique des données FD et FDD est inégale (360) :

- la même gamme de doses a été obtenue dans des conditions différentes et indépendantes (données *in vitro*, *ex vivo*, épidémiologiques ou RA) dans des études portant sur différentes lignées cellulaires et sous-populations avec différents paramètres cellulaires ou épidémiologiques.
- la gamme des débits de dose n'est étayée que par quelques études épidémiologiques, fondées sur des risques calculés et dans lesquelles un certain nombre de facteurs confondants (altitude, rayonnement naturel, tabagisme, etc.) n'ont pas été pris en compte.

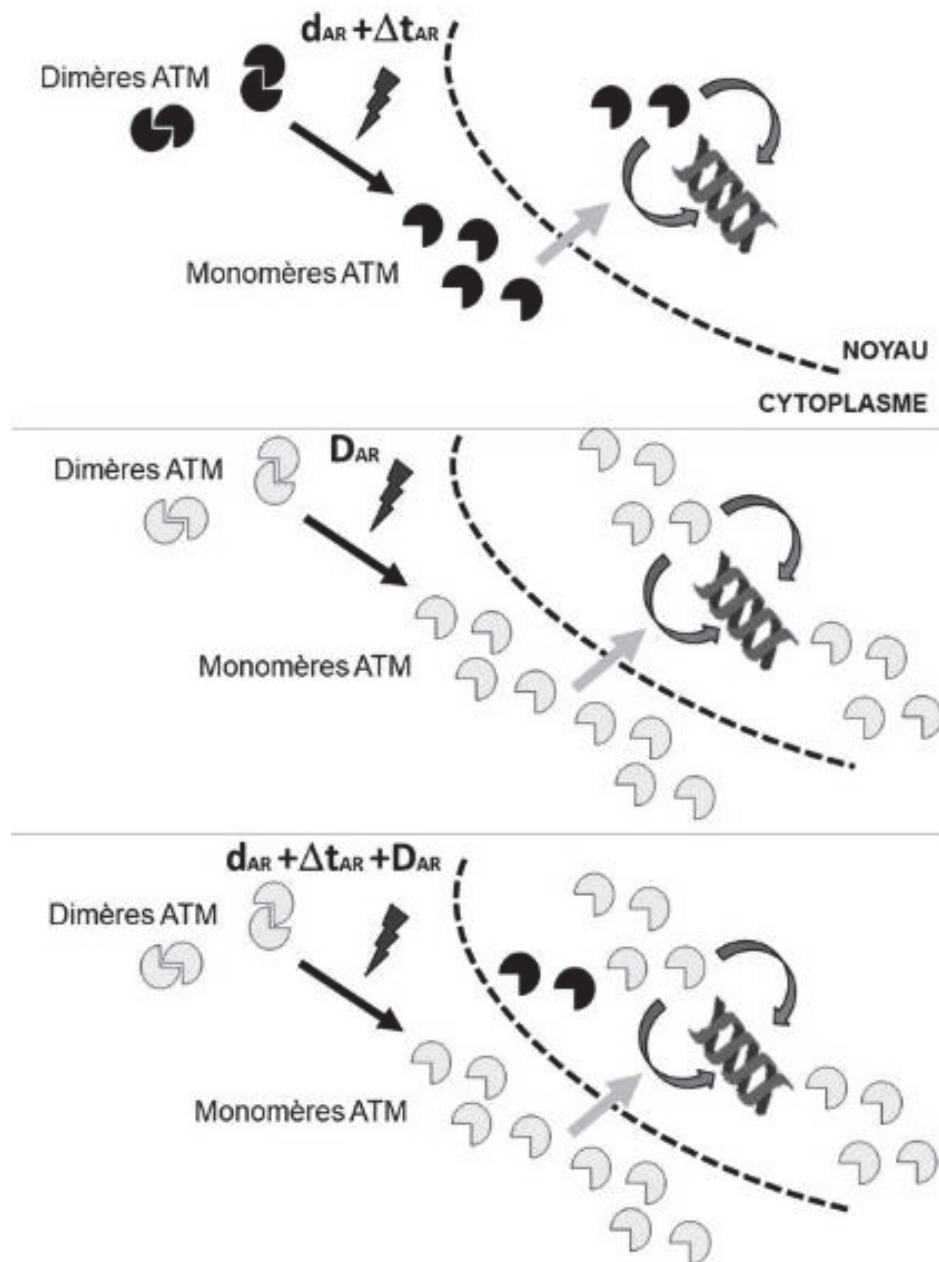
Dans les fibroblastes humains, une gamme de 20–75 mGy correspond à 200–750 DB, 20–75 CSB et 0.8–3 CDB par fibroblaste, et beaucoup moins par lymphocyte. Ainsi, à des doses inférieures à 25 mGy, on ne s'attend pas à ce qu'il y ait de CDB radio-induite. Aux doses inférieures à 1 mGy, on ne s'attend à aucune CSB radio-induite. Toutes ces valeurs sont du même ordre que les dommages spontanés de l'ADN habituellement évalués dans les cellules radorésistantes humaines dans lesquelles on observe généralement 0-2 CDB spontanées (339). Inversement, dans les cellules radiosensibles, on peut observer plus de dommages de l'ADN spontanés et aussi quelques dommages supplémentaires de l'ADN produits pendant la réparation à cause de l'instabilité génomique (267). Par conséquent, ces données suggèrent qu'un phénomène d'hormésis se produisant à 20-75 mGy devrait être :

- observé plutôt dans les cellules radorésistantes que dans les cellules radiosensibles.

- causé par un stress oxydatif qui facilite un processus biochimique ou biologique qui n'est pas nocif pour la cellule (c'est-à-dire équivalent à une dose sublétale). D'ailleurs, certains auteurs ont proposé le terme "eustress" pour décrire ce stress "positif" (397). A notre connaissance, aucun modèle mécanistique reliant les aspects moléculaires, cellulaires et cliniques n'avait été proposé jusqu'à présent pour expliquer quantitativement le rôle positif d'un tel "eustress" dans les cellules radiorésistantes humaines.

*Vers un modèle unifié pour les faibles doses ?*

**La réponse adaptative** : Comme nous l'avons vu plus haut, la RA est observable spécifiquement dans les cellules présentant une radiosensibilité intermédiaire. Dans le cadre de la théorie du transit d'ATM, pour des cellules radiorésistantes (groupe I), le flux d'ATM est amplement suffisant pour que le bénéfice de dRA +  $\Delta tRA$  avant la délivrance de DRA soit significatif. En conséquence, le phénomène RA n'est pas mesurable pour des cellules radiorésistantes. Pour les cellules hyperradiosensibles (groupe III), l'effet de dRA +  $\Delta tRA$  est déjà délétère et donc s'ajoute à celui de DRA : la RA n'est pas observée non plus. Dans le cas de cellules modérément radiosensibles (groupe II) soumises à une dRA comprise entre 0.001 et 0.5 Gy, la diffusion des monomères d'ATM est environ 2 fois moins importante que dans les cellules radiorésistantes. Par exemple, environ 40 000 et 20 000 monomères d'ATM passent respectivement la membrane nucléaire après 0.2 Gy suivi de 6 h (dRA +  $\Delta tRA$ ) pour les cellules radiorésistantes et modérément radiosensibles. Toutefois, une dose de 2 Gy (DRA) produit en 10 min, pour le même type de cellules respectivement, environ 30 000 et 16 000 monomères d'ATM (201). Pendant  $\Delta tRA$  les monomères d'ATM produits par dRA peuvent perdre leur activité en se "redimérisant". Pourtant, même si environ 20 % de monomères d'ATM apportés par dRA restent actifs pendant  $\Delta tRA$  (soit environ 4 000 monomères dans notre cas), cet apport représente environ 25 % (4 000 sur 16 000) des monomères d'ATM actifs supplémentaires pour répondre à DRA. Dans ce cas précis, un  $\Delta tAR$  trop court ne permettrait pas un flux suffisant ; un  $\Delta tAR$  trop long aboutirait à des monomères inactifs. Ainsi, dans les cellules radiosensibles de groupe II, dAR +  $\Delta tAR$  pourrait donc produire une stimulation de la reconnaissance des DSB par un apport supplémentaire de monomères d'ATM. L'occurrence et l'ampleur du phénomène RA dépendrait donc fortement de la radiosensibilité des cellules irradiées (Fig. 36).



**Figure 36.** Modèle du transit d'ATM et réponse adaptative : A la suite d'une exposition à une dose  $d_{RA}$  des monomères d'ATM diffusent dans le noyau. Après une période de temps  $\Delta t_{RA}$ , un excès de monomères d'ATM subsiste dans le noyau. Si les cellules sont exposées à une forte dose  $D_{RA}$ , de nombreux monomères d'ATM sont produits auxquels s'ajoute l'excès de monomères produits par  $d_{RA} + \Delta t_{RA}$  qui contribuent à réduire l'effet de  $D_{RA}$ . L'effet  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  est donc dans ce cas inférieur à l'effet produit par la dose  $D_{RA}$  seule.

Le phénomène RA (c'est-à-dire la réduction de l'effet biologique d'une forte dose de radiation par une dose plus faible), n'est donc pas un artéfact techniquement mais il est observable mais dans des conditions expérimentales spécifiques :

- Un scénario d'exposition de type  $d_{RA} + \Delta t_{RA} + D_{RA}$  doit être appliqué, avec  $d_{RA}$  comprise entre 0.001 et 0.5 Gy,  $\Delta t_{RA}$  entre 2 et 24h et  $D_{RA}$  entre 0.1 et 5 Gy.

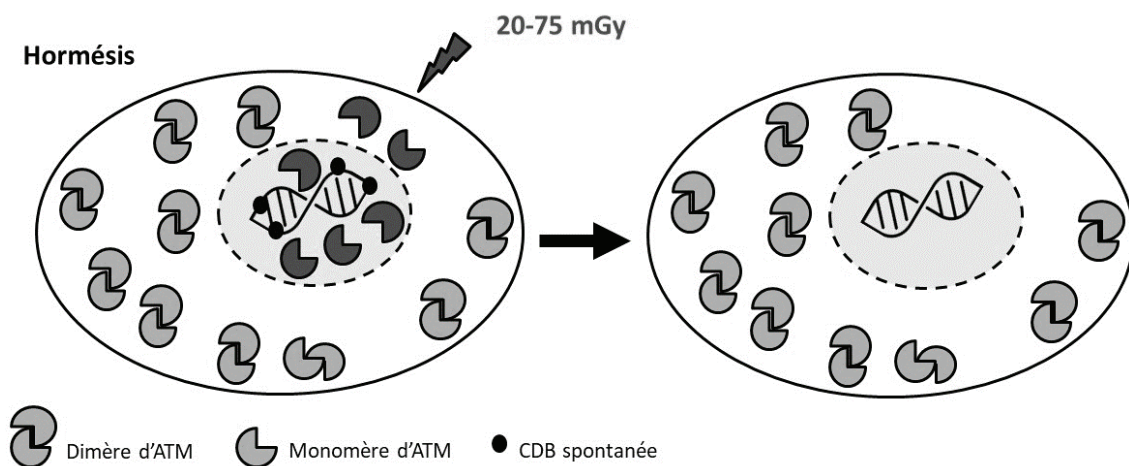
- Ce phénomène peut être observé sur de nombreux types cellulaires mais les cellules doivent être caractérisées par une certaine radiosensibilité ou une certaine radiosusceptibilité (groupe II) : la RA n'est pas mesurable sur les cellules radiorésistantes ni sur les cellules hyper-radiosensibles. Elle dépend donc fortement du statut génétique.
- Le bénéfice de ce phénomène pour l'homme reste très limité, voire inexistant, d'autant plus que la première condition rend ce scénario d'exposition réalisable quasi exclusivement en laboratoire. Toutefois, en clinique, il faudrait vérifier si un scanner de positionnement suivi d'une dose de radiothérapie peut conduire à la radioprotection de la tumeur.
- Tout comme pour le phénomène HRS, la théorie du transit d'ATM apporte aujourd'hui une explication moléculaire à ce phénomène.
- Contrairement aux hypothèses historiques et bien que la dose d'amorçage fasse penser à une vaccination, ce phénomène n'a rien à voir avec les lois de l'immunologie.
- Après bien des dérives sémantiques et des interprétations erronées, l'existence de la RA, basée sur la succession d'une dose faible et d'une dose forte (qui est souvent elle-même toxique ou mutagène) et qui n'est observée que sur des cellules radiosensibles ou transformées, ne constitue pas une preuve que les faibles doses soient bénéfiques

**L'hormésis :** Comme on l'a vu plus haut, le phénomène d'hormésis, déclenché par une dose unique  $d_{\text{horm}}$  appartenant à la gamme de dose 20-75 mGy, est observé préférentiellement dans les cellules radiorésistantes. La reconnaissance et la réparation des CDB radio-induites est complète pour des doses inférieures ou égales à 2 Gy dans ces cellules (339). Cependant, elles peuvent présenter une instabilité génomique faible mais significative avec des taux de CSB spontanées dues aux espèces réactives de l'oxygène ou à une activité de nucléase (398). Cette activité de nucléase spontanément élevée contribue au vieillissement et à l'instabilité génomique en augmentant les dommages de l'ADN (398, 399). Dans la gamme de doses où est observé l'hormésis, le nombre de CSB radio-induites ne dépasse normalement pas 75 CSB par cellule, ce qui, en plus, n'est statistiquement pas suffisant pour créer une CDB supplémentaire ; rappelons qu'une CDB ne peut être le résultat de 2 CDB sauf si celles-ci sont suffisamment proche (moins de 50 bp) ou si la

deuxième CSB est une conséquence anormale de la réparation de la première (cf. § I.2.1.1). En revanche, même s'il y a peu ou pas de CDB induites, un flux de plusieurs milliers de monomères d'ATM diffusent très vite dans le noyau (360). Cet apport de monomères d'ATM, sans influencer sur l'efficacité de la reconnaissance des CDB induites par une dose  $d_{\text{horm}}$  pourrait en revanche permettre aux cellules de réparer des dommages spontanés (CDB ou CSB). Ainsi, cette "détoxification" des cellules permettrait de réduire les éventuels risques de cancer ou de vieillissement liés à ces dommages spontanés, évidemment à condition que ceux-ci soient associés à un risque clinique particulier. Cet effet ne pourrait pas se produire dans les cellules radiosensibles, notamment celles issues d'individus prédisposés au cancer, puisqu'au contraire,  $d_{\text{horm}}$  produirait directement ou indirectement des CDB liées à l'hyper-recombinaison en plus des dommages spontanés qui peuvent être plus nombreux pour ce type de cellules instables génomiquement que pour les cellules radiorésistantes. L'apport des monomères d'ATM n'arriverait pas à compenser les dommages supplémentaires induits par  $d_{\text{horm}}$ . Tout comme HRS et RA, le phénomène d'hormésis aurait donc lui aussi un sens au niveau moléculaire (Fig. 37).

Dans le cadre du modèle de transit d'ATM, dans la mesure où les paramètres choisis dépendent de l'activité de la kinase ATM dans le noyau, les conséquences biologiques de l'hormésis peuvent être d'une grande diversité. En effet, la protéine ATM s'est révélée être en amont d'une cascade de phosphorylation de ses substrats en obéissant à une hiérarchie fonctionnelle et temporelle : phosphorylation des substrats ATM impliqués dans la reconnaissance des dommages de l'ADN, puis dans la réparation de ces dommages, puis dans le contrôle du cycle cellulaire et enfin dans les voies de mort cellulaire (400). Il est intéressant de noter que toutes les étapes de la réponse moléculaire et cellulaire aux radiations sont connues pour être facilitées par une activité kinase nucléaire élevée d'ATM, ce qui rend notre modèle cohérent avec le phénomène d'hormésis. Les conséquences d'une forte activité d'ATM peuvent également être observées à l'échelle cellulaire en aval des étapes de reconnaissance et de réparation des CDB. C'est notamment le cas des caractéristiques cliniques qui se produisent à l'échelle des tissus, comme les réactions immunitaires et inflammatoires (400). Cependant, des données expérimentales supplémentaires relatives à ATM sont nécessaires pour établir un lien quantitatif et qualitatif entre l'événement cellulaire et les réactions tissulaires.

Ainsi, l'hormésis peut contribuer à réduire la mort cellulaire spontanée, l'instabilité génomique et le vieillissement des cellules radiorésistantes. Toutefois, les conséquences d'un phénomène hormétique peuvent montrer des ampleurs différentes suivant les échelles moléculaires, cellulaires, tissulaires ou cliniques considérées. Par exemple, la reconnaissance et la réparation des CDB et des chromosomes sont des notions "limitées" : lorsque toutes les lésions sont reconnues ou réparées, une dose d'hormésis ne peut pas contribuer à en reconnaître ou à en réparer davantage. Par conséquent, si la reconnaissance ou la réparation des CDB et des lésions chromosomiques sont considérés comme paramètres de mesure de l'hormésis, la réponse à la dose peut présenter un seuil voire n'être pas mesurable à l'échelle moléculaire ou cellulaire mais être observé à une échelle plus grande.



**Figure 37.** Modèle du transit d'ATM (ou RIANS pour *radiation induced ATM nucleo-shuttling*) et hormésis. Une dose comprise entre 20 et 75 mGy produit un grand nombre de monomères d'ATM mais pas de CDB. Dans les cellules radiorésistantes, les monomères d'ATM peuvent déclencher la réparation des CDB spontanées, ce qui peut diminuer le risque de cancer ou de vieillissement accéléré.

Pour la première fois, un modèle mécanistique unifié de réponse aux RI permet d'expliquer à la fois les phénomènes d'hypersensibilité aux faibles doses (HRS), de réponse adaptative (RA) et d'hormésis, ainsi que les phénomènes habituellement observés à des doses utilisées en radiothérapie. Ainsi, à partir de cet outil unique qu'est le RIANS, nous allons pouvoir investiguer les spécificités des effets produits par des répétitions de faibles doses utilisées en radiothérapie LDRT et en comparer les bénéfices avec les modalités plus classiques impliquant de plus fortes doses.

## II. BUTS DE LA THÈSE

---

### *Rappels contextuels*

Si l'on organisait un sondage parmi les radiobiologistes et les radiothérapeutes, la notion de "faibles doses" de radiation s'associerait aisément à celle d'effets cliniques faibles voire négligeables. D'ailleurs, la définition-même de faibles doses de radiation ne fait pas consensus puisqu'à travers les traitements de radiothérapie hyperfractionnés on peut considérer la dose totale (cumulée) comme une forte dose, et la dose par séance (généralement 2 Gy) comme faible. Or, les radiologues ne souscriraient probablement pas à cette définition, accordant l'adjectif "faibles" à des doses délivrées par des scanners de nouvelle génération (de l'ordre du mGy) ou des radiographies dentaires (de l'ordre du nGy). Si l'on prend la toxicité tissulaire comme référentiel, une dose peut être considérée comme faible lorsqu'elle n'entraîne aucune toxicité significative au niveau tissulaire, autrement dit lorsqu'elle reste inférieure à 0.5 Gy. Une telle définition suggère cependant plusieurs remarques :

- Tout d'abord, c'est bien la toxicité radio-induite (radiosensibilité) qui est prise en compte dans cette définition : le seuil de dose choisi ne concerne pas le risque de cancer radio-induit (radiosusceptibilité) ni celui du vieillissement accéléré radio-induit (radiodégénérescence) ;
- Le fait que l'échelle tissulaire soit choisie comme référence n'implique pas pour autant l'absence d'événements au niveau cellulaire et moléculaire ;
- Une telle définition n'interdit donc pas non plus que des effets contradictoires ("délétères" ou "bénéfiques") puissent survenir à des doses inférieures à 0.5 Gy ;
- Cette définition s'applique-t-elle vraiment à tous les individus, ou seulement aux cas radiorésistants ? Des événements de toxicité pourraient-ils être observés à des doses plus faibles que 0.5 Gy chez des individus radiosensibles ?

L'un des exemples les plus représentatifs d'effets radiobiologiques contradictoires est donné par l'hormésis et l'hyper-radiosensibilité aux faibles doses (HRS). Ces deux phénomènes ont été suspectés d'artéfacts techniques et restent encore non-consensuels. Il faut admettre que le groupe de radiobiologistes et de médecins mené par T.D. Luckey fit



une telle promotion de l'hormésis et de ses bénéfices aux USA à la fin des années 70, que certains radiobiologistes américains demandent aujourd'hui à réhausser les seuils d'exposition pour le grand public. L'un de leurs principaux arguments réside dans les risques négatifs de cancers observés chez certains survivants d'Hiroshima qui ont reçu des doses inférieures à 75 mGy (290). En parallèle, le phénomène HRS mis en évidence tant *in vivo* qu'*in vitro* par Mike Joiner, Brian Marples et Philippe Lambin apparaissait encore plus contre-intuitif aux yeux des radiothérapeutes : comment l'effet de 0.2 Gy peut-il être équivalent à celui observé après 1 ou 2 Gy ? Hormésis et HRS étaient d'autant plus mal acceptés par la communauté qu'aucune interprétation biologique de ces deux phénomènes n'était disponible. Le domaine des faibles doses devint pour certains de plus en plus obscur, voire de mauvaise réputation, d'autant plus que plusieurs groupes accumulaient les bénéfices thérapeutiques ou palliatifs associés à des doses inférieures à 0.5 Gy en les attribuant respectivement au phénomène HRS ou à l'hormésis.

Deux actions de recherche parallèles issues de notre Unité, et notamment de la thèse de Clément Devic (2016-2020), ont pu contribuer à changer notre vision des faibles doses :

- Une lecture approfondie de la littérature a permis de montrer que les deux phénomènes, HRS et hormésis, ne survenaient pas aux mêmes doses (autour de 0.2 Gy pour HRS ; autour de 20 mGy pour l'hormésis) et surtout, n'étaient pas observés sur des cellules de même radiosensibilité (radiosensibilité intermédiaire pour HRS ; radiorésistance pour l'hormésis).
- Une interprétation biologique issue du modèle RIANS fut proposée pour ces deux effets radiobiologiques : pour HRS, le flux d'ATM est retardé par les protéines X et n'est pas suffisant pour reconnaître et réparer le peu de CDB radio-induites ; pour l'hormésis, les faibles doses ne produisent pas de CDB mais apportent un flux important de monomères ATM qui reconnaissent les CDB spontanées, contribuant à réduire tout risque lié à ces CDB.

### *Problématiques*

Sans être véritablement exhaustifs, nous savons désormais qu'une grande diversité de pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives ou encore certaines

maladies inflammatoires ont été et continuent d'être traitées par radiothérapie par faibles doses (ou LDRT pour *low-dose radiation therapy*) (cf. § I.1) :

- en *Oncologie*, l'hyper-fractionnement de faibles doses initié par Joiner et Marples a montré une efficacité certaine. De manière intéressante, les nouvelles modalités de radiothérapie qui décomposent chaque séance de traitement en une multitude de faisceaux intra-séance (24), impliquent peut-être elles aussi des faibles doses, et donc un potentiel phénomène HRS "caché".
- en *Neurologie*, l'utilisation récente de faibles doses "scanographiques" pour traiter les patients souffrant de maladie d'Alzheimer ne repose après tout sur aucun fondement moléculaire (126).
- en *Rhumathologie*, l'usage séculaire des faibles doses à visée antalgique voire anti-inflammatoire demeure aujourd'hui encore tout-à-fait empirique (134).

#### *Buts proprements dits*

**Les buts de cette thèse étaient donc de documenter et mieux comprendre l'intérêt des faibles doses de RI : i) en radiothérapie oncologique ; ii) en prévention de maladies neurodégénératives ; iii) à visée antalgique/anti-inflammatoire.**

#### *Plan de thèse*

Pour atteindre ces objectifs, cette thèse s'est décomposée en quatre parties (Fig. 38) :

- *Introduction, état de l'Art, et validation des outils* : afin de mieux appréhender les possibles mécanismes d'action de la LDRT, un premier volet de radiobiologie fondamentale s'est attaché à renforcer l'usage de la protéine ATM et des biomarqueurs RIANS dans ma prédiction de la toxicité post-RT, en les comparant aux techniques et paramètres plus anciens (**Article 1** publié, 1<sup>er</sup> auteur). Nous nous devions ensuite de préciser les causes moléculaires et les conséquences cliniques d'un dysfonctionnement de l'activité d'ATM au sein du modèle RIANS (**Revue A** publiée, co-auteur). Puis, afin de mieux évaluer l'importance des spécificités en dose, temps et espace des différentes modalités de la RT, il nous fallait confronter le modèle RIANS aux différentes modalités de RT et en particulier à la notion de répétitions de faibles doses (**Revue B** en préparation). Enfin, il nous fallait dresser l'état de l'art des hypothèses mécanistiques de la LDRT (**Revue C** publiée, 1<sup>er</sup> auteur). Au terme de

cette première partie, nous étions alors en mesure d'appliquer le modèle RIANs à chacune des trois grandes entités nosologiques identifiées : cancer, maladie d'Alzheimer, et inflammation.

- *LDRT oncologique* : dans un premier temps, l'**Article 2** (publié, 1<sup>er</sup> auteur) a permis de choisir un appareil de radiothérapie stéréotaxique (ou SBRT pour *stereotactic body radiation therapy*) pour nos expériences d'irradiation cellulaire. Puis, l'hypothèse qu'une séance de SBRT puisse être propice à la survenue d'un effet HRS a été mise en évidence dans l'**Article 3** (publié, 1<sup>er</sup> auteur).
- *LDRT "anti-Alzheimer"* : ce troisième chapitre des résultats visait à fournir une explication moléculaire à la radiosensibilité observée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, afin de justifier l'usage de la LDRT "anti-Alzheimer" (**Article 4** publié, co-2<sup>ème</sup> auteur).
- *LDRT anti-inflammatoire* : enfin, le quatrième et dernier chapitre a tenté de comprendre les mécanismes moléculaires de l'effet anti-inflammatoire de la LDRT ; l'accent ayant été mis sur le rôle des cytokines (données préliminaires).

À long terme, cette thèse visait à rationaliser l'action et l'utilisation des faibles doses de RI dans la pratique médicale, en utilisant le modèle RIANs.

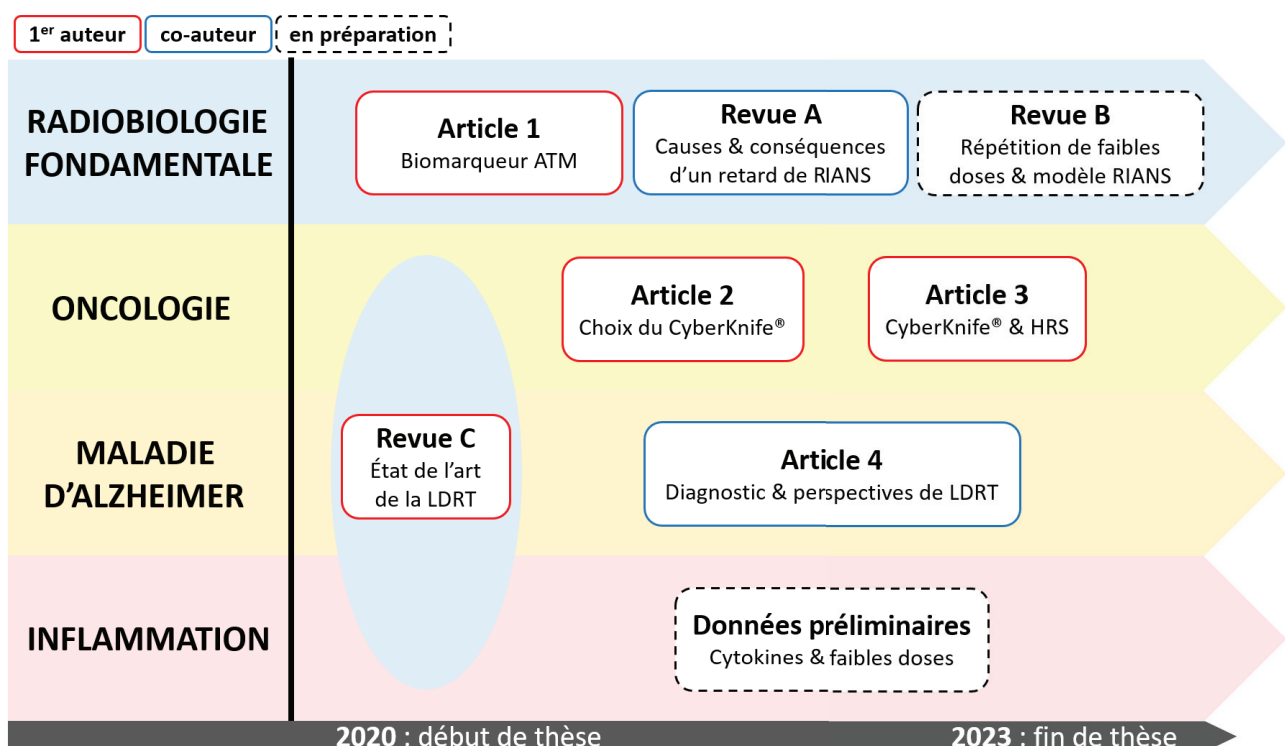


Figure 38. Plan de thèse et de publications.

## III. RÉSULTATS

---

### III.1. INTRODUCTION, ÉTAT DE L'ART, ET VALIDATION DES OUTILS

Comme nous l'avons vu en Introduction, une grande diversité de pathologies comme le cancer, la maladie d'Alzheimer ou encore certaines maladies inflammatoires sont susceptibles d'être traitées par radiothérapie par faibles doses (ou LDRT pour *low-dose radiation therapy*) (cf. § I.1). Par ailleurs, le modèle de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (ou RIANs pour *radiation-induced ATM nucleoshuttling*) propose une explication moléculaire à la réponse individuelle aux RI (cf. § I.3).

Afin de mieux appréhender les possibles mécanismes d'action de la LDRT, cette première partie visait à renforcer l'usage de la protéine ATM et des biomarqueurs RIANs dans la prédiction de la toxicité post-RT, en les comparant aux techniques et paramètres radiobiologiques plus anciens (**Article 1**), à préciser les causes moléculaires et les conséquences cliniques d'un dysfonctionnement de l'activité d'ATM au sein du modèle RIANs (**Revue A**), confronter le modèle RIANs aux différentes modalités de RT et en particulier à la notion de répétitions de faibles doses (**Revue B**), et dresser l'état de l'art des hypothèses mécanistiques de la LDRT (**Revue C**).

#### III.1.1. **Article 1** - Choix de la protéine ATM comme biomarqueur radiobiologique

**Le Reun E**, et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Sep 9;23(18):10434. doi: 10.3390/ijms231810434. (401)

##### III.1.1.1. *Contexte*

La protéine ATM est une sérine-thréonine kinase impliquée dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB) (192), dont le gène a été identifié dès 1995 (402) et dont la mutation homozygote est responsable de l'ataxie télangiectasie, syndrome génétique rare associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme (267). La réponse individuelle aux radiations, et plus précisément la réparation des CDB radio-induites, peut être appréhendée en clinique par l'échelle des *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE), ainsi que par divers biomarqueurs cellulaires et moléculaires, dont le marquage

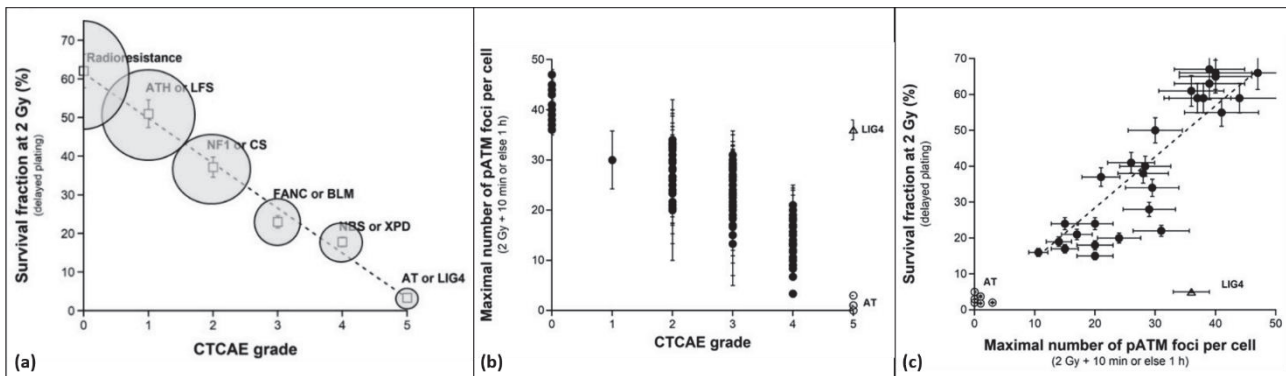
d'ATM par immunofluorescence. Cependant, aucun de ces biomarqueurs n'a, à ce jour, montré de supériorité pour prédire la survenue et la gravité des radiotoxicités. Le but de cette étude était de comparer la protéine ATM aux autres biomarqueurs de radiosensibilité au sein d'une même cohorte (collection de 200 lignées fibroblastiques) et dans les mêmes conditions d'irradiation.

### *III.1.1.2. Matériels & Méthodes*

Nous avons utilisé 200 lignées fibroblastiques non transformées, issues de patients atteints de cancer ayant été traités par radiothérapie et dont les grades de sévérité CTCAE étaient connus. Les cellules ont été irradiées à 2 Gy de rayons X. Des corrélations ont ensuite été réalisées entre les grades CTCAE et les principaux biomarqueurs prédictifs de radiotoxicité, à la fois cellulaires (survie cellulaire à 2 Gy (SF2), nombre de micronoyaux) et moléculaires (CDB reconnues et non-réparées détectées par immunofluorescence des protéines  $\gamma$ H2AX et pATM).

### *III.1.1.3. Résumé des résultats*

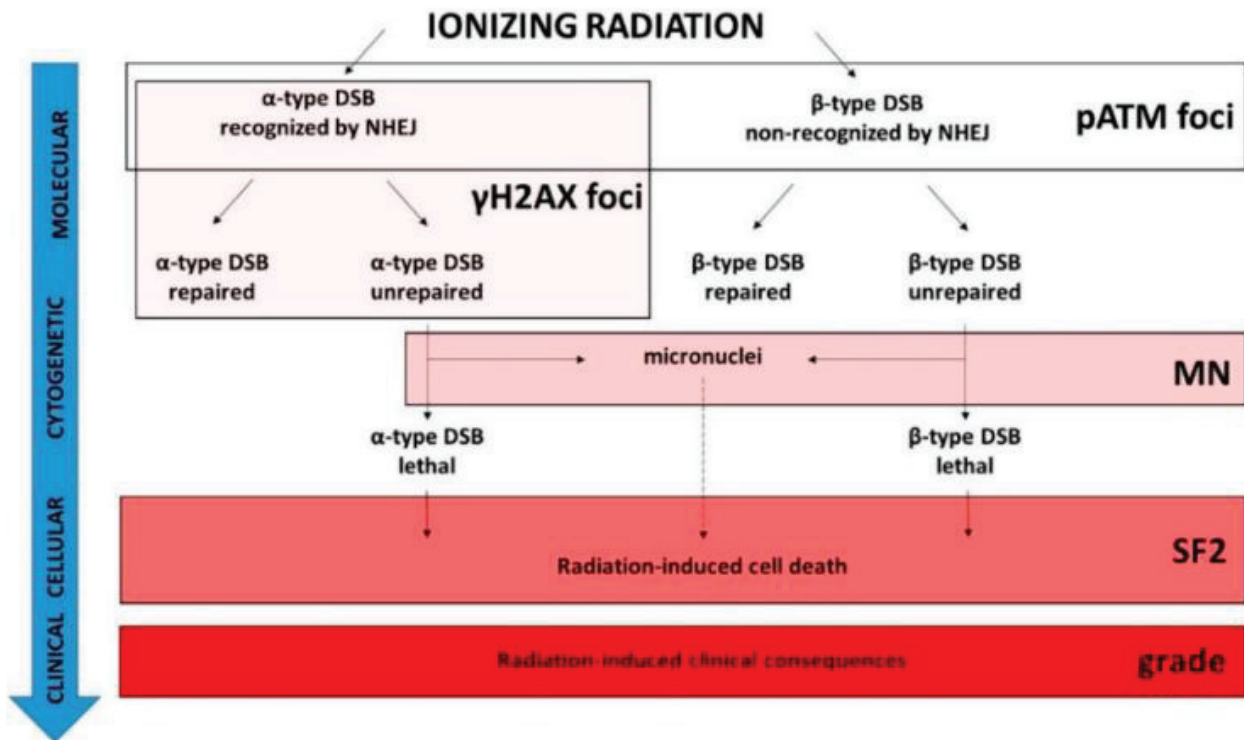
Les différents biomarqueurs de réponse aux radiations présentent des intercorrélations mathématiques qui peuvent facilement s'exprimer sous la forme de formules empiriques ou de solution d'équations différentielles. La Figure 39 expose notamment les corrélations qui lient ATM avec les grades CTCAE et la SF2. On voit par exemple que la SF2 diminue linéairement quand le grade CTCAE augmente. Comme ces deux paramètres prennent des valeurs bornées (ex: SF2<sub>max</sub>, SF2<sub>min</sub>, CTCAE=0, CTCAE=5), on peut alors établir une formule mathématique linéaire en faisant correspondre la SF2 la plus élevée (radioresistance) à la valeur 0 de CTCAE et la SF2 la moins élevée (hyper-radiosensibilité) à la valeur 5 de CTCAE. EN procédant de même pour le paramètre pATM<sub>max</sub> (valeur maximale du nombre de foci pATM précoces post-irradiation), on en déduit que SF2 et pATM<sub>max</sub> sont également reliés de façon linéaire, ce qui permet de passer directement de la radiosensibilité cellulaire à la radiosensibilité moléculaire.



**Figure 39.** Intercorrélations entre différents biomarqueurs de radiosensibilité. (a) Grades de sévérité CTCAE et survie cellulaire à 2 Gy (SF2). (b) Grades de sévérité CTCAE et nombre de foci pATM 10min ou 1h post-irradiation. (c) Survie cellulaire à 2 Gy (SF2) et nombre de foci pATM 10min ou 1h post-irradiation. CTCAE = Common Terminology Criteria for Adverse Events.

Au même titre que la sévérité clinique (grades CTCAE) et la mortalité cellulaire (SF2), nous avons appliqué la même approche aux micronoyaux et aux foci  $\gamma$ H2AX. Il faut cependant rappeler les éléments suivants : les foci  $\gamma$ H2AX qui n'apparaissent que si ATM phosphoryle H2AX sur le site de la CDB ne révèlent que les CDB qui sont reconnues et éventuellement réparées par suture NHEJ. Par exemple, dans les cellules du groupe I, toutes les CDB étant reconnues et réparées par suture, à chaque CDB correspond un signal  $\gamma$ H2AX. À l'inverse dans les cellules de groupe II, une certaine sous-population de CDB ne sont soit pas reconnues par aucun mode de réparation, soit reconnues par un mode de réparation différent de NHEJ (ex: la recombinaison non-homologue MRE11-dépendante). Ainsi, nous avons défini (66) les CDB de type  $\alpha$  reconnues par la voie de réparation par suture NHEJ et les CDB de type  $\beta$  qui sont soit reconnues par un autre mode de réparation que NHEJ soit pas reconnues du tout (Fig. 40). En revanche, ces deux types de CDB peuvent ne pas être réparées et devenir létales. Ainsi, une certaine sous-population de CDB type  $\alpha$  et une autre sous-population de CDB de type  $\beta$  participent indépendamment à l'effet léthal des RI. En conséquence, les foci  $\gamma$ H2AX ne sont pas représentatifs des CDB de type- $\beta$  et leur prédiction de la radiosensibilité est donc moins bonne pour les radiosensibilités intermédiaires (groupe II) et hyper-radiosensibilités (groupe III): la relation entre le nombre de foci  $\gamma$ H2AX restant après 24 h post-irradiation et les grades CTCAE, la SF2 ou pATMmax est donc différentielle. De même, les micronoyaux peuvent être la conséquence de certaines CDB non-réparées quel que soit leur type  $\alpha$  ou  $\beta$ . Là encore, la prédiction de la radiosensibilité avec le nombre de micronoyaux est complexe et ne dépend pas linéairement du grade CTCAE, SF2 ou de pATMmax (Fig. 40).

Comparé à la SF2, technique radiobiologique de référence mais considérablement chronophage (267), la détection des CDB par immunofluorescence de foci pATM est quant à elle plus simple d'utilisation et applicable en pratique courante de laboratoire.



**Figure 40.** Représentation schématique des conséquences moléculaires, cytogénétiques, cellulaires et cliniques d'une irradiation, et domaine de validité des principaux paramètres de radiosensibilité.

#### III.1.1.4. Discussion & Conclusion

Au cœur du modèle RIANS, la protéine ATM apparaît comme un biomarqueur radiobiologique à la fois fiable et disponible en routine et lié à la SF2 ou au grade CTCAE de façon simple. Cet article permet pour la première fois à notre connaissance de relier entre eux et sur tout le spectre de la radiosensibilité humaine les paramètres les plus usuels de la prédiction de la radiosensibilité. Grâce à ce travail qui réunit une collection de 200 lignées humaines de différentes radiosensibilités, nous pouvons aujourd'hui dresser des abaques de correspondances entre les paramètres radiobiologiques majeures, de l'échelle clinique, cellulaire et moléculaire.

### III.1.2. Revue A - Causes et conséquences d'un retard de RIANS

El Nachef L, Berthel E, Ferlazzo ML, **Le Reun E**, et al. Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity the Primum Movens? *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 13;14(24):6141. doi: 10.3390/cancers14246141. (403)

#### III.1.2.1. Contexte

L'Article 1 a montré que la protéine ATM occupe une place centrale dans la réponse aux radiations (401). Nous savons par ailleurs que la LDRT peut être utilisée à l'encontre de certains cancers (82, 84) (cf. § I.1.2.2). De manière intéressante, de nombreux syndromes associent à la fois radiosensibilité individuelle et risque de cancer, sans qu'aucun lien de causalité ne puisse à ce jour relier ces deux notions. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action moléculaire de la LDRT, la présente revue avait donc pour but d'étudier les causes et les conséquences d'un dysfonctionnement de l'activité d'ATM dans différents syndromes associant radiosensibilité et risque de cancer.

#### III.1.2.2. Résumé des résultats

Les syndromes génétiques associant radiosensibilité individuelle et risque de cancer peuvent être répartis en trois catégories (Fig. 41), selon que la mutation princeps porte sur un gène impliqué dans :

- la reconnaissance et la réparation des dommages de l'ADN ; ces syndromes présentent une radiosensibilité modérée (SF2 = 30–60%) : *syndrome Artemis, xeroderma pigmentosum*, voire extrême (SF2 = 10–30%) : *ataxie-télangiectasie, syndrome ligase IV*.
- l'arrêt du cycle cellulaire ; ces syndromes présentent une radiosensibilité modérée (SF2 = 30–60%) : *syndrome PROS, cancer du sein BRAC1/BRCA2, anémie de Fanconi, rétinoblastome, syndrome de Li-Fraumeni*.
- d'autres fonctions biologiques ; ces syndromes présentent une radiosensibilité modérée (SF2 = 30–60%) : *neurofibromatose de types 1 et 2, sclérose tubéreuse de Bourneville*.

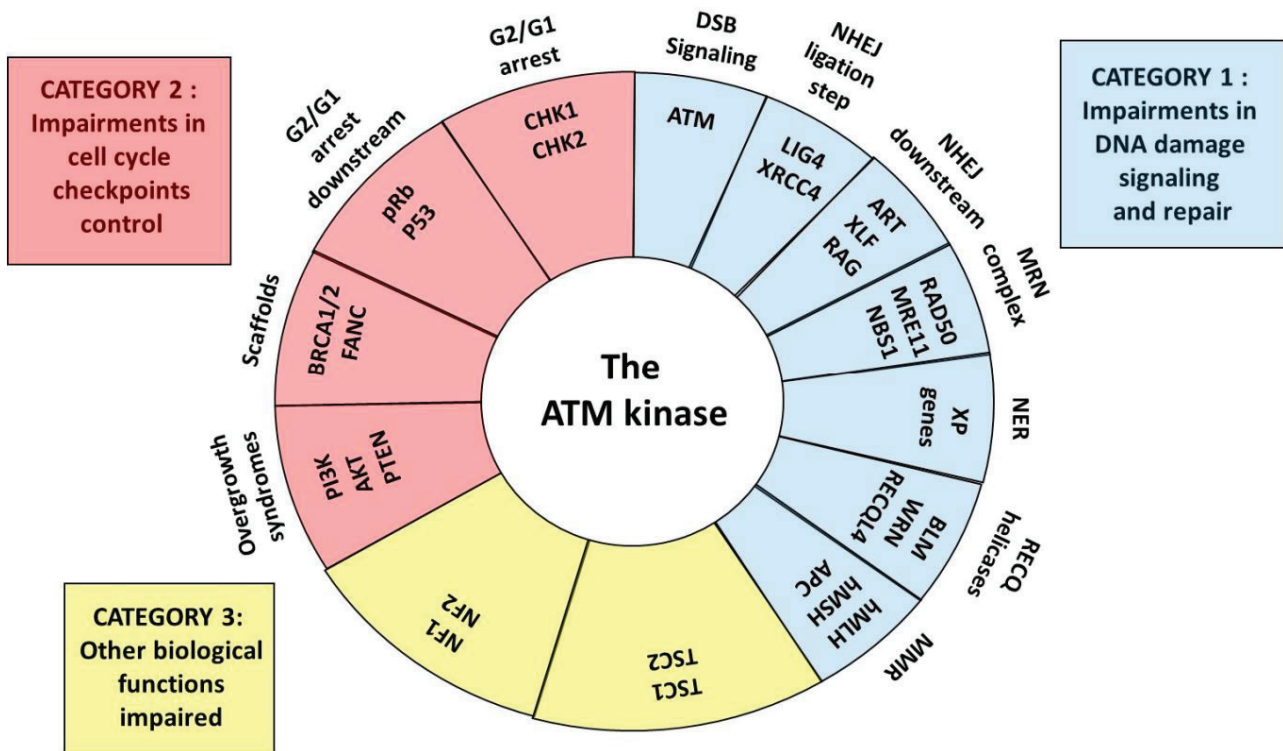
La théorie de la cancérogenèse, telle que décrite par Weinberg (404), propose deux conditions pour la formation d'une tumeur : une première phase d'initiation tumorale (cellule contenant des CDB mal-réparées), puis une phase de promotion tumorale



(poursuite du cycle cellulaire). Par conséquent, la mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN serait nécessaire mais non suffisante à la formation de cancer, puisque manquerait alors l'étape suivante de dérèglement du cycle cellulaire. De manière analogue, la mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire serait nécessaire mais non suffisante à la formation de cancer, puisque manquerait la formation préalable de cellule mutante. À plus forte raison enfin, la mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée ni dans la réparation d'ADN ni dans le contrôle du cycle cellulaire ne pourrait *a priori* pas expliquer une quelconque cancérogenèse.

Cependant, de manière intéressante, les gènes mutés dans chacune des trois catégories pré-citées codent tous pour des protéines possédant des sites SQ/TQ (405), autrement dit pour de potentiels substrats d'ATM (Fig. 41). En outre, la mutation de ces protéines entraîne leur surexpression dans le cytoplasme (LIG4 (406), p53 (407), MRE11 (408), PI3KCA (334), CHK2 (409), BRCA1 (410), NF1 (411), hamartine (342), ...), où se trouve également ATM (346). Or, comme nous l'avons vu en Introduction (cf. § I.3.2.6), tout substrat d'ATM présent dans le cytoplasme peut jouer le rôle de protéine X, susceptible de séquestrer ATM dans le cytoplasme, entraîner un retard de RIANS, et *in fine* un défaut de phosphorylation des protéines cibles d'ATM dans le noyau, telles que :

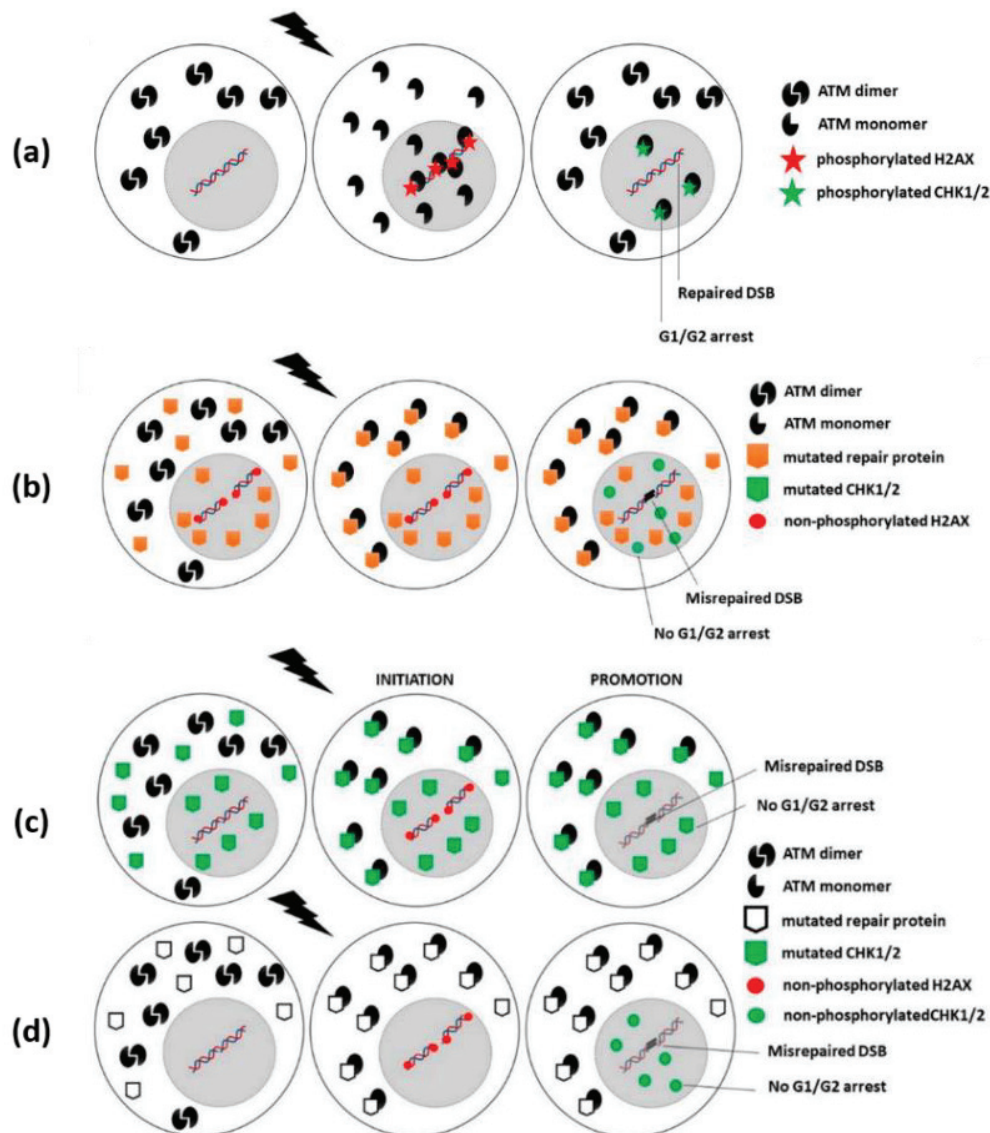
- l'histone H2AX, initiant la reconnaissance des CDB par la voie de la suture NHEJ
- la protéine MRE11, entraînant l'inhibition de la voie de réparation par recombinaison, volontiers non-homologue en phases G0/G1
- ou encore la protéine CHK2, contribuant à l'arrêt du cycle cellulaire.



**Figure 41.** Représentation schématique du rôle central de la protéine kinase ATM en tant que partenaire de protéines substrats dont les mutations provoquent des syndromes associant radiosensibilité et risque de cancer. Trois catégories peuvent être définies selon le rôle de la protéine mutée : (1) reconnaissance et réparation des dommages de l'ADN ; (2) arrêt du cycle cellulaire ; (3) autres fonctions biologiques.

Au total, comme l'indique la Figure 42, les protéines mutées dans les syndromes associant une radiosensibilité et un risque de cancer doivent être considérées comme des protéines X, pouvant engendrer :

- un défaut de phosphorylation d'H2AX de tous les sites de CDB, responsable d'une mauvaise reconnaissance des CDB par suture NHEJ.
- un défaut de phosphorylation de MRE11, responsable d'une hyper-recombinaison pourvoyeuse de CDB mal-réparées en G0/G1.
- un défaut de phosphorylation de CHK2, levant l'arrêt du cycle cellulaire au profit d'une amplification cellulaire.



**Figure 42.** Représentation schématique du modèle RANS en cas de : radiorésistance (a) ; ou de syndrome associant radiosensibilité et risque de cancer lié à la mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée dans : la réparation de l'ADN (b), le contrôle du cycle cellulaire (c), une fonction biologique autre que la réparation de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire (d).

### III.1.2.3. Discussion & Conclusion

Cette revue a permis d'une part de recenser différentes protéines X à l'origine d'un retard de RIANS, et d'autre part de comprendre en quoi le retard de RIANS pouvait engendrer à la fois radiosensibilité et risque de cancer. Ces notions ont par ailleurs fait l'objet d'un article de vulgarisation scientifique (412). Cette revue permet aujourd'hui de considérer le modèle RIANS comme expliquant les bases de la cancérogenèse (spontanée et radio-induite). Les données radiobiologiques issues des maladies génétiques associées à un haut risque de cancer, étudiées au laboratoire, sont désormais analysées sous ce prisme.

### III.1.3. Revue B - Modèle RIANs face à la répétition de faibles doses

The strategies of anti-tumor radiotherapy and their corresponding radiobiological outcomes: some questions of time, energy, and space. *Revue en préparation*. (413)

#### III.1.3.1. *Contexte*

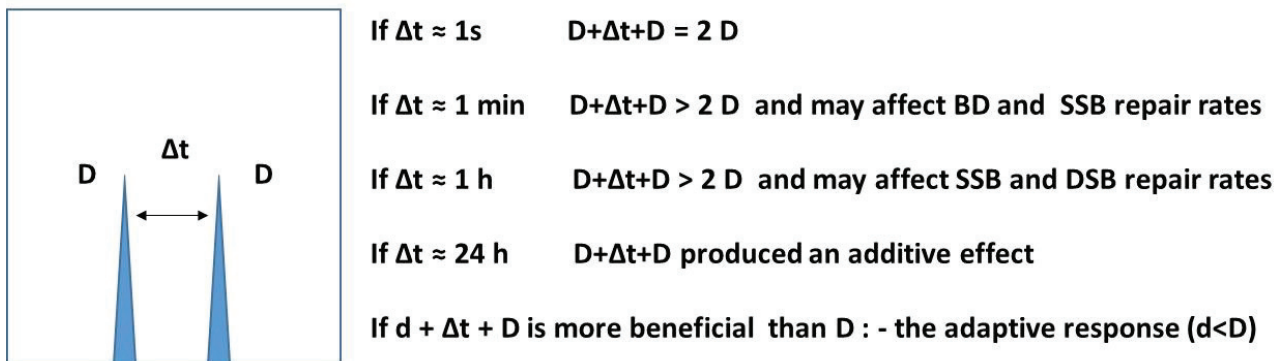
Bénéficiant constamment d'avancées technologiques, la radiothérapie peut être délivrée selon de multiples modalités selon la nature des rayonnements, la dose de prescription, la balistique de traitement, ou encore le fractionnement (facteur *temporel*) (14) (cf. § I.1.1.3). De longue date, les rayonnements ionisants sont par ailleurs soupçonnés de provoquer des effets à distance de la zone ciblée (facteur *spatial*) (414). Cette revue avait pour objectif d'évaluer l'impact d'une variation des paramètres temporo-spatiaux sur le plan radiobiologique.

#### III.1.3.2. *Résumé des résultats*

##### *Facteur temporel*

À la suite d'une irradiation génotoxique, les mécanismes de réparation de l'ADN nécessitent une décondensation de la chromatine. Si une deuxième irradiation survient avant que les lésions de l'ADN ne soient réparées, alors l'accessibilité accrue à la chromatine peut produire davantage de dommages de l'ADN que lors de la première irradiation (415). En pratique, si l'intervalle de temps entre deux doses ( $\Delta t$ ) est inférieur à une seconde (e.g. 2 unités-moniteur d'un faisceau de VMAT), aucun mécanisme de réparation n'a encore eu le temps de s'activer et l'effet biologique des deux doses successives est purement additif. De même, un simple effet additif est observé pour un  $\Delta t$  au-delà de 24h, dans la mesure où toutes les lésions de l'ADN ont eu le temps d'être réparées entre les deux irradiations (415). En revanche, en cas de retard de RIANs, un effet supra-additif peut se produire sur les dommages de base si  $\Delta t > 1s$ , sur les cassures simple-brin si  $\Delta t \approx 1min$ , et sur les cassures double-brin si  $\Delta t \approx 1h$  (415) (Fig. 43). Si des délais aussi courts ne sont généralement pas utilisés entre deux séances de radiothérapie (sauf cas exceptionnel de radiothérapie bifractionnée), ils peuvent en revanche séparer deux faisceaux d'irradiation au cours d'une même séance.

Parallèlement aux dommages de l'ADN, les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire tels que la phosphorylation de CHK1, CHK2 et p53 sont quant à eux plus lents, - de l'ordre de plusieurs heures à quelques jours, - et s'activent donc alors que la plupart des dommages de l'ADN sont déjà réparés (267).



**Figure 43.** Illustration schématique des effets de répétition de doses.  $\Delta t$  = intervalle de temps entre deux doses.  $D$  = dose supérieure à 1 Gy.  $d$  = dose inférieure à 1 Gy. BD = dommage de base (*base damage*). SSB = cassure simple-brin (*single strand-break*). DSB = cassure double-brin (*double strand-break*).


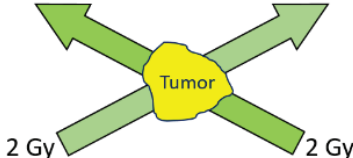

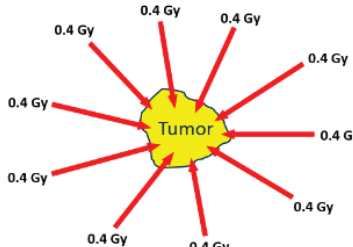
### Facteur spatial

Les conséquences des RI peuvent s'étendre en dehors de la zone ciblée, tant au niveau cellulaire (effet bystander) que tissulaire (effet abscopal). L'effet bystander a été abondamment mis en évidence dans des cellules non-irradiées situées à proximité immédiate de cellules irradiées (259, 416-418). Le risque d'effet bystander sur les tissus sains peut être évité en conformant au mieux le faisceau d'irradiation à la tumeur, sans "déborder" sur les organes sains avoisinants. Les techniques modernes de radiothérapie telles que l'IMRT ou la SBRT permettent ainsi des balistiques de haute précision.

L'effet abscopal, du latin *ab scopum* signifiant "à distance de la cible", se produit quant à lui à l'échelle tissulaire (419), comme par exemple la régression d'une métastase après irradiation de la tumeur primaire (414, 420). Le système immunitaire semble jouer un rôle important dans la survenue de l'effet abscopal en mobilisant les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (421), notamment après adjonction d'anticorps tels que l'Ipilimumab (422). À ce jour, aucune explication moléculaire n'a cependant été formulée pour chacun de ces deux effets à distance.

### III.1.3.3. Discussion & Conclusion

Cette revue a permis de comprendre, sur le plan moléculaire, certains effets du fractionnement en radiothérapie. En particulier, la répétition de doses au sein d'une même séance de traitement peut entraîner un effet biologique supra-additif sur une cellule souffrant d'un retard de RIANS (groupe II). À plus forte raison, une séance de RT favorable à la répétition d'effets HRS pourrait entraîner un effet HRS supra-additif sur une cellule HRS+ (Fig. 44) ; l'hypothèse d'un tel phénomène en SBRT sera investiguée dans l'Article 3. La compréhension moléculaire de l'effet bystander et son implication dans le phénomène HRS ont quant à elles fait l'objet d'une autre publication, sans lien direct avec cette thèse (423).

Délai inter-faisceaux Dose/faisceau	< 1 sec <i>effet radiobiologique additif</i>	[> 1 sec ; < 24 h] <i>effet radiobiologique supra-additif si retard de RIANS</i>
<b>Forte</b>	<b>HyperArc™</b> <i>Un faisceau de forte dose délivré sans interruption</i>  $\Sigma f(D) = D'$	<b>RC3D &amp; IMRT "step and shoot"</b> <i>Quelques faisceaux de forte dose délivrés successivement</i>  $D \dots \Delta t \dots D$
<b>Faible</b> <i>Dé létère si cellule HRS+</i>	<b>IMRT rotationnelle (VMAT &amp; Tomo)</b> <i>Un faisceau de faible dose délivré sans interruption</i>  $\Sigma f(d) = D$	<b>Stéréotaxie "step and shoot"</b> <i>Nombreux faisceaux de faible dose délivrés successivement</i>  $d \dots \Delta t \dots d \dots \Delta t \dots d \dots \Delta t \dots d \dots \Delta t \dots d$

**Figure 44.** Répétition de doses au sein d'une séance de radiothérapie externe. La stéréotaxie de type "step and shoot" offre des conditions propices à un effet HRS supra-additif. HRS = hyper-radiosensibilité aux faibles doses. RC3D = radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (*3-dimensional conformal radiotherapy*). IMRT = radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (*intensity modulated radiation therapy*). VMAT = arc-thérapie volumétrique avec modulation d'intensité (*volumetric modulated arc-therapy*). Tomo = TomoTherapy® hélicoïdale.

### III.1.4. Revue C - Hypothèses mécanistiques de la radiothérapie par faibles doses

**Le Reun E**, Foray N. Low-Dose Radiation Therapy (LDRT) against Cancer and Inflammatory or Degenerative Diseases: Three Parallel Stories with a Common Molecular Mechanism Involving the Nucleoshuttling of the ATM Protein? *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 26;15(5):1482. doi: 10.3390/cancers15051482. (424)

#### III.1.4.1. *Contexte*

La radiothérapie est aujourd'hui principalement employée en oncologie, avec des doses de l'ordre de 2 Gy par séance permettant de détruire les cellules tumorales tout en préservant les tissus sains. La radiothérapie par faibles doses (ou LDRT pour *low-dose radiation therapy*), généralement < 1 Gy/séance, peut elle aussi être utilisée à l'encontre de cancers (82, 84), mais également avoir un effet protecteur pour certaines pathologies inflammatoires (134) et/ou neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (124) (cf. § I.1). Si certaines hypothèses cellulaires ont été formulées, il n'existait cependant pas, à ce jour, d'interprétation moléculaire pour expliquer les différents modes d'action de la LDRT. Le but de cette revue était, pour chacune des trois grandes entités nosologiques identifiées, - cancer, maladie d'Alzheimer, inflammation, - de répertorier de manière systématique les différentes hypothèses cellulaires de la LDRT, puis d'en proposer une explication moléculaire via le modèle RIANs.

#### III.1.4.2. *Résumé des résultats*

##### *Radiothérapie par faibles doses (LDRT) en oncologie*

En oncologie, une irradiation par faibles doses entraîne, en dépit des prédictions du modèle linéaire-quadratique (LQ), une diminution de survie de certaines lignées cellulaires tumorales, aussi bien sur des modèles murins (425, 426) que chez l'homme : cancer colorectal (351), carcinome de la vessie (427), glioblastome (428). Ce phénomène de surmortalité cellulaire appelé hyper-radiosensibilité aux faibles doses ou HRS (cf. § I.3.3.1) (359), s'est imposé depuis les années 1980 comme la principale explication cellulaire de l'efficacité de la LDRT contre certaines tumeurs.

Sur le plan moléculaire, le modèle RIANs nous apprend que les cellules du groupe II présentent une reconnaissance incomplète des cassures double-brin (CDB) de l'ADN, possiblement en raison d'une surexpression de protéines X (cf. § I.3.2.2) séquestrant une grande quantité de monomères ATM dans le cytoplasme (66). Ainsi, une LDRT (0.1-0.8

Gy/séance) appliquée à de telles cellules radiosensibles entraînerait la formation de complexes X-ATM, entraînant un retard de RIANS. Comme nous l'avons vu dans la Revue A, un retard de RIANS entraînerait alors un défaut de phosphorylation des protéines de réparation de l'ADN (403), conduisant à l'effet HRS (Fig. 45e).

#### *Radiothérapie par faibles doses (LDRT) et maladie d'Alzheimer*

Concernant la maladie d'Alzheimer (MA), l'irradiation holocrânienne de quelques patients a suggéré une amélioration de leurs performances cognitives (118, 119, 124, 126). Au niveau cellulaire, divers auteurs ont étudié l'impact de la LDRT sur la dégénérescence neurofibrillaire (protéine Tau) et les plaques séniles (peptide amyloïde-A $\beta$ 42), deux marqueurs pathognomoniques de MA. Dans les faits, l'amélioration cognitive consécutive à l'irradiation encéphalique de modèles murins peut s'associer (117, 429) ou non (116) à une réduction des plaques amyloïdes-A $\beta$ 42 ; de manière toute aussi inconséquente, la diminution radio-induite des plaques amyloïdes-A $\beta$ 42 s'accompagne (430) ou non (115) d'une moindre coloration de la protéine Tau. Aussi, plaques séniles et neurofibrilles Tau n'apparaissent-elles pas tant comme des cibles étiologiques tangibles, mais plutôt comme des conséquences inconstantes de la MA (431). De manière intéressante, la LDRT semble par ailleurs diminuer la production de cytokines neuro-inflammatoires (429, 432).

La MA est une maladie neurodégénérative dont les cellules de patients atteints présentent une radiosensibilité (101, 102), au même titre que la chorée de Huntington (341), la sclérose tubéreuse de Bourneville (342), certaines formes de xeroderma pigmentosum D (343) et la neurofibromatose de type 1 (411). Ces quatre pathologies appartiennent chacune au groupe II de radiosensibilité, dont le retard de RIANS s'explique par de fortes concentrations cytoplasmiques de protéines X substrats d'ATM (huntingtine, tubérine, XPD et neurofibromine [NF1], respectivement) (341-343, 411). De manière analogue, il est donc possible que les cellules de patients MA surexpriment également une protéine X dans le cytoplasme, responsable de la séquestration d'ATM en dehors du noyau. Par manque de diffusion cytonucléaire de monomères ATM, les CDB induites par un stress génotoxique permanent seraient ainsi moins bien reconnues et moins bien réparées, conduisant à une dégénérescence neuronale précoce. À dose hormétique (20-75 mGy) (cf. § I.3.3.2), la LDRT favoriserait à l'inverse la monomérisation des dimères ATM et la dissociation des complexes

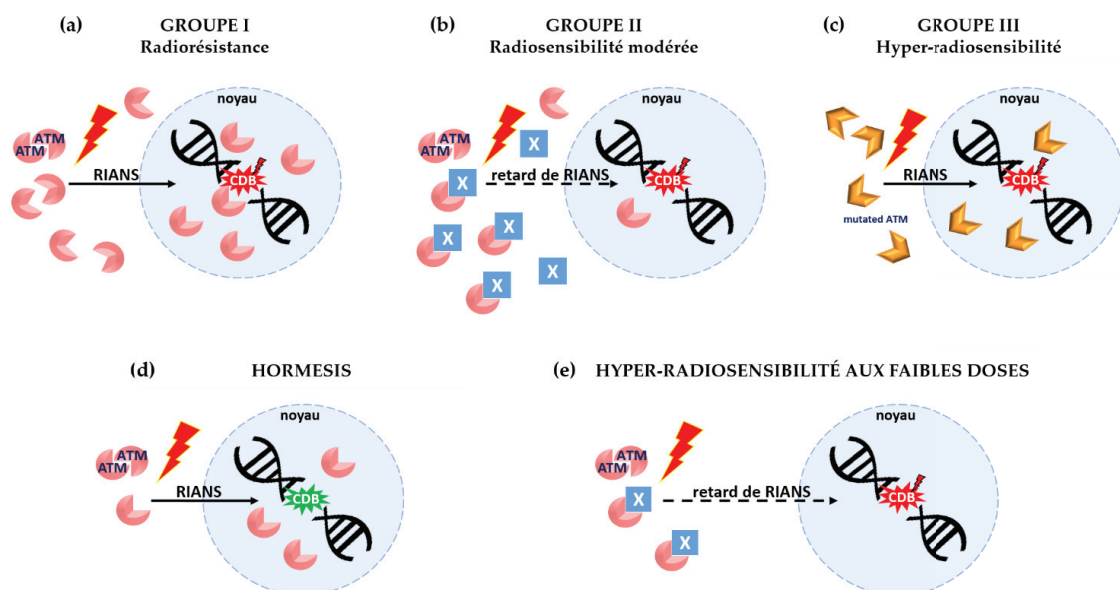


X-ATM, donc la diffusion de la protéine ATM vers le noyau, et enfin la reconnaissance et la réparation des CDB (Fig. 45d).

### Radiothérapie par faibles doses (LDRT) et pathologies liées à l'inflammation

La LDRT semble par ailleurs avoir un effet protecteur pour diverses maladies telles que le COVID-19 ou en rhumatologie, qui ont en commun une physiopathologie liée à l'hyper-inflammation (433-435) (cf. § 1.1.3). L'analyse de la littérature suggère qu'une LDRT entraîne à la fois une inhibition des voies pro-inflammatoires : diminution des lymphocytes T CD8+ (144, 155, 158), des leucocytes adhérents (436-438), de la protéine C-réactive (CRP) et du TGF- $\beta$ 1 (155, 157), ainsi qu'une stimulation des voies anti-inflammatoires : augmentation des lymphocytes T CD4+, des interleukines IL-4 et IL-6 (144).

D'un point de vue moléculaire, certaines cytokines pro- ou anti-inflammatoires détiennent des domaines SQ/TQ préférentiellement phosphorylés par la protéine ATM (405), faisant d'elles de potentielles protéines X. Ainsi, il est possible que la LDRT réduise le stress génotoxique lié à l'inflammation en produisant des monomères d'ATM propres à activer des cytokines anti-inflammatoires et/ou inactiver des cytokines pro-inflammatoires par phosphorylation.



**Figure 45.** Réponse cellulaire après irradiation par fortes et faibles doses expliquée par le modèle RIANS. **(a)** Radiorésistance (groupe I). **(b)** Radiosensibilité modérée (groupe II). **(c)** Hyper-radiosensibilité (groupe III). **(d)** Phénomène hormésis (préférentiellement observé dans les cellules du groupe I) : à très faible dose (< 25 mGy), certains monomères ATM peuvent contribuer à la reconnaissance et à la réparation des CDB spontanées (étoile verte), la quantité de CDB radio-induites étant négligeable. **(e)** Hyper-radiosensibilité à faible dose (HRS) (préférentiellement observée dans les cellules du groupe II) : à faibles doses (0.1–0.5 Gy), le flux de monomères ATM peut être réduit par les interactions avec des protéines X, ne permettant pas la reconnaissance des quelques CDB radio-induites (étoile rouge).

### *III.1.4.3. Discussion & Conclusion*

L'étude de la littérature nous enseigne qu'une grande variété de pathologies comme le cancer, la maladie d'Alzheimer ou encore certaines maladies inflammatoires sont susceptibles d'être traitées par radiothérapie par faibles doses (LDRT). La LDRT présente différentes hypothèses mécanistiques cellulaires, qui trouvent dans le modèle RIANS un dénominateur moléculaire commun. La LDRT pourrait en effet stimuler le RIANS (hormésis) ou le retarder (HRS), prévenir la formation de complexes X-ATM dans le cytoplasme (maladie d'Alzheimer) ou la favoriser (HRS, cytokines de l'inflammation).

## III.2. LDRT ONCOLOGIQUE

D'après la Revue C, la LDRT anti-tumorale s'expliquerait à l'échelle cellulaire par le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HRS), et à l'échelle moléculaire par un retard de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (ou RIANS pour *radiation-induced ATM nucleoshuttling*) (424).

Comme nous l'avons vu en Introduction, une séance de radiothérapie stéréotaxique (ou SBRT pour *stereotactic body radiation therapy*) délivre une multitude de microfaisceaux de faibles doses (24) (cf. § I.1.1.3). À ce titre, une séance de SBRT pourrait être propice à la survenue d'un effet HRS. Les expériences nécessaires à la validation de cette hypothèse (Article 3) requéraient une machine d'irradiation, que l'Article 2 se donnait préalablement pour objectif de choisir en s'appuyant sur l'exemple de la SBRT pulmonaire.

### III.2.1. Article 2 - Choix du CyberKnife® comme outil expérimental

Le Reun E, et al. Lung stereotactic radiation therapy: intercomparison of irradiation devices in terms of outcome and predictive factors. *Cancer Radiothérapie*. 2023 Feb;27(1):31-41. doi: 10.1016/j.canrad.2022.05.003. (439)

#### III.2.1.1. Contexte

Le cancer du poumon représente la première cause de décès par cancer (440). L'apparition de la SBRT pulmonaire a permis de réduire le nombre de patients jusqu'alors non-traités (patients inopérables, patients opérables refusant la chirurgie, tumeurs non-résécables) (441, 442) et ce, aussi bien pour des tumeurs primitives (55, 443-445) que pour des lésions pulmonaires oligométastatiques (446).

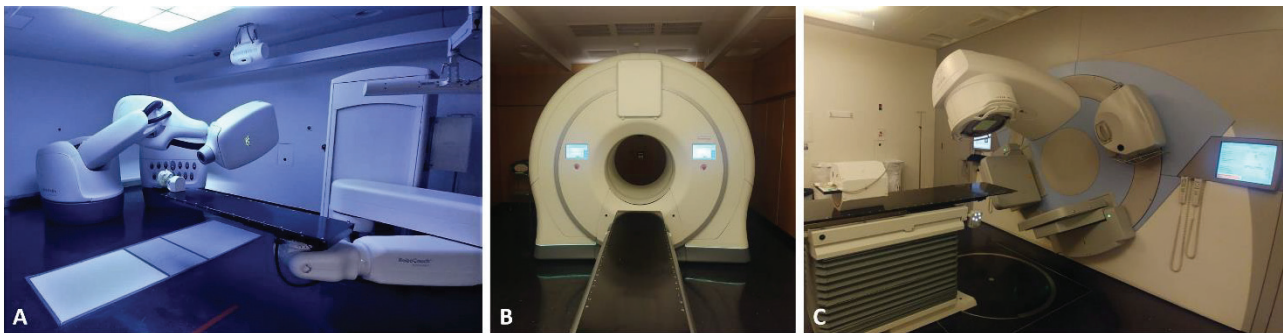
Le service de Radio-Oncologie du Centre Hospitalier Universitaire de Lausanne (CHUV) en Suisse est un des rares centres au monde disposant de trois appareils différents capables de réaliser une SBRT pulmonaire : un CyberKnife® (Accuray, USA), accélérateur linéaire de particules à tête et bras robotisés totalement dévolu à la stéréotaxie ; une TomoTherapy® hélicoïdale (Accuray, USA), accélérateur de particules couplé à un scanner ; ainsi qu'un Synergy® (Elekta, Suède), machine d'arc-thérapie volumétrique avec modulation d'intensité (ou VMAT pour *volumetric modulated arc-therapy*).

Pour la première fois de manière monocentrique (447), cette étude a comparé les résultats cliniques et dosimétriques de la SBRT pulmonaire selon ces trois différents appareils de traitement.

### III.2.1.2. Matériels & Méthodes

Nous avons analysé de manière rétrospective les données cliniques, radiologiques et dosimétriques des patients traités par SBRT pulmonaire entre 2016 et 2020 au CHUV de Lausanne, sur trois machines différentes : CyberKnife<sup>®</sup>, TomoTherapy<sup>®</sup> et Synergy<sup>®</sup> (VMAT) (Fig. 46).

L'analyse statistique des résultats a utilisé le test Chi-2 pour les proportions, le test-T pour les comparaisons de moyennes, la méthode de Kaplan-Meier pour la survie, et enfin le test du Log-rank et la régression de Cox pour les comparaisons entre groupes.



**Figure 46.** Appareils de radiothérapie permettant de traiter en conditions stéréotaxiques. A : CyberKnife<sup>®</sup> (Accuray, USA). B : TomoTherapy<sup>®</sup> (Accuray, USA). C : Synergy<sup>®</sup> (Elekta, Suède).

### III.2.1.3. Résumé des résultats

#### Statistiques descriptives

Nous avons identifié 111 patients d'âge médian de 71.4 ans (32.5–91.6), majoritairement des hommes (65.8%) fumeurs (64.9%), dont 4.5% d'entre eux étaient opérables et avaient refusé l'alternative chirurgicale. Un total de 142 tumeurs pulmonaires ont été traitées, équitablement primitives (51.4%) ou métastatiques (48.6%), à l'aide des appareils CyberKnife<sup>®</sup> (59.9%), TomoTherapy<sup>®</sup> (2.1%) ou VMAT (38.0%).

La plupart des traitements ont délivré une dose de 55 Gy (34–60) en 5 séances (1–8), sur des volumes cibles prévisionnels (PTV) médians de 8.1 cm<sup>3</sup> (1.3–190.4). La dosimétrie médiane aux poumons retrouvait une dose moyenne (MLD) de 3.7 Gy (0.2–22.3), un volume recevant

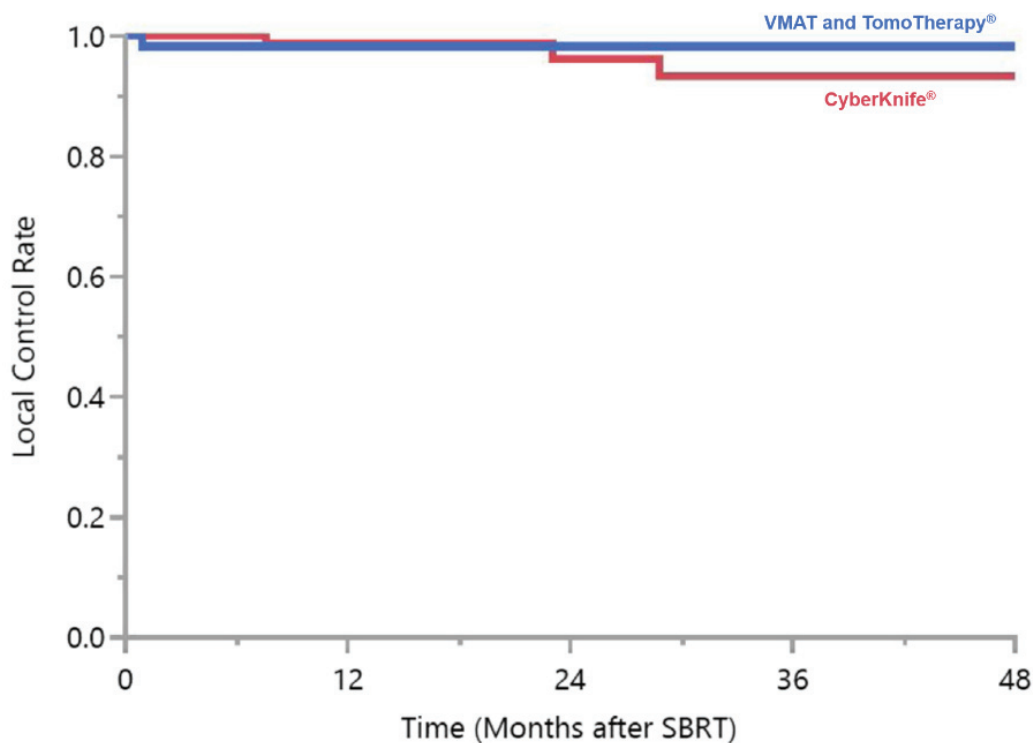
au moins 5 Gy (V5) de 17.2% (2.1–93.6), et un volume recevant au moins 20 Gy (V20) de 2.4% (0.2–17).

Radiologiquement, 9.2% des lésions avaient disparu au CT-scanner thoracique de suivi et plus de la moitié étaient contrôlées (53.5%), tandis que 33.8% montraient une réponse partielle et une minorité progressaient (0.7%).

### *CyberKnife® versus autres techniques de SBRT*

Comparé aux deux autres machines de radiothérapie, le CyberKnife® a traité des volumes tumoraux macroscopiques (GTV) semblables (2.1 vs 1.4 cm<sup>3</sup>, p=0.84), tout en réduisant significativement les PTV (12.3 vs 21.9 cm<sup>3</sup>, p=0.013), MLD (2.6 vs 4.1 cm<sup>3</sup>, p<0.0001), V5 (13.5 vs 19.9 cm<sup>3</sup>, p=0.002) et V20 (2.3 vs 5.4 cm<sup>3</sup>, p<0.0001). Le taux de contrôle local à 2 ans était de 96.2% (90.8–100) avec le CyberKnife® et 98.2% (94.4–100) en TomoTherapy® ou VMAT, sans différence significative entre les différentes techniques (p=0.68) (Fig. 47).

Enfin, l'incidence de la radiotoxicité augmentait au-delà d'une V5 > 17.2% (77.4 vs 56%, p=0.021), indépendamment de l'appareil employé (p=0.56) (Fig. 48).



**Figure 47.** Contrôle local selon la machine de radiothérapie employée. SBRT = radiothérapie stéréotaxique (*stereotactic body radiation therapy*). VMAT = arc-thérapie volumétrique avec modulation d'intensité (*volumetric modulated arc-therapy*).

Variable	Toxicity (%)		P-value	Acute toxicity (%)		P-value	Late toxicity (%)		P-value
	Yes	No		Yes	No		Yes	No	
CyberKnife® (n = 71)	70.4	29.6	0.56	54.9	45.1	0.79	28.2	71.8	0.51
Others (n = 40)	65.0	35.0		57.5	42.5		22.5	77.5	
PTV volume [cm <sup>3</sup> ]:									
≤ 8.1 (n = 52)	65.4	34.6	0.49	50.0	50.0	0.21	21.2	78.8	0.29
> 8.1 (n = 52)	71.7	28.3		62.3	37.7		30.2	69.8	
V5 [%]:									
≤ 17.2 (n = 52)	<b>56.0</b>	<b>44.0</b>	<b>0.021*</b>	46.0	54.0	0.06	22.0	78.0	0.60
> 17.2 (n = 52)	<b>77.4</b>	<b>22.6</b>		64.2	35.8		26.4	73.6	
V20 [%]:									
≤ 2.4 (n = 52)	60.4	39.6	0.14	50.9	49.1	0.36	18.9	81.1	0.19
> 2.4 (n = 52)	74.0	26.0		60.0	40.0		30.0	70.0	
MLD [Gy]:									
≤ 3.7 (n = 52)	61.5	38.5	0.21	50.0	50.0	0.24	25.0	75.0	0.95
> 3.7 (n = 52)	73.1	26.9		61.5	38.5		25.0	75.0	
Cumulative MLD [Gy]:									
≤ 7.9 (n = 12)	61.1	38.9	0.14	53.7	46.3	0.60	22.2	77.8	0.54
> 7.9 (n = 8)	74.5	25.5		58.8	41.2		27.5	72.5	

**Figure 48.** Facteurs prédictifs de radiotoxicité. PTV = volume cible prévisionnel (*planning target volume*). V5 = volume (pulmonaire) recevant au moins 5 Gy. V20 = volume (pulmonaire) recevant au moins 20 Gy. MLD = dose moyenne aux poumons (*mean lung dose*).

### III.2.1.4. Discussion & Conclusion

Le CyberKnife® permet d'atteindre une excellente efficacité clinique en SBRT pulmonaire (96.2% de contrôle local à 2 ans), tout en réduisant la dose diffusée aux poumons par rapport aux autres appareils de traitement. L'utilisation du CyberKnife® semble donc particulièrement intéressante pour diminuer le risque de pneumopathie radique en cas de ré-irradiation (448, 449), et prévenir le risque de cancer secondaire (450).

En conclusion, l'usage du CyberKnife® apparaît tout à fait pertinent pour nos expériences de radiobiologie appliquée à la clinique, mises en œuvre dans l'article suivant.

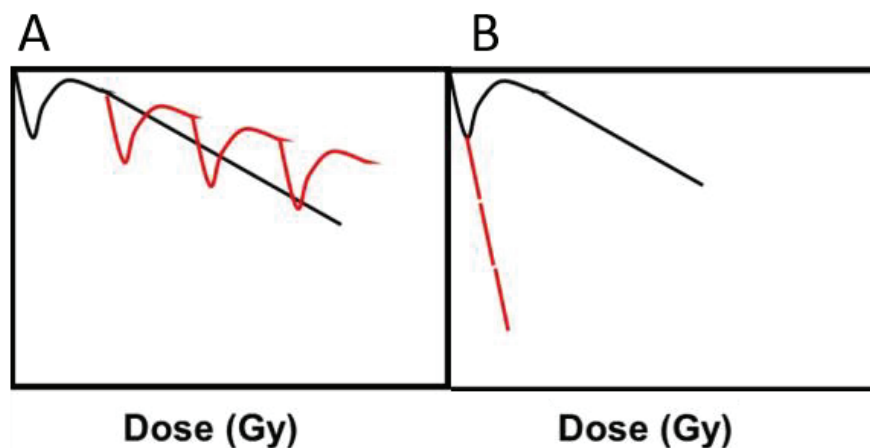
### III.2.2. Article 3 - Phénomène HRS en radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife®

**Le Reun E**, et al. Influence of the hypersensitivity to low dose phenomenon on the tumor response to hypofractionated stereotactic body radiation therapy. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 5;15(15):3979. doi: 10.3390/cancers15153979. (451)

#### III.2.2.1. Contexte

D'après la Revue C, la LDRT anti-tumorale s'expliquerait à l'échelle cellulaire par le phénomène d'hypersensibilité aux faibles doses (HRS), et à l'échelle moléculaire par un retard de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (ou RIANS pour *radiation-induced ATM nucleoshuttling*) (424).

Par ailleurs, une séance de radiothérapie stéréotaxique (ou SBRT pour *stereotactic body radiation therapy*) délivre une multitude de microfaisceaux de faibles doses (24) (cf. § I.1.1.3). Précisément, l'appareil CyberKnife® (439) délivre quelques Gy/séance en environ 95-200 microfaisceaux (452). À ce titre, une séance de SBRT pourrait être propice à la survenue d'un effet HRS (Fig. 49). Le but du présent article était donc de confirmer la possibilité d'un effet HRS en SBRT et, le cas échéant, de l'expliquer par un retard de RIANS.



**Figure 49.** Courbe de survie d'une cellule hyper-radiosensible aux faibles doses (HRS) après : (A) répétition de dose > 1 Gy, ou (B) répétition de faible dose < 1 Gy.

#### III.2.2.2. Matériels & Méthodes

Nous avons cultivé à confluence 8 lignées cellulaires, réparties en trois catégories :

- 4 lignées tumorales HRS+ : Ln229 (glioblastome), U87 (glioblastome), A549 (adénocarcinome pulmonaire), HT29 (adénocarcinome colorectal).

- 2 lignées tumorales témoins HRS- : U373 (glioblastome), SNU475 (carcinome hépatocellulaire).
- 1 lignée de tissu sain HRS+ : 13HNG (fibroblaste cutané).
- 1 lignée de tissu sain témoin HRS- : AG1521 (fibroblaste cutané).

Les lignées cellulaires ont été irradiées à l'aide de trois appareils : i) un irradiateur orthovolté standard à débit de dose de 4 Gy/min, avec des doses croissantes de 0–3 Gy ; ii) le CyberKnife® (Accuray, USA) du Centre Léon Bérard de Lyon ; et iii) le CyberKnife® (Accuray, USA) du CHUV de Lausanne (439), selon quatre fractionnements différents :

- dose unique de 0.2 Gy (1x0.2Gy)
- dose unique de 2 Gy (1x2Gy)
- répétition de dix doses de 0.2 Gy séparées entre elles de 2 min d'interruption (10x0.2Gy), conduisant à une séance de traitement d'environ 20 min
- dose de 2 Gy délivrée aléatoirement selon l'algorithme du CyberKnife® (2Gy "Cyber").

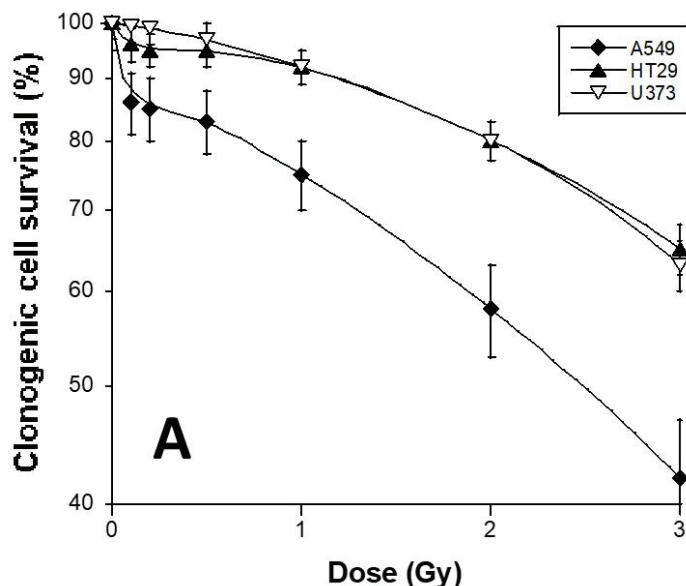
Les cellules ont ensuite fait l'objet de tests de survie clonogénique, tandis que les cassures double-brin d'ADN (CDB) ont été identifiées à différents temps post-irradiation ( $t_0$ , 1h, 4h, 24h) par immunofluorescence (FITC) des foci  $\gamma$ H2AX, à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus® (Olympus, France).

### III.2.2.3. Résumé des résultats

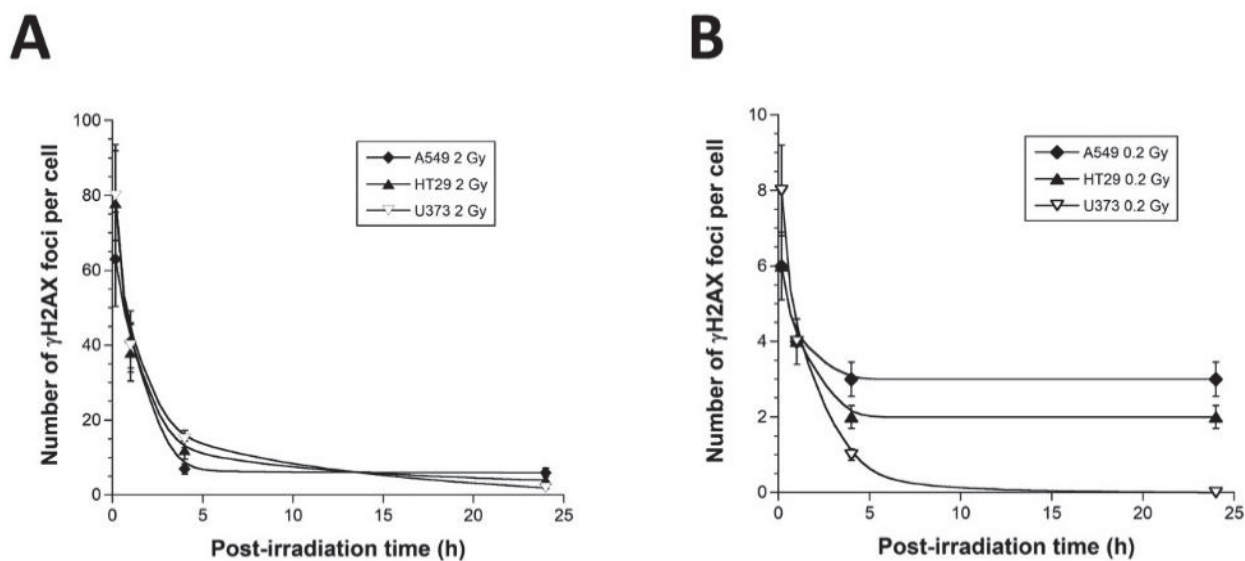
#### *Caractérisation du statut HRS*

Après irradiation standard, le statut HRS des différentes lignées cellulaires (tumeurs et tissus sains) a pu être déterminé par deux techniques. Tout d'abord sur le plan cellulaire, les courbes de survie clonogénique ont objectivé une surmortalité dans les doses faibles (autour de 0.2 Gy), non conforme au modèle linéaire quadratique (LQ) classique, pour certaines lignées identifiées comme étant HRS+ (Fig. 50). Sur le plan moléculaire, certaines lignées présentaient plus de CDB (foci  $\gamma$ H2AX) à 24h post-irradiation de 0.2 Gy que de 2 Gy, traduisant un statut HRS+ (Fig. 51). Au total, nous avons ainsi confirmé le statut HRS+ des lignées tumorales (Ln229, U87, A549, HT29) et saine (13HNG), ainsi que le statut HRS- des lignées témoins tumorales (U373 et SNU475) et saine (AG1521).





**Figure 50.** Courbes de survie clonogénique de 3 des 6 lignées tumorales étudiées, après irradiation X orthovoltée standard. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  SEM) de chaque triplicata d’expériences. Les données de survie ont été ajustées au modèle LQ et à sa variante HRS.

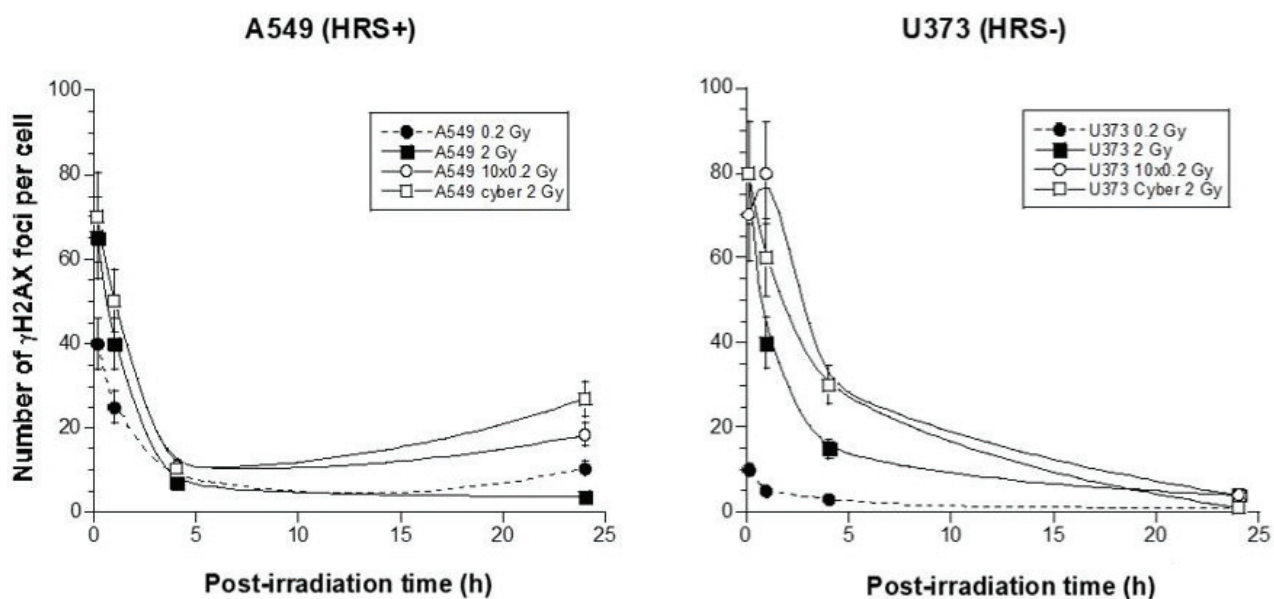


**Figure 51.** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX pour 3 des 6 lignées tumorales étudiées, après irradiation orthovoltée standard X de 2 Gy (A) et 0.2 Gy (B). Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  SEM) de chaque triplicata d’expériences.

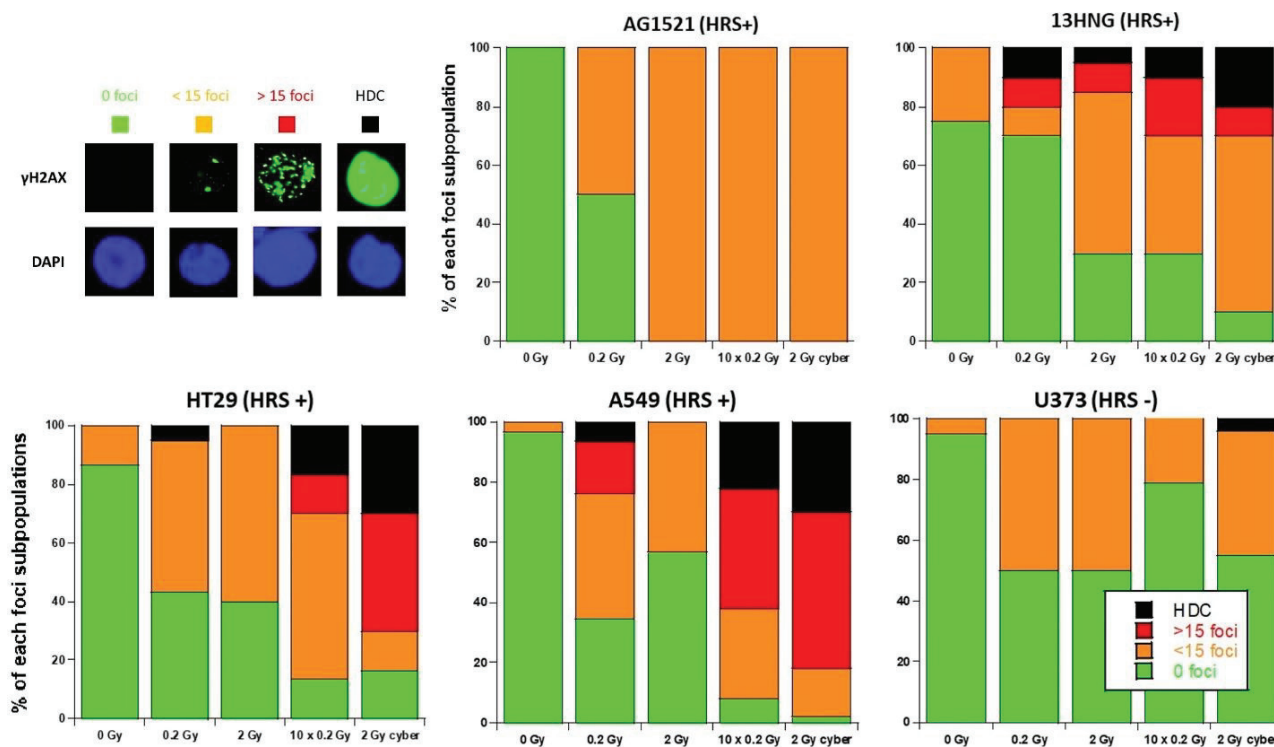
*Phénomène HRS post-SBRT par CyberKnife®, expliqué par le modèle RIANs*

Une fois le statut HRS confirmé, les lignées HRS+ (tumeurs et tissus sains) ont été irradiées au CyberKnife® selon les quatre fractionnements pré-cités. Les résultats sont présentés dans les Figures 52 et 53 :

- les cellules HRS+ présentait plus de CDB (foci  $\gamma$ H2AX) à 24h post-irradiation de 1x0.2Gy que de 1x2Gy. Ces résultats montrent que la radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife® offre des conditions propices à la survenue d'un effet HRS chez les cellules HRS+.
- les cellules HRS+ présentait plus de CDB (foci  $\gamma$ H2AX) à 24h post-irradiation de 10x0.2Gy que de 1x2Gy. Ces résultats suggèrent un possible effet supra-additif en cas de répétitions de faibles doses entrecoupées d'un intervalle de temps ( $\Delta t = 2$  min).
- après irradiation de 1x2Gy, on observait plus de CDB (foci  $\gamma$ H2AX) à 24h dans les cellules HRS+ que dans les cellules HRS-. Ces résultats montrent que les cellules HRS+ appartiennent au groupe II de radiosensibilité, et expriment donc un retard de RIANS.
- 24h après irradiation 1x0.2Gy et 10x0.2Gy, les cellules Ln229 (glioblastome HRS+) apparaissaient hyper-lésées (foci  $\gamma$ H2AX indénombrables), contrairement aux cellules U373 (glioblastome HRS-) pour lesquelles le nombre de foci  $\gamma$ H2AX par noyau restait inférieur à 15. Ces résultats montrent que le statut HRS ne dépend pas du type histologique.



**Figure 52.** Cinétique des foci  $\gamma$ H2AX radio-induits pour 2 des 6 lignées tumorales étudiées, selon différents fractionnements stéréotaxiques délivrés par Cyberknife®. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  SEM) de chaque triplicata d'expériences.



**Figure 53.** Diagrammes en barres des foci  $\gamma$ H2AX de 5 des 8 lignées étudiées, 24h post-irradiation au Cyberknife®, en distinguant quatre catégories cellulaires : aucun focus  $\gamma$ H2AX, moins de 15 foci  $\gamma$ H2AX, plus de 15 foci  $\gamma$ H2AX, et cellules hyper-lésées (ou HDC pour *highly-damaged cells*) avec multitude de foci indénombrables. Le cartouche correspond à un exemple représentatif de foci  $\gamma$ H2AX au sein du noyau cellulaire coloré au DAPI (bleu).

### III.2.2.4. Discussion & Conclusion

En conclusion, une séance de radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife® peut, au même titre qu'une séance de RT3D utilisant de nombreux faisceaux, être considérée comme une succession de LDRT intra-séance, offrant des conditions propices à la survenue d'un effet HRS, et dont l'efficacité est exacerbée en cas de tumeur du groupe II HRS+.

Le phénomène HRS, qui ne dépend ni du type histologique ni de l'intégrité du tissu, peut s'expliquer par un retard de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (RIANS). Afin de potentialiser l'efficacité anti-tumorale et limiter les risques de radiotoxicité ou de second cancer, une SBRT par CyberKnife® s'avérerait donc optimale sur une tumeur HRS+ entourée de tissus sains HRS-, autrement dit chez des patients du groupe I (radiatorésistants).

Le statut HRS pourrait être vérifié par un test prédictif basé sur des biomarqueurs de CDB post-irradiation à 2 Gy et 0.2 Gy. Concernant la tumeur, un tel test pourrait se faire sur matériel de biopsie ou de pièce opératoire, théoriquement disponible avant tout traitement de RT. Concernant les tissus sains, le statut HRS pourrait s'évaluer à partir de biopsies cutanées.

### III.3. DIAGNOSTIC PRÉCOCE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET PERSPECTIVES DE LDRT (Article 4)

Berthel E, Pujo-Menjouet L<sup>#</sup>, Le Reun E<sup>#</sup>, et al. Toward an Early Diagnosis for Alzheimer's Disease Based on the Perinuclear Localization of the ATM Protein. *Cells*. 2023 Jun 29;12(13):17-47. doi: 10.3390/cells12131747. (453)

#### III.3.1. Contexte

Première cause de démence à travers le monde (103), la maladie d'Alzheimer (MA) accuse une physiopathologie encore mal connue, faisant ainsi l'objet d'un diagnostic souvent probabiliste et rarement de certitude (104).

Depuis les années 1980, quelques études ont montré que les cellules de patients MA étaient radiosensibles et présentaient des dysfonctionnements dans les systèmes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB) (101, 102, 122, 123) et ce, au même titre que d'autres maladies neurodégénératives telles que la chorée de Huntington (341), la sclérose tubéreuse de Bourneville (342), certaines formes de xeroderma pigmentosum D (343) et la neurofibromatose de type 1 (411). Ces quatre dernières pathologies appartiennent chacune au groupe II de radiosensibilité, expliqué par un retard de transit cyto-nucléaire radio-induit de la protéine ATM (RIANS) lié à la présence cytoplasmiques de protéines X substrats d'ATM (huntingtine, tubérine, XPD et neurofibromine [NF1], respectivement) (341-343, 411). De manière analogue, il est donc possible que les cellules de patients MA surexpriment aussi dans le cytoplasme une protéine X, responsable de la séquestration d'ATM en dehors du noyau.

Cet article visait donc à expliquer la radiosensibilité des patients MA sur le plan moléculaire via le modèle RIANS, ouvrant le cas échéant la voie vers une LDRT "anti-Alzheimer".

#### III.3.2. Matériels et Méthodes

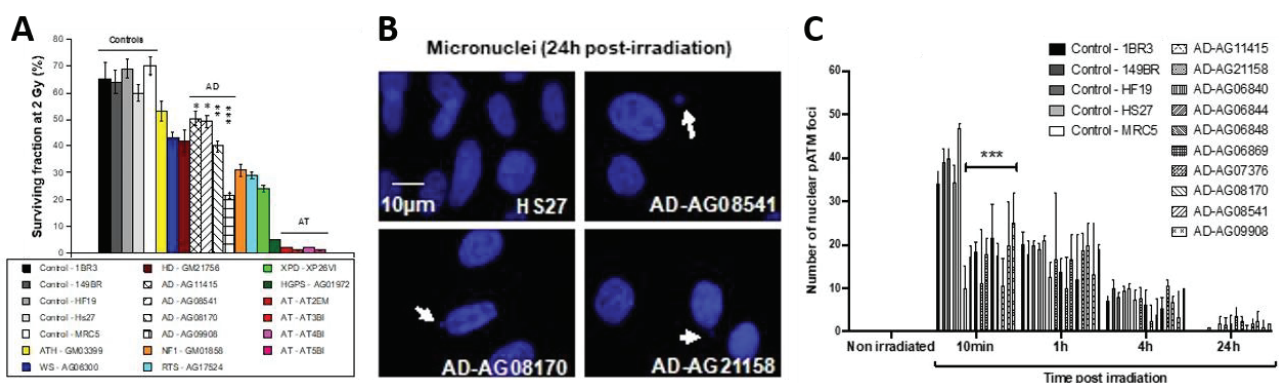
Nous avons utilisé 10 lignées fibroblastiques cutanées de patients atteints de MA, et 5 lignées fibroblastiques cutanées témoins. Le traitement ZOPRA désigne une association de zolédronate et pravastatine. Les cellules ont été irradiées par photons X de 6 MeV à la dose de 2 Gy, à l'aide d'un appareil de radiothérapie du Centre Léon Bérard de Lyon. La survie cellulaire intrinsèque a été quantifiée par test de clonogénicité à 2 Gy (fraction survivante à 2 Gy ou SF2). Les protéines ATM et APOE ont été identifiées et quantifiées par

immunofluorescence, immunoblot et test de ligation de proximité (ou PLA pour *proximity ligation assay*). Les analyses statistiques ont été réalisées soit par le logiciel PRISM (GraphPad Software, San Diego, USA), soit en utilisant Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA). Des tests ANOVA ont été effectués pour une analyse point par point.

### III.3.3. Résumé des résultats

#### *Radiosensibilité des fibroblastes MA liée à un retard de RIANs*

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la MA est associée à une radiosensibilité cellulaire significative mais modérée (Fig. 54A). Après irradiation X de 2 Gy, on observe des taux de foci  $\gamma$ H2AX et pATM anormalement bas, et des taux de micronoyaux et foci MRE11 anormalement élevés (Fig. 54B), le tout étant cohérent avec le retard de RIANs principalement observé à 10min post-irradiation (Fig. 54C).

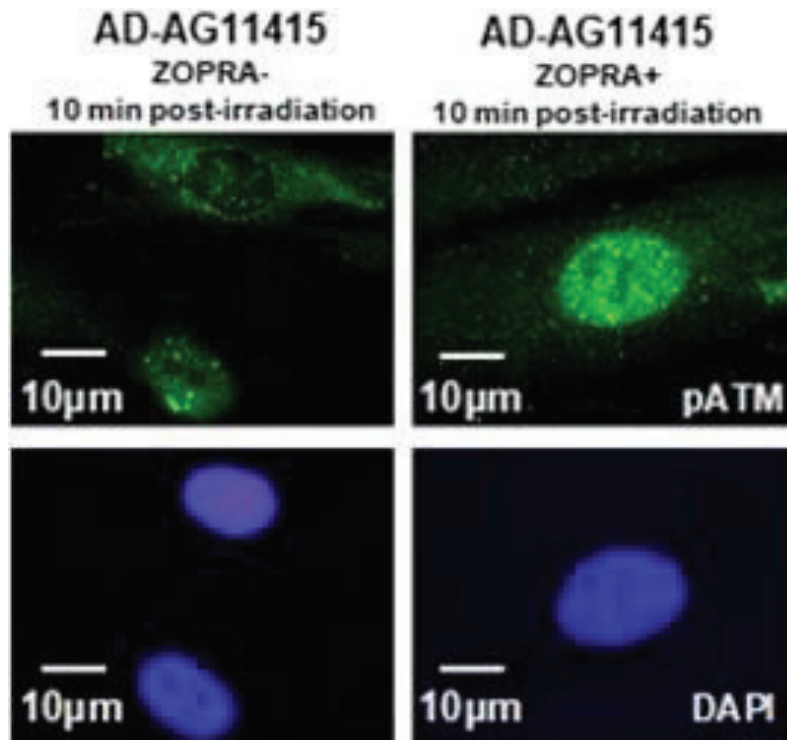


**Figure 54.** Réponse aux radiations des fibroblastes de patients atteints de maladie d'Alzheimer. **(A)** Fraction survivante à 2 Gy X (SF2). **(B)** Photos représentatives d'immunofluorescence de micronoyaux à 24h post-irradiation 2 Gy X. **(C)** Histogrammes montrant le nombre de foci pATM nucléaires par cellule évalués avant irradiation ou à 10 min, 1h, 4h et 24h post-irradiation 2 Gy X.

#### *Radioprotection partielle des fibroblastes MA après traitement ZOPRA*

Dans le cadre du modèle RIANs, il a été montré que l'abondance de monomères ATM dans le noyau améliorerait la radiorésistance (218). Par ailleurs, l'association de bisphosphonates et de statines, en particulier zolédronate/pravastatine (ZOPRA), est connue pour son effet radioprotecteur (341-343). Appliqué à 10 lignées cellulaires de fibroblastes AD, le traitement ZOPRA a contribué à augmenter le nombre de foci  $\gamma$ H2AX et pATM à 10min post-irradiation (Fig. 55). Toutefois, l'application du traitement ZOPRA n'a pas été convaincante et son effet ne s'est pas avéré significatif alors que celui-ci est généralement appliqué avec succès à tous les autres syndromes testés au laboratoire depuis

10 ans. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le traitement ZOPRA peut, en favorisant le RIANS, radioprotéger les fibroblastes MA.

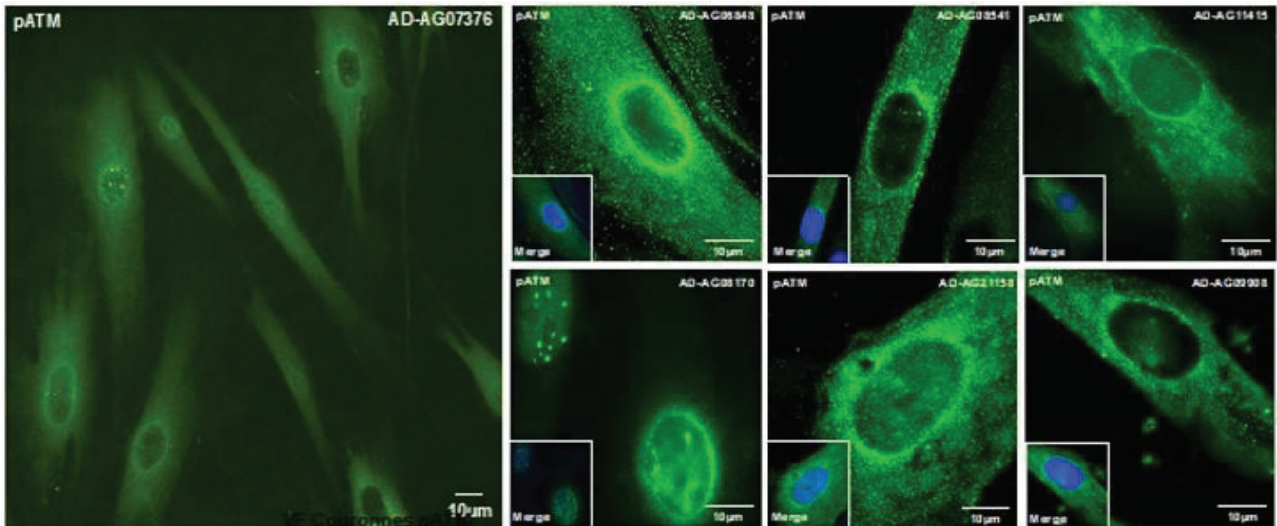


**Figure 55.** Images représentatives d'immunofluorescence de foci pATM nucléaires dans des fibroblastes de patients atteints de maladie d'Alzheimer, à 10min post-irradiation 2 Gy X, avec ou sans traitement ZOPRA préalable.

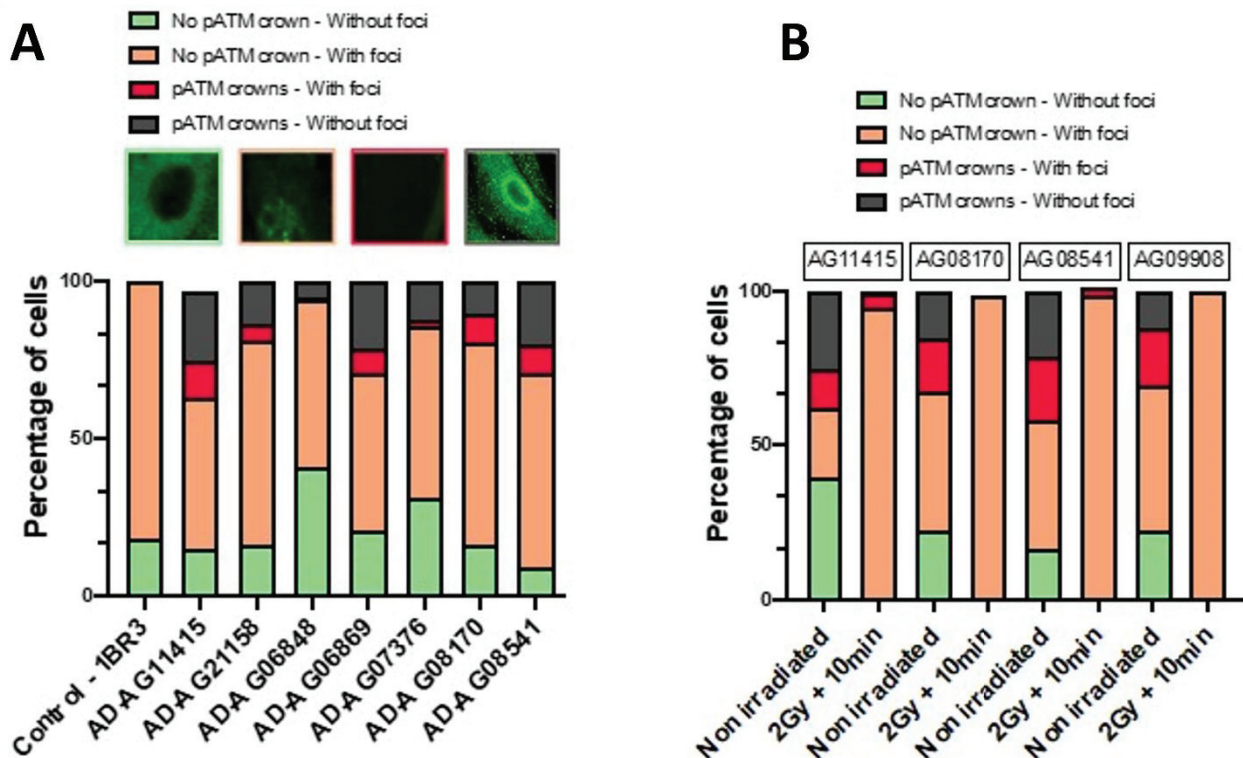
*Couronnes périnucléaires de pATM spécifiques aux cellules MA : présentes spontanément, et disparaissant après irradiation*

De manière tout à fait inattendue, les fibroblastes MA présentaient spontanément (sans irradiation préalable) une coloration spécifique pATM répartie en périphérie du noyau (Fig. 56). De manière plus précise, nous avons identifié deux types de couronnes pATM spontanées en immunofluorescence, en proportions variables selon les lignées cellulaires MA étudiées (Fig 57A) : soit une fine couronne périnucléaire avec présence de foci nucléaire, soit une épaisse couronne périnucléaire sans foci nucléaire. À notre connaissance, ces "couronnes" périnucléaires d'ATM phosphorylé n'avaient pas été décrites dans la MA ni dans aucun autre syndrome. Cette caractéristique histologique pourrait ainsi constituer un élément diagnostique fort, qui plus est du vivant des patients. La séquestration cytoplasmique d'ATM pourrait ainsi expliquer le retard de RIANS observé précédemment.

Par ailleurs, on constate une disparition des couronnes périnucléaires pATM 10 min après une irradiation de 2 Gy des lignées cellulaires MA (Fig 57B). Ces données suggèrent elles-aussi un effet protecteur de la radiothérapie, qui sera discuté ci-après (cf. § III.3.4).



**Figure 56.** Images d'immunofluorescence représentatives de la localisation périnucléaire de la protéine pATM dans des fibroblastes de patients atteints de maladie d'Alzheimer.

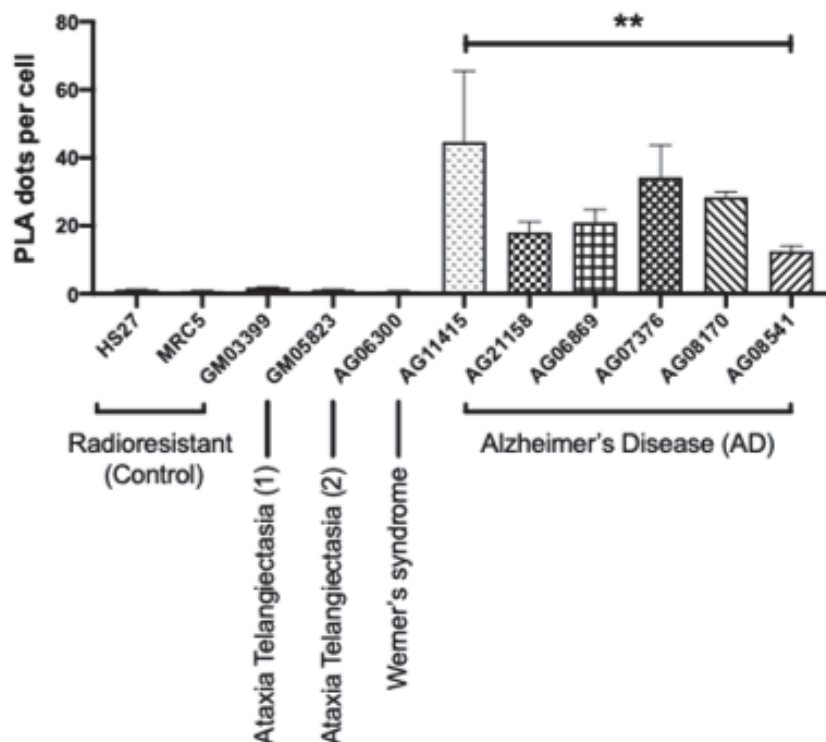


**Figure 57.** (A) Proportions relatives des 4 motifs spécifiques de marquage pATM observés en immunofluorescence dans 7 lignées cellulaires de maladie d'Alzheimer (MA). (B) Proportions relatives des 4 motifs spécifiques de marquage pATM observés en immunofluorescence dans 4 lignées cellulaires de MA, avant ou après irradiation (2 Gy + 10 min).

### Interaction protéique ATM-APOE spécifique aux cellules MA

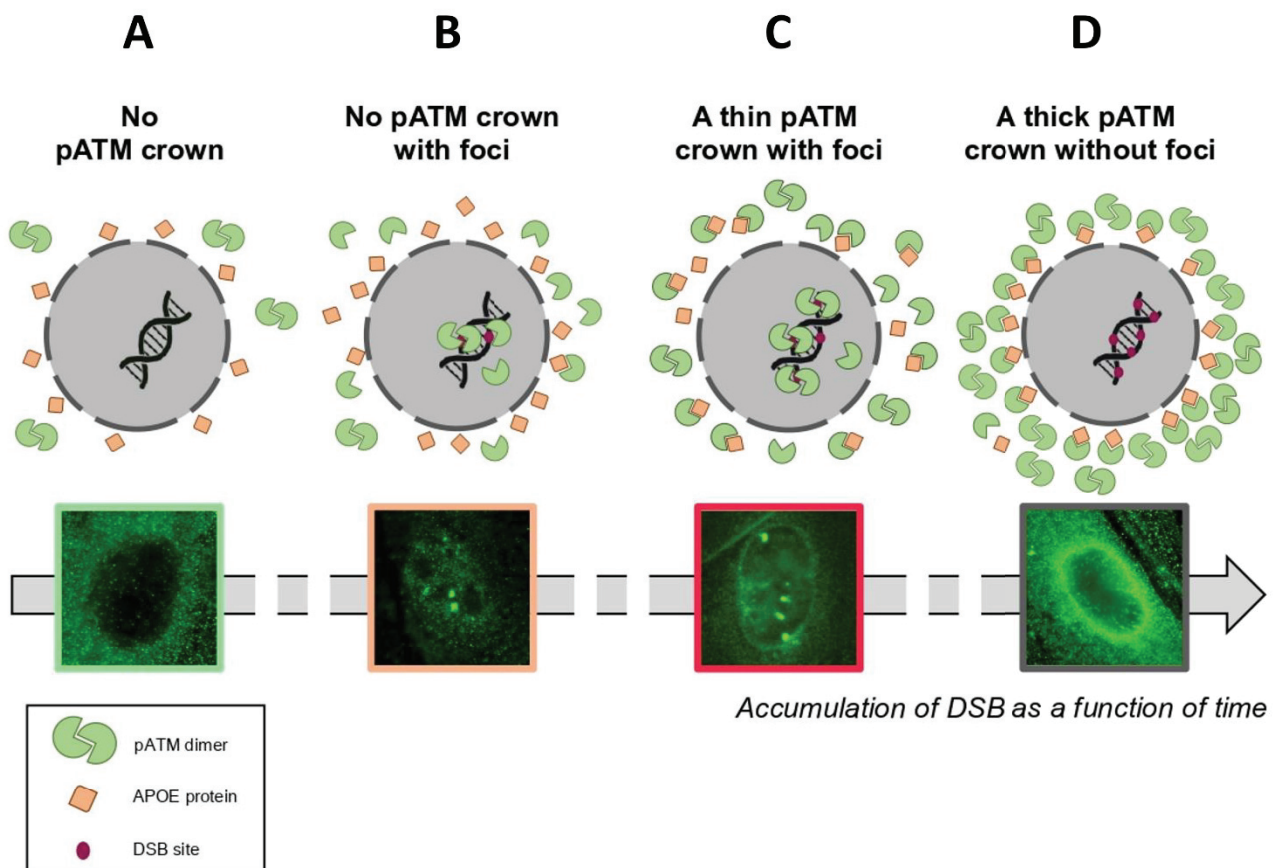
Dans le cadre du modèle RIANs, les monomères d'ATM peuvent être séquestrés dans le cytoplasme par des substrats protéiques d'ATM surexprimés, appelés "protéines X" (218). Nous avons donc recherché une protéine X qui serait à la fois surexprimée dans le cytoplasme et substrat de phosphorylation d'ATM dans les fibroblastes AD. Parmi les candidats potentiels, nous avons rapidement éliminé les protéines Tau et le peptide amyloïde-A $\beta$ 42 car ils ne présentaient pas de coloration périnucléaire évidente. Nos expériences sur la protéine APOE, activement étudiée dans la MA (454), ont en revanche montré une surexpression cytoplasmique et une localisation périnucléaire spontanées dans les fibroblastes AD testés, ainsi qu'une interaction spécifique avec ATM après test de ligation de proximité (ou PLA pour *proximity ligation assay*) (Fig. 58).

Au total, il est donc vraisemblable qu'en plus de la couronne périnucléaire de dimères pATM décrite précédemment, il existe une deuxième couronne périnucléaire, plus interne que la précédente, et constituée quant à elle de complexes ATM-APOE. Cette hypothèse expliquerait ainsi les deux types de marquages périnucléaires pATM observés en immunofluorescence que nous avons précédemment décrits (Fig. 59).



**Figure 58.** Test de ligation de proximité (PLA) réalisé avec des anticorps anti-ATM et anti-APOE sur cellules non-irradiées de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Histogrammes montrant les points PLA, marqués par immunofluorescence, qui représentent l'interaction ATM-APOE détectée.





**Figure 59.** Modèle mécanistique de formation des couronnes périnucléaires pATM dans les fibroblastes de patients atteints de maladie d'Alzheimer (MA).

**(A)** Dans une cellule de patient contrôle, des dimères pATM et la protéine APOE sont présents dans le cytoplasme. **(B)** Conformément au modèle RIANs, un stress environnemental oxydant entraîne des cassures double-brin de l'ADN (CDB) ainsi que la monomérisation des dimères pATM cytoplasmiques ; les monomères d'ATM diffusent alors dans le noyau pour activer la reconnaissance des CDB via la phosphorylation d'H2AX, et la réparation des CDB par suture NHEJ. **(C)** Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la surexpression d'APOE (substrat de phosphorylation de l'ATM) entraîne la formation préférentielle de complexes ATM-APOE agglutinés autour du noyau ("petite couronne" sur le versant externe de la membrane nucléaire), au détriment d'une diffusion cytonucléaire d'ATM. **(D)** À un stade plus avancé de MA, les monomères ATM qui ne peuvent pas diffuser dans le noyau se réassocient en formant des dimères pATM facilement visible par immunofluorescence sous forme de couronnes pATM périnucléaires ("grande couronne"), plus externe que la couronne de complexes ATM-APOE.

### III.3.4. Discussion & Conclusion

Mises en évidence pour la première fois, les couronnes périnucléaires de complexes protéiques ATM-APOE apparaissent comme un biomarqueur spécifique du vieillissement accéléré observé dans la MA. Ces complexes séquestrent la protéine ATM en dehors du noyau, entraînant ainsi un retard de RIANs lui-même responsable d'une vulnérabilité au stress génotoxique, qu'il soit exogène (par exemple radique, expliquant la radiosensibilité de groupe II) ou endogène (stress oxydatif chronique). En résulte une accumulation progressive des CDB non-reconnues, conduisant in fine vers la mort radiobiologique par sénescence. Le cerveau étant l'un des organes qui expriment le moins de protéine ATM

(455), on comprend alors que les symptômes neurodégénératifs puissent être au premier plan de la MA.

Sur le plan thérapeutique, rappelons que l'exposition aux radiations contribue à la monomérisation d'ATM et la dissociation des complexes ATM-APOE, permettant par la suite à certains monomères ATM de reconnaître les CDB. La RT apparaît ainsi comme une piste prometteuse pour le traitement de la MA. Reste alors à déterminer la dose préventive et/ou curative optimale.

Les doses classiquement utilisées en RT oncologique, de l'ordre de 2 Gy/séance, ont montré des résultats encourageants sur modèles murins de MA (115-117), sans toutefois d'amélioration probante chez l'homme (124). D'autres études cliniques évaluent actuellement des doses similaires en Suisse (NCT03352258, Hôpitaux Universitaires de Genève), aux États-Unis (NCT02359864, William Beaumont Hospitals) et en Corée du Sud (NCT04203121, Hôpital Universitaire Kyung Hee). Notons cependant que, même chez la souris, – mammifère pourtant moins radiosensible que l'homme (ex : la dose létale moyenne est de 15 Gy chez le rat contre 4,5 Gy chez l'homme) (456), – des améliorations cognitives ont été objectivées en réduisant la dose d'un fractionnement standard (5×2 Gy) à un schéma de LDRT (5×0.6 Gy) (429).

Ainsi, chez l'homme, une LDRT à dose hormétique (faible dose non génotoxique entre 20-75 mGy) (360) pourrait permettre une dissociation des couronnes périnucléaires, sans engendrer quelconque CDB supplémentaire. Indépendamment de nos conclusions, Cuttler et al. ont depuis 2016 publié deux *case reports* (118-121) et une étude clinique (126) dans lesquels l'irradiation holocrânienne à dose "scanographique" (40 mGy) suggère justement une amélioration des performances cognitives.

Enfin, comme nous l'avons explicité dans cet article, une éventuelle LDRT "anti-Alzheimer" pourrait s'associer à un traitement par biphosphonates/statines (ZOPRA), dans le but de faciliter le flux d'ATM vers les CDB.

### III.4. LDRT ANTI-INFLAMMATOIRE (données préliminaires)

Rôle des cytokines dans les mécanismes moléculaires de la LDRT anti-inflammatoire.  
*Données préliminaires.*

#### III.4.1. Contexte

Lors de la soumission de la revue C (424), un des relecteurs a particulièrement apprécié le chapitre sur l'inflammation et les hypothèses faites concernant l'implication potentielle de la protéine ATM dans la régulation des cytokines. Au commencement de cette thèse, il n'était *a priori* pas prévu de réaliser des expériences sur la réponse individuelle inflammatoire à l'irradiation au niveau tissulaire. Les nouveaux développements du modèle RIANS au sein du laboratoire et les commentaires positifs du relecteur nous ont donc encouragés à aller plus loin et établir un véritable modèle unifié de l'inflammation radio-induite avec le transit de la protéine ATM. Aussi ce chapitre est-il destiné à initier et structurer un projet visant à mieux comprendre la réponse inflammatoire radio-induite, et surtout à justifier l'usage de la LDRT pour traiter certaines douleurs ostéo-articulaires. Ce projet ne pouvant matériellement aboutir, d'ici la date de soutenance de la thèse, à une somme ordonnée de résultats et une publication soumise, nous présentons dans un premier temps le rationnel scientifique, l'énumération de plusieurs hypothèses, et la description de quelques expériences préliminaires. **À ce stade, nous avons donc délibérément choisi de ne pas associer ce thème à la discussion générale en fin de manuscrit.**

#### III.4.2. Rationnel scientifique

Au moment de l'envoi de ce manuscrit, les questions posées ci-dessus se sont structurées sous la forme d'un projet baptisé CYRANO. L'implication des cytokines pro- ou anti-inflammatoires interroge le rôle d'ATM dans la réponse tissulaire inflammatoire. La plupart des cytokines sont en effet des protéines X potentielles (405), et présentent une surexpression radio-induite dans le cytoplasme de cellules irradiées puis dans le milieu extra-cellulaire (cf. § III.4.2).

##### *Cytokines et ATM intra-cytoplasmiques*

La principale observation ayant motivé le projet CYRANO est qu'au moins 6 cytokines principales de la réponse à l'inflammation (IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$  pour les cytokines

pro-inflammatoires et IL1-ra, IL-13 et TGF- $\beta$  pour les cytokines anti-inflammatoires) sont des protéines cytoplasmiques portant des domaines SQ/TQ (405). De telles propriétés en font des protéines X potentielles, substrats d'ATM. Ainsi, connues pour leur induction post-stress (457), autrement dit une surexpression radio-induite généralement liée à la dose de radiation, ces cytokines pourraient s'associer avec et être phosphorylées par ATM. Cependant, la plupart des surexpressions radio-induites de cytokines qui sont décrites dans la littérature sont observées au moins 4h, voire plus de 24h après la dose. À ces temps post-irradiation, le flux de monomères ATM n'est pas nul mais reste réduit. Toutefois, plus la dose est élevée, plus les monomères ATM seront encore disponibles. Ainsi, plus la dose est élevée et plus la cytokine est surexprimée précocement, plus la probabilité d'observer des complexes ATM-cytokines et des cytokines phosphorylées est élevée.

#### *Cytokines et ATM extra-cellulaires*

L'étude de la littérature permet de connaître le comportement post-radique des cytokines pro- et anti-inflammatoires en dehors du cytoplasme. Dans le sérum de modèles murins arthrosiques, une étude a montré qu'une irradiation de l'ordre de 0.5-1 Gy entraîne une diminution de l'interleukine IL-17A pro-inflammatoire, ainsi qu'une augmentation des IL-4 et IL-6 anti-inflammatoires (144). Toujours chez la souris, Arenas et al. ont quant à eux mis en évidence une augmentation du TGF- $\beta$ 1 anti-inflammatoire après irradiation de 0.1-0.7 Gy (436, 437). Chez l'humain, des cellules endothéliales recevant 0.5-1 Gy montrent une diminution du TNF $\alpha$  pro-inflammatoire et une augmentation des interleukines IL-6, IL-10 et du TGF- $\beta$ 1 anti-inflammatoires (458, 459). Une étude clinique a par ailleurs observé une augmentation du TGF- $\beta$ 1 24h après LDRT pan-pulmonaire en séance unique de 0.5 Gy, chez 30 patients atteints de COVID-19 (157). Le Tableau 5 résume le comportement des cytokines pro- et anti-inflammatoires après LDRT.

**Tableau 5.** Comportement cytokinique après radiothérapie par faibles doses (LDRT). IL = interleukine. TNF = facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*). TGF = facteur de croissance transformant (*transforming growth factor*).

Population	Schéma d'irradiation	Comportement cytokinique	Référence
<b>Modèles murins</b>			
Sérum arthrosique	0.5–1 Gy	Augmentation de l'IL-4 Augmentation de l'IL-6	(144)
Abdomen	0.3 Gy	Diminution de l'IL-17A Augmentation du TGF- $\beta$ 1	(436)
Corps entier de modèles d'inflammation chronique	0.1 Gy	Augmentation du TGF- $\beta$ 1	(437)
	0.3 Gy		
	0.6 Gy		
<b>Cellules humaines</b>			
Cellules endothéliales	5 x 1.0 Gy 5 x 0.5 Gy	Augmentation de l'IL-10 Augmentation du TGF- $\beta$ 1	(458)
Cellules endothéliales	0.3–0.7 Gy	Diminution du TNF $\alpha$ Augmentation de l'IL-6 Augmentation du TGF- $\beta$ 1	(459)
<b>Clinique</b>			
30 patients atteints de COVID-19	0.5 Gy (poumons bilatéraux)	Augmentation du TGF- $\beta$ 1 à 24h post-LDRT	(157)

### III.4.3. Hypothèses

Les cytokines étant généralement émises par les cellules dans le milieu extracellulaire, se pose alors la question suivante : existe-t-il une relation entre la quantité de cytokines surexprimées dans le cytoplasme et le déclenchement de l'émission de cytokine à l'extérieur de la cellule ? Le cas échéant, cela signifie que l'émission de cytokine dans le milieu extracellulaire dépend également de la dose de radiation et pourrait concerner des cytokines phosphorylées par ATM à condition que l'état de phosphorylation ne soit pas perdu par le passage à travers la membrane cellulaire. Notons que l'irradiation fragilise les membranes cellulaires et augmente leur perméabilité (460). D'ailleurs, l'irradiation a justement aussi été utilisée pour la transfection de plasmides dans les cellules. Mais, encore une fois, l'émission de cytokines en dehors de la cellule s'effectuerait plusieurs heures après l'irradiation et, de toute façon, quelques heures après leur surexpression dans le cytoplasme. Ainsi, il est plus probable que ce soit grâce à leur petite taille que les cytokines puissent passer la barrière cellulaire plutôt que grâce à l'irradiation directement.

Quel serait le rôle de la protéine ATM dans le cytoplasme avant que les cytokines soient sécrétées ? On peut concevoir un système compétitif basé sur le principe suivant : toute complexation des cytokines avec ATM empêcherait alors le passage de la cytokine en dehors de la membrane nucléaire. Ainsi, imaginons deux cytokines A et B, A étant plus abondante dans le cytoplasme à un instant  $t$  que B. À affinité égale, la complexation de ATM avec A serait plus probable qu'avec B, ce qui augmenterait alors d'autant la compétition entre les

cytokines A non complexées et les cytokines B pour l'excrétion au-delà de la membrane cellulaire.

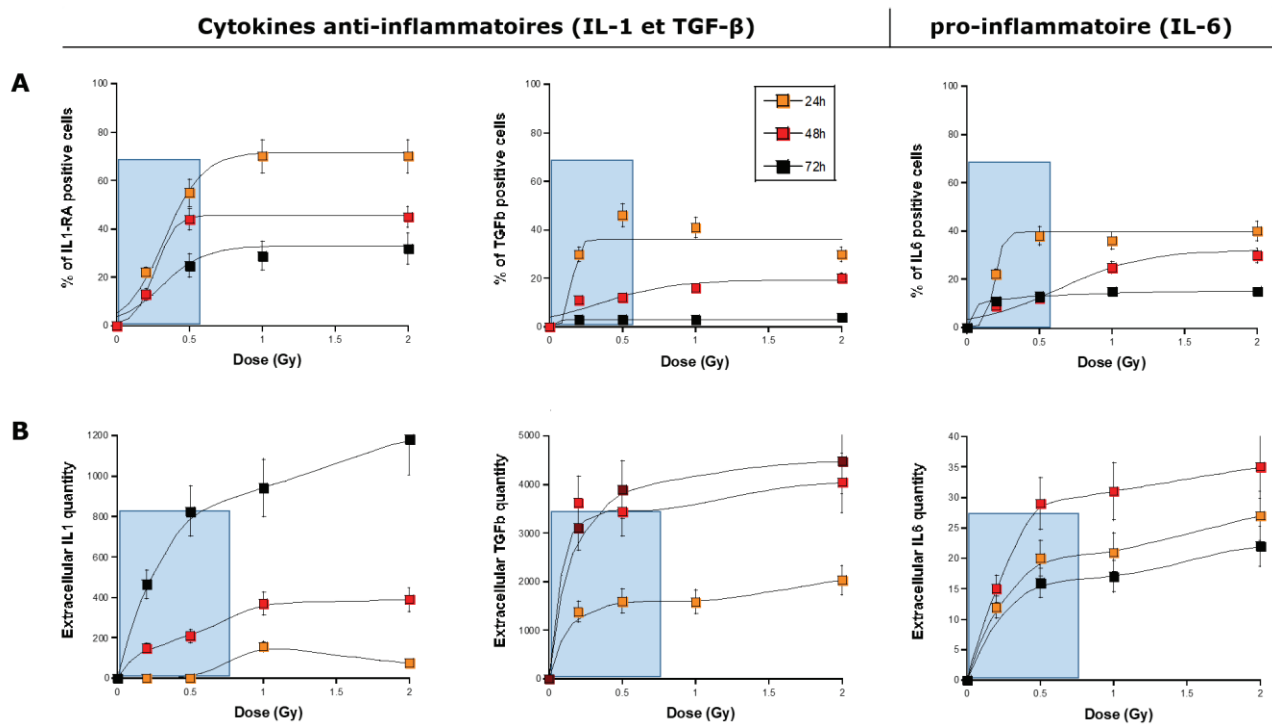
En ce qui concerne les propriétés pro- ou anti-inflammatoires des cytokines, sont-elles liées à leur affinité pour ATM dans le cytoplasme ? En dehors de la question de la phosphorylation, il apparaît que la plupart des cytokines, une fois secrétées, interagissent avec des partenaires spécifiques d'une façon qui ne dépend pas forcément de la protéine ATM à l'extérieur des cellules irradiées (macrophages, interleukines, membranes cellulaires), laissant ainsi la place à une grande diversité des cas avec une spécificité d'abondance relative des cytokines pro- ou -anti-inflammatoires pour chaque tissu.

Investigant les faibles doses, le projet CYRANO permettra de mieux comprendre l'intérêt de la LDRT pour déclencher certains processus antalgiques et anti-inflammatoires. La cytométrie de flux permettra de mesurer le taux de cytokines exprimées dans le cytoplasme après irradiation, tandis que le taux de cytokines secrétées à l'extérieur des cellules après irradiation sera mesuré par technique ELISA.

#### **III.4.4. Résultats préliminaires et ébauche d'un premier modèle**

Les tous premiers résultats montrent que les cytokines IL-1 et IL-6 sont bien surexprimées dans les cellules à partir de 4h pour les plus fortes doses testées (4 et 8 Gy) mais apparaissent également en quantité mesurable (pour IL-1) 24h après 0.2 Gy (Fig. 60A). En parallèle, les tests ELISA révèlent que les premières excrétions extracellulaires surviennent plus tardivement (plutôt 48 à 72h après l'irradiation) mais restent toujours observées dès 0.2 Gy. Notons ici l'importance du nombre de cellules irradiées pour que les excrétions soient à la fois précoces et significatives (Fig. 60B).

Il apparaît donc ici que, même à faibles doses, des cytokines peuvent être émises par les cellules irradiées et donc influencer sur les processus de réponse inflammatoire et à la douleur. Par ailleurs, une faible dose libérant, comme on l'a vu, des monomères ATM, il faudra préciser l'influence de la phosphorylation des cytokines dans le cytoplasme, ainsi que le rôle qu'elle peut jouer dans leur activation et leur émission extracellulaire.



**Figure 60.** Réponse cytokinique radio-induite. **(A)** Cytokines intra-cellulaires mesurées par cytométrie de flux, et exprimées en % de cellules positives. **(B)** Cytokines extra-cellulaires mesurées par test ELISA sur surnageant de milieu de culture (données du laboratoire recueillies par Jallas AC, Trigon V et Granzotto A).

## IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

---

### IV.1. INTRODUCTION, ÉTAT DE L'ART, ET VALIDATION DES OUTILS

Cette première partie de résultats a notamment permis de dresser l'inventaire des différentes pathologies susceptibles d'être traitées par radiothérapie par faibles doses (LDRT), dont trois grandes entités nosologiques se distinguent : cancer, maladie d'Alzheimer, et maladies inflammatoires (424).

Dans le but d'explorer les mécanismes moléculaires de la LDRT dans ces différentes indications, nous avons dans un premier temps approfondi la compréhension du modèle RIANS. L'Article 1 a ainsi permis de mettre en évidence la pertinence de la protéine ATM en radiobiologie, par comparaison avec d'autres biomarqueurs plus classiques (401). La Revue A a quant à elle montré qu'à la suite d'un stress génotoxique, et en particulier une irradiation, des protéines X peuvent séquestrer ATM dans le cytoplasme, conduisant à un retard de transit cyto-nucléaire d'ATM (RIANS), et potentiellement à une radiosensibilité et un risque de cancer (403).

Forts de ces notions de radiobiologie fondamentale, nous avons ensuite référencé les différentes hypothèses mécanistiques cellulaires et moléculaires de la LDRT. Il ressort que l'usage de faibles doses de RI peut retarder le RIANS, entraînant un phénomène HRS anti-tumoral, dissocier des complexes X-ATM dans le cytoplasme, comme dans le cas de maladies neurodégénératives (424).

Nous avons par ailleurs montré, grâce à la Revue B, que la répétition de faibles doses au sein d'une même séance de traitement peut entraîner un effet biologique supra-additif sur une cellule souffrant d'un retard de RIANS (groupe II) (413). À plus forte raison, une séance de RT favorable à la répétition d'effets HRS pourrait entraîner un effet HRS supra-additif sur une cellule HRS+ ; l'hypothèse d'un tel phénomène en SBRT ouvrirait le champ de la partie suivante.

### IV.2. LA LDRT ONCOLOGIQUE

Le modèle RIANS, base scientifique de nombreux projets et de travaux de thèse issus de l'Unité 1296, s'est développé autour de plusieurs principes simples :



- La monomérisation radio-induite de la protéine ATM est un phénomène biochimique (indépendant de la radiosensibilité des cellules) à ce point dépendant de la dose que le nombre de monomères cytoplasmiques devrait refléter la somme de tous les stress génotoxiques (endogènes et exogènes) infligés à la cellule à un instant  $t$ . En d'autres termes, dans le cadre du modèle RIANS, on peut considérer que chaque cellule est dotée d'un "dosimètre" très précis qui s'exprime sous la forme d'un flux de monomères d'ATM vers le noyau. D'après Bodgi et Foray, si on considère que  $10^7$  monomères sont produits par Gy (66), on comprend mieux comment le modèle RIANS pourrait rester valide pour des doses de l'ordre du  $\mu\text{Gy}$ , car le moindre monomère ATM qui passe la membrane nucléaire peut reconnaître une cassure de l'ADN, notamment une CDB.
- Le rapport entre le nombre de CDB radio-induites  $N_{\text{CDB}}$  et le nombre de monomères  $N_{\text{ATMdiff}}$  qui diffusent effectivement dans le noyau est crucial : en effet, si les monomères viennent en masse dans le noyau ( $N_{\text{ATMdiff}} \gg N_{\text{CDB}}$ ), la probabilité que toutes les CDB (généralement 40 CDB par Gy par cellule) soient reconnues par ATM puis réparées par la suture NHEJ est très grande. Toutefois, dans le cas des faibles doses c'est-à-dire où  $N_{\text{ATMdiff}}$  et  $N_{\text{CDB}}$  sont faibles, la séquestration des monomères ATM par les protéines X dans le cytoplasme, avant leur diffusion dans le noyau, peut conditionner la réponse finale. En effet, dans le cas des conditions d'hormésis (dose inférieure à 25 mGy),  $N_{\text{CDB}}$  est proche de zéro mais le flux de monomères d'ATM (de  $2.5 \cdot 10^3$  à  $10^5$ ) dans le noyau, en l'absence de protéines X (groupe I ; radiorésistance) reste significatif. Ce flux non négligeable de monomères ATM pourrait ainsi permettre la reconnaissance de CDB spontanées. À l'inverse, dans le cas de cellules de groupe II, où les protéines X sont nombreuses,  $N_{\text{ATMdiff}}$  diminue rapidement et la probabilité de reconnaissance des CDB diminue également. Ainsi, pour des cellules de groupe II, quelques CDB non reconnues peuvent suffire à provoquer une létalité cellulaire comme on peut l'observer dans les plus fortes doses : c'est le cas du phénomène HRS.

Ainsi, le modèle RIANS a permis de réconcilier en un modèle mécanistique unique des phénomènes aussi antagonistes et contre-intuitifs que HRS et hormésis. Dans le cadre de la LDRT, ces deux phénomènes radiobiologiques jouent un grand rôle. En particulier,

HRS, historiquement à la base de la radiothérapie anti-cancéreuse par faibles doses, imaginée par Mike Joiner, Brian Marples et Philippe Lambin après la découverte du phénomène HRS, permet d'obtenir une létalité cellulaire des tumeurs avec des faibles doses comprises entre 0.1 et 0.5 Gy quand celles-ci sont délivrées à fort débit de dose (de l'ordre du Gy/min). Le phénomène HRS peut être répété/amplifié en répétant les faibles doses, produisant des effets biologiques équivalents à ceux obtenus à des doses 5 à 10 fois plus fortes. Toutefois, toujours dans le cadre du modèle RANS, les faibles doses répétées doivent être séparées par des intervalles de temps qui ne permettent pas l'accumulation de trop de monomères d'ATM diffusés dans le noyau. En effet, trop de monomères d'ATM contribueraient à reconnaître plus de CDB, ce qui diminuerait l'effet HRS. En considérant l'activité moyenne des protéines en général (et de ATM en particulier), on peut considérer qu'un intervalle de 24 h entre deux doses interdit toute accumulation des monomères ATM actifs dans le noyau. Le phénomène final devient additif, c'est-à-dire que si une dose de 0.2 Gy est équivalente à 2 Gy, n séances de LDRT séparées de 24 h pourraient aboutir à une dose cumulée équivalente à 2n Gy au lieu de 0.2 n Gy. On peut même considérer qu'une LDRT journalière bi-fractionnée (se rapprochant des conditions historiques appliquées par Victor Despeignes !) pourrait également éviter une accumulation de monomères ATM actifs avec un intervalle entre les doses d'une douzaine d'heures. Seule l'expérience consolidera cette hypothèse.

En considérant les mêmes conditions mais cette fois avec des intervalles de temps de l'ordre de la minute, le nombre de monomères ATM actifs dans le noyau pourrait aboutir en 10 min à ce que fournit une dose de 2 Gy spontanément. Le bénéfice et l'intérêt de la LDRT diminuerait alors drastiquement. Pourtant, nous avons bien montré dans l'Article 3 que le statut HRS positif des tumeurs assurait des effets synergiques dans le cas de la SBRT en général et du Cyberknife en particulier (451). Il y a en effet une différence majeure entre la répétition des faibles doses quand celles-ci sont délivrées uniformément dans un volume tumoral donné et la répétition des faibles doses quand celles-ci sont délivrées par des minifaisceaux centripètes qui n'impactent à chaque fois, qu'un volume infinitésimal de la tumeur. En effet, dans le premier cas, on peut considérer que toutes les cellules subissent les mêmes faibles doses pendant la période du traitement. Toujours dans ce cas, si un faisceau les traverse n fois, la dose cumulée sera facilement équivalente à  $n \times 0.2$  Gy avec le risque d'accumulation de monomères actifs d'ATM comme on l'a dit plus haut. A l'inverse, dans

le cadre de la SBRT, les zones impactées par les faisceaux ne sont pas forcément les mêmes et nous avons montré que, même si une séance d'environ 20 min est faite d'une centaine de faisceaux centripètes, les mêmes régions de la tumeur ne subissent pas 100 fois la dose délivrée par chaque minifaisceau. La conséquence immédiate de cette effet géométrique est que l'intervalle de temps entre deux mini-faisceaux qui impactent la même région tumorale est supérieur à l'intervalle de temps moyen entre 2 faisceaux (environ 1 faisceaux toutes les 10 secondes). Dans l'Article 3, on voit que la répétition de 10 faisceaux sur un temps de séance de 20 min (soit 1 faisceau toutes les 2 minutes) mime assez bien le traitement délivré par le Cyberknife, probablement équivalent à la répétition de 15 à 20 faisceaux sur la même zone d'intérêt (451). L'intervalle de temps entre des faisceaux impactant la même région de plus de 2 minutes pourrait ainsi suffire à ne pas saturer le noyau de monomères ATM actifs.

D'ailleurs, dans des conditions optimales de répétitions de doses HRS, on observe des cellules multilésées (ou HDC pour *highly-damaged cell*) qui impliquent la survenue de deux phénomènes conjoints. En effet, les cellules multilésées sont la conséquence d'un excès de CDB induites, non pas par l'irradiation (on ne parle ici que de faibles doses) mais bien par la cellule elle-même. Ce phénomène biologique bien documenté est l'hyper-recombinaison, où la suture devient minoritaire et la recombinaison, stimulée par une activité nucléasique intense, est créatrice de CSB et de CDB. En particulier, l'activité de la nucléase MRE11, si celle-ci n'est pas phosphorylée par ATM, peut en effet être responsable de la formation d'un grand nombre de cassures de l'ADN. Ce phénomène d'hyper-recombinaison est également la preuve indirecte de la présence insuffisante de monomères ATM actifs dans le noyau, c'est-à-dire la conséquence immédiate de la survenue du phénomène HRS. Ainsi, l'observation de HDC devient à la fois une conséquence et un biomarqueur spécifique du phénomène HRS. Le nombre de HDC pourrait même permettre la quantification du phénomène HRS. Notons cependant que, dans les HDC, toutes les cassures de l'ADN ne sont pas forcément létales mais au moins majoritairement mal réparées. Toutefois, vu leur nombre (plusieurs centaines de CDB par noyau cellulaire), il suffit de quelques-unes pour que les HDC soient des cellules condamnées. Ce phénomène est d'autant plus spectaculaire que l'on y observe un nombre de cassures de l'ADN équivalent à des doses de plusieurs dizaines de Gy ! preuve supplémentaire du pouvoir supra-additif de la répétition des faibles doses dans des conditions favorables à HRS.

Fait intéressant, on rencontre aussi les HDC sur des cellules épithéliales de sein de patientes à haut risque familial de cancer de sein (mutations hétérozygotes des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*), c'est-à-dire des patientes de groupe II et donc probablement HRS-positives, après deux séances de mammographie (2 mGy + 3 min + 2 mGy). Des observations similaires ont été faites dans le cadre d'exposition au scanner et rapportées dans la thèse de Clément Devic. Au vu des doses encore plus faibles, la synergie n'en est que plus spectaculaire.

Ainsi, l'Article 3 et toutes les observations effectuées dans le cadre de l'Unité montrent ainsi qu'une répétition de faibles doses sur des cellules HRS-positives peut aboutir à la formation d'un effet létal important, contrairement à toutes les prédictions de la dosimétrie physique (451). Cet effet, surtout s'il est synergique peut s'exprimer par une exacerbation des nucléases, notamment MRE11, favorisé par un retard massif des monomères ATM séquestrés dans le cytoplasme par les protéines X. Il donne alors lieu à la formation rapide et massive de cassures de l'ADN dans les noyaux, aboutissant aux HDC. HRS et HDC peuvent être considérées comme des preuves éclatantes de la non-linéarité des effets biologique avec la dose.

Sans reprendre la discussion de l'Article 3, une question pratique vient à l'esprit des radiothérapeutes et des radiobiologistes : comment prédire rapidement le statut HRS d'une tumeur afin de bénéficier de tous les effets supra-additifs associés à la SBRT ? Tout d'abord, la séquestration cytoplasmique massive des monomères ATM qui produit le phénomène HRS crée-t-elle une concentration telle que des monomères se réassocient en dimères pour former une couronne ou une zone hautement concentrée en ATM ? L'observation attentive des cellules par immunofluorescence pendant le phénomène nous montrent que non. D'ailleurs, ces observations s'effectuent sur des faibles doses, c'est-à-dire dans des conditions où peu de dimères d'ATM pourraient être monomérisés et peu de complexes ATM-protéines X sont formés. De plus, nous sommes ici dans le cadre de tumeurs et de tissus plutôt prédisposés au cancer.

Or la Revue A nous apprend clairement que, contrairement aux protéines X associées aux syndromes de vieillissement accéléré qui sont plutôt périnucléaires, les protéines X des syndromes associés au cancer sont plutôt dispersées aléatoirement dans le cytoplasme, ce qui réduit d'autant les chances de voir des concentrations locales détectables par immunofluorescence (403). Ainsi le statut HRS ne peut être défini que par une double

exposition à 0.2 Gy (à fort débit de dose) et à 1 ou 2 Gy pour constater l'équivalence des effets biologiques. Comme nous l'avons également dit dans l'Article 3, le statut HRS des tumeurs (et des tissus sains) nécessitent donc une accessibilité à un prélèvement, ce qui complexifie tout test prédictif spécifique dans le cadre d'un diagnostic *in vitro* (451). Une autre piste de recherche pour prédire HRS serait celle qui nous mènerait vers une compréhension plus moléculaire du phénomène avec la détermination des protéines X qui pourraient, par leur surabondance dans le cytoplasme, réduire drastiquement le flux de monomères ATM rentrant dans le noyau. D'ailleurs, il est fort probable que, pour avoir un effet de séquestration "drastique", qu'une telle surabondance de protéines X soit également exacerbée par l'irradiation (comme par exemple les protéines chaperonnes HSP déjà cytoplasmiques et dont l'expression augmente avec le stress génotoxique). Là encore, de nombreuses séries d'expériences seront nécessaires pour atteindre ce but.

La possibilité d'un phénomène HRS "caché" dans certaines modalités de la radiothérapie concernerait également les tissus sains. En effet, à fort débit de dose (de l'ordre du Gy/min), des doses allant de 0.1 à 0.5 Gy peuvent concerner les tissus sains, qui, rappelons-le une fois encore, peuvent aussi être HRS-positifs. Ainsi, tout en respectant les règles communément admises sur les tissus/organes à risques, la dosimétrie étant bien documentée, des faibles doses pourraient donc produire des effets équivalents à ceux provoqués par des doses 5 à 10 fois plus élevés. La prédiction du phénomène HRS pour les tissus sains souffrirait d'ailleurs moins des limites évoquées plus haut pour l'accessibilité des prélèvements car un simple punch dermatologique suffirait pour établir qu'une lignée fibroblastique de peau, représentant l'ensemble des tissus sains de l'organisme, soit HRS-positif.

En dehors des faibles doses reçues sur des tissus sains HRS-positifs, on doit recenser toutes les conditions où, lors d'expositions médicales aux radiations ionisantes, les conditions d'occurrence d'HRS sont réunies. Pour ce faire, il faut avoir à l'esprit les données de la publication de Thomas et al. issue de notre laboratoire et décrivant l'influence du débit de dose sur le phénomène HRS pour des tumeurs de colon de rat HRS-positives et négatives (359) : les gammes de doses pour lesquelles le phénomène HRS est maximal correspondent à des durées d'exposition d'une vingtaine de secondes au plus. Par exemple, la dose à laquelle le phénomène HRS est maximal est environ de 0.2 Gy pour des débits supérieurs à 0.6 Gy/min. Comme le suggèrent des données préliminaires du laboratoire, la loi entre la

dose à laquelle le phénomène HRS est maximal, le débit de dose et le temps d'exposition pourrait être un peu différente pour les cellules humaines et, comme on l'a dit dans l'Article 3, la valeur du débit de dose des mini-faisceaux délivrés par la SBRT sera une donnée cruciale (451). En effet, suivant les modalités, les mini-faisceaux peuvent délivrer des doses de l'ordre du mGy au cGy et des débits du mGy/s au cGy/min : toutes les conditions ne seront pas idéales pour la survenue d'un phénomène HRS. Base des calculs de modélisation future, une courbe reliant la dose à laquelle le phénomène HRS est maximal, le débit de dose et le temps d'exposition devra être documentée pour les tumeurs humaines HRS-positives, ce qui demandera de nouvelles expériences à réaliser à des débits de dose variés à tester.

En radiothérapie oncologique, un traitement qui consiste en une répétition de faibles doses (LDRT) évoque la technique de curiethérapie par bas débit pulsé (ou PDR pour *pulsed dose rate*). À l'occasion d'un semestre d'interne dans le service de curiethérapie de Gustave Roussy (Villejuif) en 2022, j'ai mené une étude rétrospective sur la plus grande cohorte mondiale d'enfants atteints de rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques traités par curiethérapie PDR. Les résultats intermédiaires ont fait l'objet d'une communication orale au 33<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO) le 28 Septembre 2022 (cf. § VII (461)), et un article connexe est actuellement en préparation (462).

### IV.3. LA LDRT DANS LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES

Contrairement à la SBRT, qui requiert une augmentation de la létalité et donc un phénomène HRS, le traitement par radiothérapie de la maladie d'Alzheimer et des maladies neurodégénératives n'est pas basé sur la recherche d'un phénomène HRS. En effet, si l'on se base sur l'Article 4 montrant que les couronnes périnucléaires d'ATM sont des biomarqueurs du vieillissement accéléré et résultent d'un long processus d'agglutination d'ATM contre une protéine X proche ou constitutive de la membrane nucléaire (comme l'est APOE pour la maladie d'Alzheimer) (453), alors le but d'une radiothérapie serait de détruire ces couronnes pour permettre à des monomères ATM actifs de traverser la membrane nucléaire et de reconnaître et réparer les cassures de l'ADN accumulées dans le noyau qui menace l'intégrité de la cellule. Ainsi, une irradiation aurait pour double conséquence de dissocier les monomères ATM de la couronne entre eux et de produire un flux significatif de monomères actifs dans le noyau. La cible ne serait pas la peau mais bien le cerveau et plus exactement l'hippocampe pour la maladie d'Alzheimer. Cependant, comment

optimiser une telle thérapie, quelque peu contre-intuitive tout comme l'était la LDRT dans le domaine oncologique ? Si le but est de débarrasser chaque cellule de leur couronne, encore faut-il que cet effet soit permanent ou plutôt le plus durable possible, afin d'éviter un hyper-fractionnement qui mette en danger l'intégrité de l'organe-cible. On comprend bien qu'une dose forte (par exemple 2 Gy) pourrait être très efficace pour "détruire" la couronne périnucléaire d'ATM mais le nombre de CDB créées dans les cellules pourrait être toxique et la somme de monomères ATM actifs produits se redimérisant alimenterait formant une couronne produirait l'effet inverse de celui recherché. D'ailleurs, l'Article 4 montre qu'après une dose de 2 Gy, les premières couronnes se reforment en moyenne 24 h après l'irradiation (453). En effet, il est fort probable que l'irradiation, même si elle contribue à monomériser les dimères d'ATM, ne produise pas assez de distance entre chaque monomère ATM, autrement dit, n'arrive pas à les "diluer" pour interdire toute redimérisation qui reste de plus en plus probable que la concentration de protéines ATM est élevée autour du noyau. Ainsi, l'ajout de drogues anti-oxydantes et/ou pro-épiskéviques immédiatement après l'irradiation pourrait retarder une réassociation des monomères ATM. D'ailleurs, comme le but principal de la thérapie est que les cellules portant les couronnes puissent réparer toutes les cassures accumulées pendant un long processus, il faudra déterminer si une première destruction de la couronne pendant 24 h suffit à réparer l'essentiel des cassures. À la fois pour préserver les tissus sains mais aussi pour éviter tout sur-risque, la Revue C nous apprend que les deux types de traitements radiothérapeutiques actuellement testés (série d'exposition au scanner, ou simple fractionnement avec 2 Gy) sont basés sur plusieurs séances (424). Cependant, alors que des études évaluant des fractionnements classiques de RT sont en cours (NCT03352258, Hôpitaux Universitaires de Genève ; NCT02359864, William Beaumont Hospitals ; NCT04203121, Hôpital Universitaire Kyung Hee), on sait aujourd'hui que la succession d'exposition au scanner ne suffit pas à obtenir un résultat stable et durable. Ainsi, quelle dose idéale devrait être appliquée sur les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et quelle méthodologie rigoureuse utiliser pour la déterminer ? Autrement dit, quel pourrait être le rationnel d'une étude clinique visant à retarder l'évolution d'une maladie neurodégénérative en général ? et de la maladie d'Alzheimer en particulier ?

Évidemment, une étude systématique basée sur l'exposition des cellules des patients à une gamme de dose de radiation allant de 20 mGy (scanner) à 2 Gy doit être à la base des

investigations. Toutefois, peut-on aboutir à la dose idéale par le calcul ? On sait qu'il y a environ 1000 pores sur la membrane nucléaire des cellules humaines non-sanguines pour un diamètre moyen de 10 à 15  $\mu\text{m}$ , c'est-à-dire une surface de 300 à 600  $\mu\text{m}^2$ . En considérant que la taille des protéines d'environ 0.01  $\mu\text{m}$  soit une surface moyenne occupée de  $10^{-4}$   $\mu\text{m}^2$ , il faut donc environ 3 à 6  $10^6$  monomères d'ATM pour couvrir la totalité (en plusieurs couches ?) de la membrane nucléaire. Si on considère que  $10^7$  monomères d'ATM sont produits par Gy, il suffirait donc de 0.3 à 0.6 Gy pour dissocier l'essentiel des monomères de la couronne périnucléaire. De façon intéressante, on aboutit au même ordre de grandeur pour faire disparaître les couronnes périnucléaires sur d'autres tissus (ex : épithélium de cristallin ; thèse de Joëlle Al-Choboq). Ces calculs devront cependant être plus documentés par l'expérience. Toutefois, si ces calculs sont confirmés, ils valideraient que :

- la LDRT serait effectivement un traitement adapté aux maladies neurodégénératives,
- la dose idéale par séance pour faire disparaître les couronnes périnucléaires se situe entre le radiodiagnostic (scanner) et la radiothérapie anti-cancéreuse (séance de l'ordre du Gy).

En revanche, comme le montre l'Article 4, la maladie d'Alzheimer est une maladie associée à une radiosensibilité de groupe II (453), c'est-à-dire que, potentiellement, les cellules des patients souffrant d'Alzheimer peuvent montrer un phénomène HRS pour des doses comprises entre 0.1 et 0.8 Gy à des débits de doses élevés (de l'ordre du Gy/min). Ainsi, le statut HRS-positif pourrait augmenter le risque de réactions tissulaires. C'est pourquoi il serait impératif de documenter la réponse des fibroblastes issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer pour des doses comprises entre 0.1 et 0.8 Gy à des débits de doses élevés (de l'ordre du Gy/min). Il faut noter cependant que des phénomènes HRS n'ont jamais été encore observés sur des cellules issues de maladies neurodégénératives. Cette remarque est peut-être liée à la localisation périnucléaire spécifique des protéines X de maladies neurodégénératives. Cette hypothèse devra donc être aussi testée.

Comme nous l'avons dit plus haut, il faudra associer à la LDRT un traitement anti-oxydant et/ou pro-épiskéviqes. Une fois les monomères séparés, quelle est la meilleure stratégie chimique pour stimuler la réparation des cassures ? La publication la plus récente du laboratoire montre que les drogues pro-épiskéviqes (statines et bisphosphonates) apparaissent toujours plus efficaces que les drogues antioxydantes (423). Ainsi, le traitement



ZOPRA appliqué immédiatement après l'irradiation (ou 12 à 24 h avant l'irradiation pour être actif) pour permettre à de nombreux monomères d'ATM de traverser la membrane nucléaire et de reconnaître et réparer les cassures de l'ADN. Toutefois, il faudra également tester l'association de drogues antioxydantes et pro-épiskéviqes car le montant des cassures de l'ADN dans chaque noyau de cellules portant des couronnes reste inconnu à ce jour. Là encore des études préliminaires seront nécessaires pour mieux documenter les bras d'une future étude clinique.

Les couronnes périnucléaires ATM peuvent-elles être utiles pour le diagnostic d'autres maladies neurodégénératives ? Théoriquement, chaque maladie est caractérisée par une ou plusieurs protéines X spécifiques. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la protéine APOE serait une protéine X majeure. Ainsi, dans la première couche interne, la couronne périnucléaire est formée essentiellement de complexes ATM-protéines X. La couronne périnucléaire ATM peut donc être détectée avec un anticorps dirigé contre la protéine APOE (APOE), ce que nous avons montré dans l'Article 4 (453). Notons cependant qu'en immunofluorescence, le signal APOE sera plus faible que le signal pATM puisque le nombre de dimères ATM dans la couronne est plus élevé que ceux des complexes ATM-protéine X. Potentiellement, la même remarque devrait être appliquée aux autres maladies neurodégénératives caractérisées par une couronne. De même, comme les couronnes sont essentiellement composées de dimères ATM, il serait logique que les mêmes traitements évoqués plus haut restent valables pour les autres maladies neurodégénératives. L'organe cible restera spécifique de chaque maladie. Une étude systématique sera donc nécessaire pour envisager une LDRT pour toute maladie associée à un vieillissement accéléré.

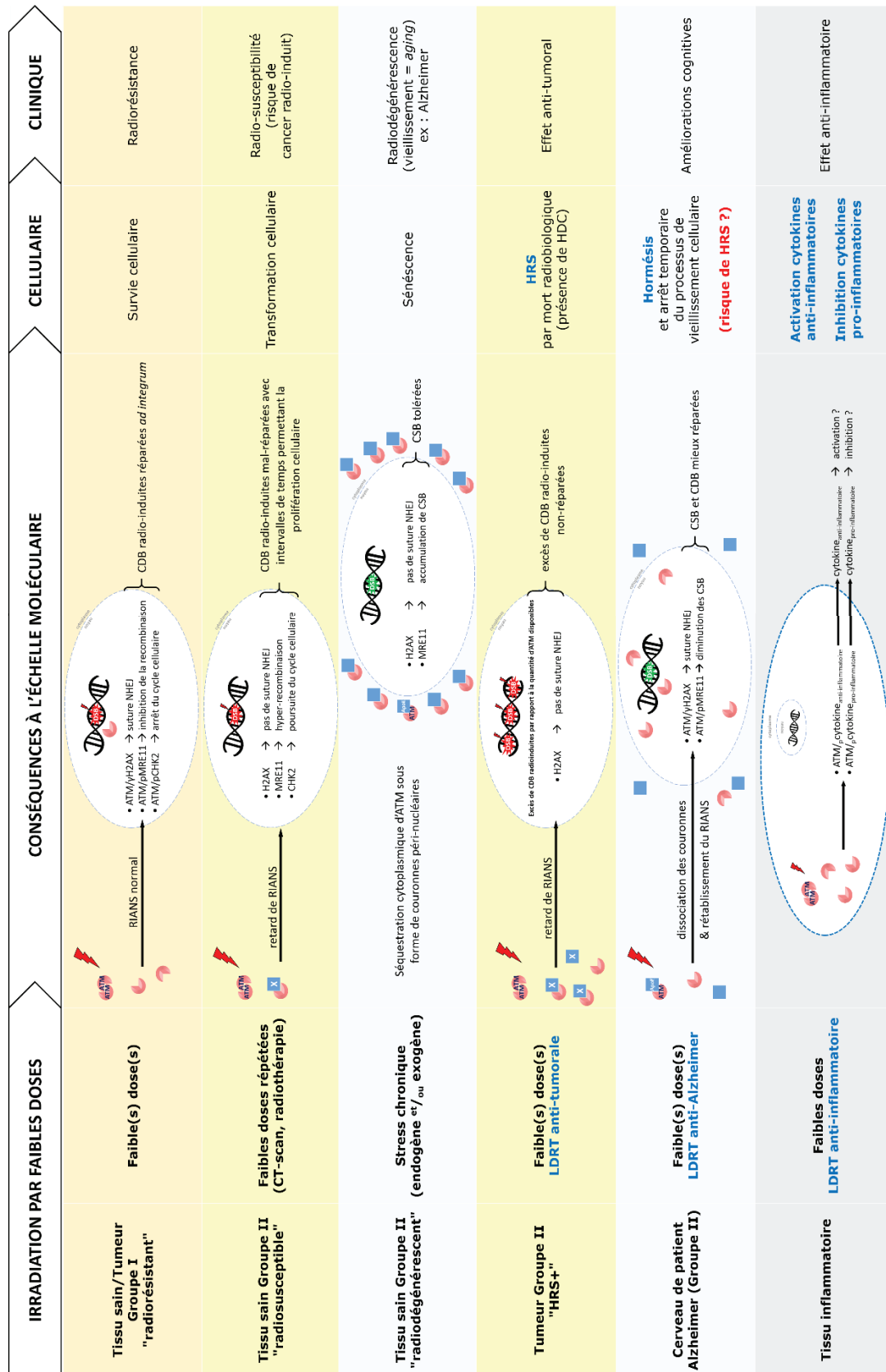
## V. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

---

Ce travail de thèse a permis de proposer les premières bases moléculaires de la radiothérapie par faibles doses (LDRT), en l'inscrivant dans le modèle RIANs. Selon l'objectif clinique, l'usage d'une faible dose de RI peut permettre la réalisation de (Fig. 61) :

- une *LDRT anti-tumorale* sur tumeur groupe II HRS+ : qui accentuerait le retard de RIANs et favoriserait la formation de complexes cytoplasmiques X-ATM, le tout conduisant à un *effet HRS*.
- une *LDRT anti-Alzheimer* sur cerveau de patient groupe II : qui stimulerait la dissociation des complexes cytoplasmiques ATM-APOE pour faciliter le RIANs, le tout conduisant à un *effet hormétique*.
- une *LDRT anti-inflammatoire* sur tissu inflammé (à l'état d'hypothèse au moment de la soumission de ce manuscrit) : qui favoriserait l'apport de cytokines anti-inflammatoires, et/ou qui inhiberait les cytokines pro-inflammatoires, via des monomères d'ATM radio-induits.

De manière intéressante, la radiothérapie par faibles doses (LDRT) satisfait déjà, - et probablement plus que toute autre modalité de radiothérapie, - au principe de radioprotection ALARA ("*As Low As Reasonably Achievable*"), facilitant d'autant la sécurisation de son transfert en routine clinique.



**Figure 61.** Conséquences moléculaire, cellulaire et clinique d'une irradiation par faibles doses. Groupes I et II = groupes de radiosensibilité. LDRT = radiothérapie par faibles doses (*low-dose radiation therapy*). CDB = cassure double-brin de l'ADN. CSB = cassure simple-brin de l'ADN. RIANS = transit cytonucléaire radio-induit de la protéine ATM (*radiation-induced ATM nucleoshuttling*). HRS = hypersensibilité aux faibles doses. HDC = cellule hyper-lésée (*highly-damaged cell*).  
 NB<sub>1</sub> : en phases G0/G1, l'hyper-recombinaison est non-homologue et pourvoyeuse de CDB mal-réparées.  
 NB<sub>2</sub> : La LDRT peut, selon la dose, stimuler (hormésis) ou retarder (HRS) le RIANS, favoriser (HRS, cytokines de l'inflammation) ou prévenir (Alzheimer) la formation de complexes cytoplasmiques ATM-X.

## VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Röntgen WC. « Über eine neue Art von Strahlen », Sitzungsberichte der Physikalisch-Medicinischen Gesellschaft zu Würzburg, Jahrg. 1895, n°9, p. 132-141. 1895.
2. Becquerel H. Comptes-rendus de l'Académie des sciences, séance du 1er mars 1896, « Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents », pp.501-502. 1896.
3. Becquerel H. Comptes-rendus de l'Académie des sciences, séance du 24 février 1896, « Sur les radiations émises par phosphorescence », pp. 420-421. 1896.
4. Lortet L, Genoud P. Tuberculose expérimentale atténuée par les rayons de Roentgen. C R Acad Sci 1896;122:1511. 1896.
5. Despeignes V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons Roentgen. Lyon Medical. 1896;82(26 juillet 1896):428-30.
6. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. Nat Rev Cancer. 2004;4(9):737-47.
7. Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Radiobiologie. Paris: Hermann; 1986.
8. Barillot I, Azria D, Lisbona A, Mahé MA. External irradiation treatment process. Cancer Radiother. 2022;26(1-2):20-8.
9. Chargari C, Deutsch E, Blanchard P, Gouy S, Martelli H, Guérin F, et al. Brachytherapy: An overview for clinicians. CA Cancer J Clin. 2019;69(5):386-401.
10. Mazal A, Habrand JL, Delacroix S, Datchary J, Dendale R, Desjardins L, et al. [Protontherapy: basis, indications and new technologies]. Bull Cancer. 2010;97(7):831-46.
11. O vO. Physique pour la médecine. <https://www.phys4med.be/>. Mise à jour le 21 décembre 2019;consulté le 16 février 2023. 2019.
12. Zilio V. Chapitres choisis de physique de la radiothérapie. Notions fondamentales. Première partie : Fonctionnement d'un accélérateur linéaire. 13 février 2020 ; Hôpital du Valais, Suisse. 2020.
13. TeledyneCM. How to choose your X-ray source (pulsed or constant potential)? <https://www.teledyneicm.com/ndt/ndt-news/how-to-choose-your-x-ray-source-pulsed-or-constant-potential/>. Mise à jour le 25 octobre 2016;consulté le 17 février 2023. 2016.
14. Gérard JP, Thariat J, Giraud P, Cosset JM. [Past, present and near future of techniques in radiation oncology]. Bull Cancer. 2010;97(7):743-51.
15. Biston M-C. Radiothérapie dynamique avec modulation d'intensité. Principes de l'IMRT et du VMAT. Centre Léon Bérard. <https://www.stor.tn/documents/category/6-cours-de-physique-medicale-septembre-2012.html?download=19:radiotherapie-dynamique-avec-modulation-d-intensite>. Consulté le 22 février 2023.
16. Koper PC, Stroom JC, van Putten WL, Korevaar GA, Heijmen BJ, Wijnmaalen A, et al. Acute morbidity reduction using 3DCRT for prostate carcinoma: a randomized study. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999;43(4):727-34.
17. Zelefsky MJ, Leibel SA, Gaudin PB, Kutcher GJ, Fleshner NE, Venkatramen ES, et al. Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;41(3):491-500.
18. Marta GN, Silva V, de Andrade Carvalho H, de Arruda FF, Hanna SA, Gadia R, et al. Intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: systematic review and meta-analysis. Radiother Oncol. 2014;110(1):9-15.
19. Marta GN, Weltman E, Ferrigno R. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) versus 3-dimensional conformal radiation therapy (3D-CRT) for head and neck cancer: cost-effectiveness analysis. Rev Assoc Med Bras (1992). 2018;64(4):318-23.

20. Lafond C, Jouyaux F, Bellec J, Henry O, Perdrieux M, Chajon E, et al. [Which IMRT? From "step and shoot" to VMAT: physicist point of view]. *Cancer Radiother.* 2010;14(6-7):539-49.
21. Vanneste BG, Van Limbergen EJ, van Lin EN, van Roermund JG, Lambin P. Prostate Cancer Radiation Therapy: What Do Clinicians Have to Know? *Biomed Res Int.* 2016;2016:6829875.
22. Goodman ML. Gamma knife radiosurgery: current status and review. *South Med J.* 1990;83(5):551-4.
23. Adler JR, Chang SD, Murphy MJ, Doty J, Geis P, Hancock SL. The Cyberknife: a frameless robotic system for radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg.* 1997;69(1-4 Pt 2):124-8.
24. MC S. AAPM Report n° 54. Stereotactic Radiosurgery. Report of Task Group 42 Radiation Therapy Committee. 1995.
25. de Crevoisier R, Chauvet B, Barillot I, Lafond C, Mahé M, Delpon G. [Image-guided radiotherapy]. *Cancer Radiother.* 2016;20 Suppl:S27-35.
26. Franzone P, Fiorentino A, Barra S, Cante D, Masini L, Cazzulo E, et al. Image-guided radiation therapy (IGRT): practical recommendations of Italian Association of Radiation Oncology (AIRO). *Radiol Med.* 2016;121(12):958-65.
27. Favaudon V, Caplier L, Monceau V, Pouzoulet F, Sayarath M, Fouillade C, et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6(245):245ra93.
28. Vozenin MC, De Fornel P, Petersson K, Favaudon V, Jaccard M, Germond JF, et al. The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2019;25(1):35-42.
29. Velalopoulou A, Karagounis IV, Cramer GM, Kim MM, Skoufos G, Goia D, et al. FLASH Proton Radiotherapy Spares Normal Epithelial and Mesenchymal Tissues While Preserving Sarcoma Response. *Cancer Res.* 2021;81(18):4808-21.
30. Bourhis J, Sozzi WJ, Jorge PG, Gaide O, Bailat C, Duclos F, et al. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2019;139:18-22.
31. Montay-Gruel P, Corde S, Laissue JA, Bazalova-Carter M. FLASH radiotherapy with photon beams. *Med Phys.* 2022;49(3):2055-67.
32. Thomas A, Keller A, Menoux I, Brahimi Y, Vigneron C, Le Fèvre C, et al. [Prognostic factors of acute radiodermatitis in breast cancer after adjuvant radiotherapy treated with RT3D or IMRT]. *Cancer Radiother.* 2022;26(5):684-91.
33. Poźniak-Balicka R, Chomiak B, Wośkowiak P, Nowicki N, Bojarski J, Salagierski M. Does the radiation approach affect acute toxicity in prostate cancer patients? A comparison of four radiation techniques. *Cent European J Urol.* 2020;73(3):295-9.
34. Westhorpe R. William Morton and the first successful demonstration of anaesthesia. *Anaesth Intensive Care.* 1996;24(5):529.
35. Louis-Ferdinand D. « La Vie et l'Œuvre de Philippe Ignace Semmelweis (1818-1865) ». Thèse pour le doctorat en Médecine (diplôme d'État), publiée en 1924.
36. Baumann M, Krause M, Overgaard J, Debus J, Bentzen SM, Daartz J, et al. Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(4):234-49.
37. van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2074-84.
38. Hennequin C, Belkacémi Y, Bourgier C, Cowen D, Cutuli B, Fourquet A, et al. Radiotherapy of breast cancer. *Cancer Radiother.* 2022;26(1-2):221-30.
39. Tsoutsou PG, Jeanneret Sozzi W, Ozsahin M, Delaloye JF, Bourhis J. Radiotherapy options after breast-conserving surgery: how can selection of patients be refined? *J Clin Oncol.* 2013;31(36):4570-1.

40. van den Heerik ASVM, Horeweg N, Nout RA, Lutgens LCHW, van der Steen-Banasik EM, Westerveld GH, et al. PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2020;30(12):2002-7.
41. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
42. Noël G, Renard A, Valéry C, Mokhtari K, Mazeron JJ. [Role of radiotherapy in the treatment of cerebral meningiomas]. *Cancer Radiother*. 2001;5(3):217-36.
43. O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, Bell R, Catton C, Chabot P, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9325):2235-41.
44. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EM, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(1):29-42.
45. Huguet F, Dabout V, Rivin Del Campo E, Gaujoux S, Bachet JB. The role of radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer. *Br J Radiol*. 2021;94(1125):20210044.
46. Witkowska M, Majchrzak A, Smolewski P. The role of radiotherapy in Hodgkin's lymphoma: what has been achieved during the last 50 years? *Biomed Res Int*. 2015;2015:485071.
47. Bourhis J, Sire C, Graff P, Grégoire V, Maingon P, Calais G, et al. Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(2):145-53.
48. Herskovic A, Martz K, al-Sarraf M, Leichman L, Brindle J, Vaitkevicius V, et al. Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med*. 1992;326(24):1593-8.
49. Pötter R, Tanderup K, Kirisits C, de Leeuw A, Kirchheiner K, Nout R, et al. The EMBRACE II study: The outcome and prospect of two decades of evolution within the GEC-ESTRO GYN working group and the EMBRACE studies. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2018;9:48-60.
50. Ott OJ, Rödel C, Weiss C, Wittlinger M, St Krause F, Dunst J, et al. Radiochemotherapy for bladder cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009;21(7):557-65.
51. Fraunholz I, Rabeneck D, Weiss C, Rödel C. Combined-modality treatment for anal cancer: current strategies and future directions. *Strahlenther Onkol*. 2010;186(7):361-6.
52. Turrisi AT, Kim K, Blum R, Sause WT, Livingston RB, Komaki R, et al. Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N Engl J Med*. 1999;340(4):265-71.
53. O'Rourke N, Roqué I Figuls M, Farré Bernadó N, Macbeth F. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(6):CD002140.
54. de Crevoisier R, Supiot S, Créhange G, Pommier P, Latorzeff I, Chapel O, et al. External radiotherapy for prostatic cancers. *Cancer Radiother*. 2022;26(1-2):329-43.
55. Guckenberger M, Andratschke N, Dieckmann K, Hoogeman MS, Hoyer M, Hurkmans C, et al. ESTRO ACROP consensus guideline on implementation and practice of stereotactic body radiotherapy for peripherally located early stage non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol*. 2017;124(1):11-7.
56. Wong JYC, Filippi AR, Dabaja BS, Yahalom J, Specht L. Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;101(3):521-9.

57. Scott BR, Hahn FF, McClellan RO, Seiler FA. Risk estimators for radiation-induced bone marrow syndrome lethality in humans. *Risk Anal.* 1988;8(3):393-402.
58. Rogé M, Thureau S, Dampierre J, Dubray B, Rivera S. [Prophylactic nodal radiotherapy for breast cancer]. *Cancer Radiother.* 2019;23(8):904-12.
59. Murthy V, Maitre P, Kannan S, Panigrahi G, Krishnatry R, Bakshi G, et al. Prostate-Only Versus Whole-Pelvic Radiation Therapy in High-Risk and Very High-Risk Prostate Cancer (POP-RT): Outcomes From Phase III Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(11):1234-42.
60. Aupérin A, Arriagada R, Pignon JP, Le Pécoux C, Gregor A, Stephens RJ, et al. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med.* 1999;341(7):476-84.
61. Coveler AL, Mizrahi J, Eastman B, Apisarnthanarax SJ, Dalal S, McNearney T, et al. Pancreas Cancer-Associated Pain Management. *Oncologist.* 2021;26(6):e971-e82.
62. Cellini F, Manfreda S, Deodato F, Cilla S, Maranzano E, Pergolizzi S, et al. Pain REduction with bone metastases STereotactic radiotherapy (PREST): A phase III randomized multicentric trial. *Trials.* 2019;20(1):609.
63. Schiff D, Messersmith H, Brastianos PK, Brown PD, Burri S, Dunn IF, et al. Radiation Therapy for Brain Metastases: ASCO Guideline Endorsement of ASTRO Guideline. *J Clin Oncol.* 2022;40(20):2271-6.
64. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie AV, Haasbeek C, et al. Stereotactic Ablative Radiotherapy for the Comprehensive Treatment of Oligometastatic Cancers: Long-Term Results of the SABR-COMET Phase II Randomized Trial. *J Clin Oncol.* 2020;38(25):2830-8.
65. Mitera G, Swaminath A, Wong S, Goh P, Robson S, Sinclair E, et al. Radiotherapy for oncologic emergencies on weekends: examining reasons for treatment and patterns of practice at a Canadian cancer centre. *Curr Oncol.* 2009;16(4):55-60.
66. Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(3):117-31.
67. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;34(1):251-66.
68. Viau M, Perez AF, Bodgi L, Devic C, Granzotto A, Ferlazzo ML, et al. [Repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual factor and the time interval between the doses]. *Cancer Radiother.* 2016;20(3):217-25.
69. Grégoire V. Tumor control probability (TCP) and normal tissue complication probability (NTCP) in head and neck cancer. *Rays.* 2005;30(2):105-8.
70. Regaud C, Nogier T. Stérilisation reontgénienne, totale et définitive, sans radiodermite, des testicules du bélier adulte. Conditions de sa réalisation. *C. R. Soc. Biol.* 1911, 70: 202–203. 1911.
71. Catton CN, Lukka H, Gu CS, Martin JM, Supiot S, Chung PWM, et al. Randomized Trial of a Hypofractionated Radiation Regimen for the Treatment of Localized Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(17):1884-90.
72. Dearnaley D, Syndikus I, Mossop H, Khoo V, Birtle A, Bloomfield D, et al. 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.* 2016;17(8):1047-60.
73. Bentzen SM, Agrawal RK, Aird EG, Barrett JM, Barrett-Lee PJ, Bliss JM, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial A of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2008;9(4):331-41.
74. Murray Brunt A, Haviland JS, Wheatley DA, Sydenham MA, Alhasso A, Bloomfield DJ, et al. Hypofractionated breast radiotherapy for 1 week versus 3 weeks (FAST-Forward): 5-

- year efficacy and late normal tissue effects results from a multicentre, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2020;395(10237):1613-26.
75. Mahadevan A, Blanck O, Lanciano R, Peddada A, Sundararaman S, D'Ambrosio D, et al. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for liver metastasis - clinical outcomes from the international multi-institutional RSSearch® Patient Registry. *Radiat Oncol*. 2018;13(1):26.
76. Liu SH, Murovic J, Wallach J, Cui G, Soltys SG, Gibbs IC, et al. CyberKnife radiosurgery for brainstem metastases: Management and outcomes and a review of the literature. *J Clin Neurosci*. 2016;25:105-10.
77. Ball D, Mai GT, Vinod S, Babington S, Ruben J, Kron T, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard radiotherapy in stage 1 non-small-cell lung cancer (TROG 09.02 CHISEL): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(4):494-503.
78. Jeppesen SS, Schytte T, Jensen HR, Brink C, Hansen O. Stereotactic body radiation therapy versus conventional radiation therapy in patients with early stage non-small cell lung cancer: an updated retrospective study on local failure and survival rates. *Acta Oncol*. 2013;52(7):1552-8.
79. Foray N. [Victor Despeignes (1866-1937): how a hygienist became the first radiation oncologist]. *Cancer Radiother*. 2013;17(3):244-54.
80. Foray N. Victor Despeignes, the Forgotten Pioneer of Radiation Oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;96(4):717-21.
81. HOLMES GW, SCHULZ MD. Radiation treatment of localized malignant lymphoma. *N Engl J Med*. 1946;235(22):789-91.
82. Lybeert ML, Meerwaldt JH, Deneve W. Long-term results of low dose total body irradiation for advanced non-Hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987;13(8):1167-72.
83. Richaud PM, Soubeyran P, Eghbali H, Chacon B, Marit G, Broustet A, et al. Place of low-dose total body irradiation in the treatment of localized follicular non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998;40(2):387-90.
84. Harney J, Short SC, Shah N, Joiner M, Saunders MI. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(4):1190-5.
85. Morganti AG, Cellini F, Mignogna S, Padula GD, Caravatta L, Deodato F, et al. Low-dose radiotherapy and concurrent FOLFIRI-bevacizumab: a Phase II study. *Future Oncol*. 2016;12(6):779-87.
86. Sezen D, Patel RR, Tang C, Onstad M, Nagarajan P, Patel SP, et al. Immunotherapy combined with high- and low-dose radiation to all sites leads to complete clearance of disease in a patient with metastatic vaginal melanoma. *Gynecol Oncol*. 2021;161(3):645-52.
87. Patel RR, He K, Barsoumian HB, Chang JY, Tang C, Verma V, et al. High-dose irradiation in combination with non-ablative low-dose radiation to treat metastatic disease after progression on immunotherapy: Results of a phase II trial. *Radiother Oncol*. 2021;162:60-7.
88. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 2006;368(9538):843-54.
89. Fanous AA, Prasad D, Mathieu D, Fabiano AJ. Intracranial stereotactic radiosurgery. *J Neurosurg Sci*. 2019;63(1):61-82.
90. Friedman WA. Stereotactic radiosurgery of intracranial arteriovenous malformations. *Neurosurg Clin N Am*. 2013;24(4):561-74.
91. Bloch O, Kaur G, Jian BJ, Parsa AT, Barani IJ. Stereotactic radiosurgery for benign meningiomas. *J Neurooncol*. 2012;107(1):13-20.



92. Jang CK, Jung HH, Chang JH, Chang JW, Park YG, Chang WS. Long-Term Results of Gamma Knife Radiosurgery for Intracranial Meningioma. *Brain Tumor Res Treat.* 2015;3(2):103-7.
93. Soltys SG, Milano MT, Xue J, Tomé WA, Yorke E, Sheehan J, et al. Stereotactic Radiosurgery for Vestibular Schwannomas: Tumor Control Probability Analyses and Recommended Reporting Standards. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;110(1):100-11.
94. Leksell L. Stereotaxic radiosurgery in trigeminal neuralgia. *Acta Chir Scand.* 1971;137(4):311-4.
95. Tuleasca C, Régis J, Sahgal A, De Salles A, Hayashi M, Ma L, et al. Stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: a systematic review. *J Neurosurg.* 2018;130(3):733-57.
96. Romanelli P, Anselmi DJ. Radiosurgery for epilepsy. *Lancet Neurol.* 2006;5(7):613-20.
97. Khattab MH, Sherry AD, Devan SP, Luo G, Chaballout BH, Jean-Baptiste S, et al. Noninvasive Capsulotomy for Refractory Depression by Frameless Stereotactic Radiosurgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2022;113(5):960-6.
98. Martínez-Álvarez R, Torres-Díaz C. Modern Gamma Knife radiosurgery for management of psychiatric disorders. *Prog Brain Res.* 2022;270(1):171-83.
99. Campbell AM, Glover J, Chiang VL, Gerrard J, Yu JB. Gamma knife stereotactic radiosurgical thalamotomy for intractable tremor: a systematic review of the literature. *Radiother Oncol.* 2015;114(3):296-301.
100. Duma CM, Jacques DB, Kopyov OV, Mark RJ, Copcutt B, Farokhi HK. Gamma knife radiosurgery for thalamotomy in parkinsonian tremor: a five-year experience. *J Neurosurg.* 1998;88(6):1044-9.
101. Robbins JH, Otsuka F, Tarone RE, Polinsky RJ, Brumback RA, Moshell AN, et al. Radiosensitivity in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Lancet.* 1983;1(8322):468-9.
102. Robbins JH, Otsuka F, Tarone RE, Polinsky RJ, Brumback RA, Nee LE. Parkinson's disease and Alzheimer's disease: hypersensitivity to X rays in cultured cell lines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985;48(9):916-23.
103. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8).
104. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-44.
105. Forlenza OV, Radanovic M, Talib LL, Aprahamian I, Diniz BS, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimers Dement (Amst).* 2015;1(4):455-63.
106. Westman E, Muehlboeck JS, Simmons A. Combining MRI and CSF measures for classification of Alzheimer's disease and prediction of mild cognitive impairment conversion. *Neuroimage.* 2012;62(1):229-38.
107. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002;58(12):1791-800.
108. Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, et al. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:204.
109. Cai Y, Liu J, Wang B, Sun M, Yang H. Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Related Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2022;13:856376.
110. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021;17(3):157-72.
111. Ma MW, Wang J, Zhang Q, Wang R, Dhandapani KM, Vadlamudi RK, et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):7.

112. (HAS) HAFdS. Médicaments de la maladie d'Alzheimer : un intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge par la solidarité nationale. Communiqué de presse; mis en ligne le 21 oct 2016. 2016.
113. JY N. [Alzheimer: prescrire ou ne pas prescrire?]. *Rev Med Suisse*. 2016 Nov 16;12(539):1988-1989. . 2016.
114. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(2):111-28.
115. Ceyzériat K, Tournier BB, Millet P, Dipasquale G, Koutsouvelis N, Frisoni GB, et al. Low-Dose Radiation Therapy Reduces Amyloid Load in Young 3xTg-AD Mice. *J Alzheimers Dis*. 2022;86(2):641-53.
116. Ceyzériat K, Zilli T, Fall AB, Millet P, Koutsouvelis N, Dipasquale G, et al. Treatment by low-dose brain radiation therapy improves memory performances without changes of the amyloid load in the TgF344-AD rat model. *Neurobiol Aging*. 2021;103:117-27.
117. Marples B, McGee M, Callan S, Bowen SE, Thibodeau BJ, Michael DB, et al. Cranial irradiation significantly reduces beta amyloid plaques in the brain and improves cognition in a murine model of Alzheimer's Disease (AD). *Radiother Oncol*. 2016;118(1):43-51.
118. Cuttler JM, Lamet MS, Calabrese EJ. Treatment of Early-Stage Alzheimer's Disease With CT Scans of the Brain: A Case Report. *Dose Response*. 2022;20(1):15593258221078392.
119. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, Nadolski DL. Treatment of Alzheimer Disease With CT Scans: A Case Report. *Dose Response*. 2016;14(2):1559325816640073.
120. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, Nadolski DL. Update on a Patient With Alzheimer Disease Treated With CT Scans. *Dose Response*. 2017;15(1):1559325817693167.
121. Cuttler JM, Moore ER, Hosfeld VD, Nadolski DL. Second Update on a Patient With Alzheimer Disease Treated by CT Scans. *Dose Response*. 2018;16(1):1559325818756461.
122. Smith TA, Itzhaki RF. Radiosensitivity of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Mutat Res*. 1989;217(1):11-7.
123. Tobi SE, Moquet JE, Edwards AA, Lloyd DC, Itzhaki RF. Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *J Med Genet*. 1990;27(7):437-40.
124. Rogers CL, Lageman SK, Fontanesi J, Wilson GD, Boling PA, Karis JP, et al. Low-dose whole brain radiation therapy for Alzheimer's dementia: Results from a pilot trial in human subjects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2023.
125. RA R, KJ C. Cognitive screening in geriatric rehabilitation. *Rehabilitation Psychology*, 48 (1), 14–22. 2003.
126. Cuttler JM, Abdellah E, Goldberg Y, Al-Shamaa S, Symons SP, Black SE, et al. Low Doses of Ionizing Radiation as a Treatment for Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(3):1119-28.
127. Reichl B, Block A, Schäfer U, Bert C, Müller R, Jung H, et al. DEGRO practical guidelines for radiotherapy of non-malignant disorders: Part I: physical principles, radiobiological mechanisms, and radiogenic risk. *Strahlenther Onkol*. 2015;191(9):701-9.
128. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986-1000.
129. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
130. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993;19(3):545-68.
131. Liu W, Reinmuth N, Stoeltzing O, Parikh AA, Tellez C, Williams S, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res*. 2003;63(13):3632-6.
132. Vergne P, Bertin P, Trèves R. [Aspirin, pain and inflammation]. *Rev Med Interne*. 2000;21 Suppl 1:89s-96s.

133. Keystone EC, Ware CF. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies. *J Rheumatol Suppl.* 2010;85:27-39.
134. Dove APH, Cmelak A, Darrow K, McComas KN, Chowdhary M, Beckta J, et al. The Use of Low-Dose Radiation Therapy in Osteoarthritis: A Review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2022;114(2):203-20.
135. C S-M. Über Heilung des Gelenkrheumatismus durch Röntgenstrahlen bei Kindern. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen* 1898, 1, p. 209. 1898.
136. EA M. Roentgen therapy in acute inflammatory conditions. *Radiology* 1930, 14. 1930.
137. KUHNS JG, MORRISON SL. Twelve years' experience in roentgenotherapy for chronic arthritis. *N Engl J Med.* 1946;235:399-405.
138. Rödel F, Keilholz L, Herrmann M, Sauer R, Hildebrandt G. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(6):357-66.
139. T S. Om behandling of kronisk ledgangs-rheumatism med Rontgestralar. *Sv Läk Förh* 1898, 117. 1898.
140. McKeown SR, Hatfield P, Prestwich RJ, Shaffer RE, Taylor RE. Radiotherapy for benign disease; assessing the risk of radiation-induced cancer following exposure to intermediate dose radiation. *Br J Radiol.* 2015;88(1056):20150405.
141. Muscoplat CC, Caperton EM, Dusenbery KE. Radiation therapy for inflammatory arthritis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(2):688-9.
142. Seegenschmiedt MH, Micke O, Muecke R, (GCG-BD) GCGoRfN-mD. Radiotherapy for non-malignant disorders: state of the art and update of the evidence-based practice guidelines. *Br J Radiol.* 2015;88(1051):20150080.
143. Micke O, Seegenschmiedt MH, Adamietz IA, Kundt G, Fakhrian K, Schaefer U, et al. Low-Dose Radiation Therapy for Benign Painful Skeletal Disorders: The Typical Treatment for the Elderly Patient? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;98(4):958-63.
144. Weissmann T, Rückert M, Zhou JG, Seeling M, Lettmaier S, Donaubaue AJ, et al. Low-Dose Radiotherapy Leads to a Systemic Anti-Inflammatory Shift in the Pre-Clinical K/BxN Serum Transfer Model and Reduces Osteoarthritic Pain in Patients. *Front Immunol.* 2021;12:777792.
145. Mahler EAM, Minten MJ, Leseman-Hoogenboom MM, Poortmans PMP, Leer JWH, Boks SS, et al. Effectiveness of low-dose radiation therapy on symptoms in patients with knee osteoarthritis: a randomised, double-blinded, sham-controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(1):83-90.
146. Minten MJM, Leseman-Hoogenboom MM, Kloppenburg M, Kortekaas MC, Leer JW, Poortmans PMP, et al. Lack of beneficial effects of low-dose radiation therapy on hand osteoarthritis symptoms and inflammation: a randomised, blinded, sham-controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(10):1283-90.
147. Van den Ende C. Long-term efficacy of low-dose radiation therapy on symptoms in patients with knee and hand osteoarthritis: follow-up results of two parallel randomised, sham-controlled trials. *The Lancet Rheumatology* 2020, 2, E42-E49. 2020.
148. Donaubaue AJ, Becker I, Weissmann T, Fröhlich BM, Muñoz LE, Gryc T, et al. Low Dose Radiation Therapy Induces Long-Lasting Reduction of Pain and Immune Modulations in the Peripheral Blood - Interim Analysis of the IMMO-LDRT01 Trial. *Front Immunol.* 2021;12:740742.
149. (OMS) OMdIS. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Consulté le 15 Avril 2023. 2023.
150. Calabrese EJ, Dhawan G. How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: could it be useful today? *Yale J Biol Med.* 2013;86(4):555-70.
151. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.

152. Que Y, Hu C, Wan K, Hu P, Wang R, Luo J, et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: a major mechanism of morbidity and mortality. *Int Rev Immunol*. 2022;41(2):217-30.
153. A O. Roentgen therapy of interstitial pneumonia. *J Pediatr* 1943, 23, 534-538. 1943.
154. Arenas M, Algara M, De Febrer G, Rubio C, Sanz X, de la Casa MA, et al. Could pulmonary low-dose radiation therapy be an alternative treatment for patients with COVID-19 pneumonia? Preliminary results of a multicenter SEOR-GICOR nonrandomized prospective trial (IPACOVID trial). *Strahlenther Onkol*. 2021;197(11):1010-20.
155. Sanmamed N, Alcantara P, Gómez S, Bustos A, Cerezo E, Gaztañaga M, et al. Low-dose Radiation Therapy in the Management of COVID-19 Pneumonia (LOWRAD-Cov19). Final results of a prospective phase I-II trial. *Radiother Oncol*. 2022;171:25-9.
156. Ganesan G, Ponniah S, Sundaram V, Marimuthu PK, Pitchaikannu V, Chandrasekaran M, et al. Whole lung irradiation as a novel treatment for COVID-19: Interim results of an ongoing phase 2 trial in India. *Radiother Oncol*. 2021;163:83-90.
157. Rodríguez-Tomás E, Acosta JC, Torres-Royo L, De Febrer G, Baiges-Gaya G, Castañé H, et al. Effect of Low-Dose Radiotherapy on the Circulating Levels of Paraoxonase-1-Related Variables and Markers of Inflammation in Patients with COVID-19 Pneumonia. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(6).
158. Papachristofilou A, Finazzi T, Blum A, Zehnder T, Zellweger N, Lustenberger J, et al. Low dose radiation therapy for severe COVID-19 pneumonia: a randomized double-blind study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2021.
159. Hess CB, Buchwald ZS, Stokes W, Nasti TH, Switchenko JM, Weinberg BD, et al. Low-dose whole-lung radiation for COVID-19 pneumonia: Planned day 7 interim analysis of a registered clinical trial. *Cancer*. 2020;126(23):5109-13.
160. Rödel F, Arenas M, Ott OJ, Fournier C, Georgakilas AG, Tapio S, et al. Low-dose radiation therapy for COVID-19 pneumopathy: what is the evidence? *Strahlenther Onkol*. 2020;196(8):679-82.
161. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev*. 2000;21(2):168-99.
162. Marquez SD, Lum BL, McDougall IR, Katkuri S, Levin PS, MacManus M, et al. Long-term results of irradiation for patients with progressive Graves' ophthalmopathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51(3):766-74.
163. Kahaly GJ, Rösler HP, Pitz S, Hommel G. Low- versus high-dose radiotherapy for Graves' ophthalmopathy: a randomized, single blind trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(1):102-8.
164. Ward JF. Biochemistry of DNA lesions. *Radiation research Supplement*. 1985;8:S103-11.
165. Evans RD. *The atomic nucleus*. USA: Malabar, FL: Krieger Publishing; 1985.
166. Clarke RH, Valentin J. The History of the ICRP and the evolution of its policies. Publication 109. *Annals of ICRP*. 2009:75-110.
167. Paretzke HG. Radiation track structure theory. In: Freeman GR, editor. *Kinetics of nonhomogenous processes*. New York, USA: Wileys and Sons; 1987. p. 89-170.
168. Nikjoo H, Goodhead DT, Charlton DE, Paretzke HG. Energy deposition in small cylindrical targets by ultrasoft x-rays. *Physics in medicine and biology*. 1989;34(6):691-705.
169. Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol*. 1989;56(5):623-34.
170. Goodhead DT, Nikjoo H. Track structure analysis of ultrasoft X-rays compared to high- and low-LET radiations. *Int J Radiat Biol*. 1989;55(4):513-29.
171. Goodhead DT, Thacker J, Cox R. Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int J Radiat Biol*. 1993;63(5):543-56.
172. Goodhead DT. Spatial and temporal distribution of energy. *Health Phys*. 1988;55(2):231-40.

173. Siddiqi MA, Bothe E. Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat Res.* 1987;112(3):449-63.
174. Fielden EM, O'Neill P. The early effects of radiation on DNA. Berlin: Springer; 1991.
175. Daniels M, Wigg E. Oxygen as a primary species in radiolysis of water. *Science.* 1966;153(3743):1533-4.
176. Hall EJ, Giacca AJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, USA: Lippincott Wilkins & Williams; 2006.
177. Jonah CD. A short history of the radiation chemistry of water. *Radiat Res.* 1995;144(2):141-7.
178. Tubiana M. Radiobiologie. radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales. Paris: Hermann/Médecine; 2008.
179. Morrison C, Smith GC, Stingl L, Jackson SP, Wagner EF, Wang ZQ. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nat Genet.* 1997;17(4):479-82.
180. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(6):1033-77.
181. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* 1999;424(1-2):9-21.
182. Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res.* 2000;464(1):35-40.
183. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988;35:95-125.
184. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science.* 1999;286(5446):1897-905.
185. Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol.* 1989;14(4):307-20.
186. Foray N, Monroco C, Marples B, Hendry JH, Fertil B, Goodhead DT, et al. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability. *Int J Radiat Biol.* 1998;74(5):551-60.
187. Schneeweiss FH, Tisljar-Lentulis G, Haustein K, Feinendegen LE. 'Periodical' pattern of kinetics of DNA strand break repair following gamma-irradiation of human T1-cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1987;52(3):491-3.
188. Foray N, Arlett CF, Malaise EP. Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look. *Biochimie.* 1997;79(9-10):567-75.
189. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Rénier W, Chavaudra N, et al. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *International Journal of Radiation Biology.* 2008;84(2):1-19.
190. Joubert A, Foray N. [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother.* 2007;11(3):129-42.
191. Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, et al. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J.* 2003;22(11):2860-71.
192. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27(3):247-54.
193. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408(6811):433-9.
194. Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):71-7.
195. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1999;13(8):916-34.

196. Brown EJ, Baltimore D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 2003;17(5):615-28.
197. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462-7.
198. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-68.
199. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999;146(5):905-16.
200. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5057-62.
201. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 2002;158(4):486-92.
202. Ager DD, Dewey WC. Calibration of pulsed field gel electrophoresis for measurement of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 1990;58(2):249-59.
203. Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays.* 1991;13(12):641-8.
204. Iliakis G, Pantelias GE, Okayasu R, Seaner R. 125IdUrd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar repair kinetics in G1-phase CHO-cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1987;52(5):705-22.
205. Granzotto A, Joubert A, Viau M, Devic C, Maalouf M, Thomas C, et al. Individual response to ionising radiation : what predictive assay(s) to choose? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.* 2011;334:140-57.
206. Renier W, Joubert A, Bencokova Z, Gastaldo J, Massart C, Foray N. Consequences of the bleed-through phenomenon in immunofluorescence of proteins forming radiation-induced nuclear foci. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(8):543-9.
207. Bodgi L, Foray N. Effets biologiques des radiations ionisantes. Une théorie basée sur le transit cyto-nucléaire de la protéine ATM. Applications à la radiothérapie Sarrebruck, Allemagne: Editions universitaires européennes; 2016.
208. Thyagarajan B, McCormick-Graham M, Romero DP, Campbell C. Characterization of homologous DNA recombination activity in normal and immortal mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(20):4084-91.
209. Ehrlich SD, Bierne H, d'Alencon E, Vilette D, Petranovic M, Noirot P, et al. Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene.* 1993;135(1-2):161-6.
210. Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem.* 2001;276(22):19375-81.
211. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396(6712):643-9.
212. Zhou ZH, Akgun E, Jasin M. Repeat expansion by homologous recombination in the mouse germ line at palindromic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(15):8326-33.
213. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* 2001;412(6847):607-14.
214. Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, et al. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2462-7.
215. Bodgi L, Granzotto A, Devic C, Vogin G, Lesne A, Bottollier-Depois JF, et al. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J Theor Biol.* 2013;333:135-45.

216. Joubert A, Foray N. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: History, Progress and Controversies. In: Landseer BR, editor. In: *New Research on DNA Repair*: Nova Science Publishers, Inc; 2006.
217. Berthel E, Ferlazzo M, C. D, Bourguignon M, Foray N. What does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?—A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20:5339.
218. Berthel E, Foray N, Ferlazzo ML. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
219. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet*. 1995;4(11):2025-32.
220. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003;421(6922):499-506.
221. Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, et al. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*. 2000;405(6785):473-7.
222. Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 2004;304(5667):93-6.
223. Brown KD, Ziv Y, Sadanandan SN, Chessa L, Collins FS, Shiloh Y, et al. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1840-5.
224. Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, et al. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene*. 1997;14(16):1911-21.
225. Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, et al. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):871-6.
226. Oka A, Takashima S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neuroscience letters*. 1998;252(3):195-8.
227. Shiloh Y, Tabor E, Becker Y. Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. *Experimental cell research*. 1982;140(1):191-9.
228. Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, Podskalny J, et al. Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. *N Engl J Med*. 1978;298(21):1164-71.
229. McKinnon PJ, Burgoyne LA. Altered cellular morphology and microfilament array in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *European journal of cell biology*. 1985;39(1):161-6.
230. Ammann AJ, Cain WA, Ishizaka K, Hong R, Good RA. Immunoglobulin E deficiency in ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*. 1969;281(9):469-72.
231. Rhodes N, D'Souza T, Foster CD, Ziv Y, Kirsch DG, Shiloh Y, et al. Defective potassium currents in ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Dev*. 1998;12(23):3686-92.
232. Young DB, Jonnalagadda J, Gatei M, Jans DA, Meyn S, Khanna KK. Identification of domains of ataxia-telangiectasia mutated required for nuclear localization and chromatin association. *J Biol Chem*. 2005;280(30):27587-94.
233. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Cedervall B, Chavaudra N, et al. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat Res*. 1995;144(1):26-35.

234. Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, et al. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol.* 1997;72(3):271-83.
235. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeih G, Pantellias GE, Okayasu R, et al. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res.* 1995;55(6):1232-4.
236. Allalunis-Turner MJ, Barron GM, Day RS, 3rd, Dobler KD, Mirzayans R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiat Res.* 1993;134(3):349-54.
237. Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene.* 1999;18(51):7334-42.
238. Foray N, Verrelle P. [DNA repair and repair diseases: between molecular models and clinical reality]. *Bull Cancer.* 2011;98(3):257-75.
239. Cornforth MN, Bedford JS. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res.* 1987;111(3):385-405.
240. Duque-Parra JE. Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anatomical record Part B, New anatomist.* 2005;283(1):2-4.
241. Foray N. [Claudius Regaud (1870-1940): A pioneer of radiobiology and radiotherapy]. *Cancer Radiother.* 2012;16(4):315-21.
242. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000;455(1-2):81-95.
243. D'Amico AV, McKenna WG. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiother Oncol.* 1994;33(1):3-10.
244. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 1990;68(9):1071-4.
245. Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques.* 1993;15(6):1032-40.
246. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 1993;362(6423):847-9.
247. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994;8(21):2540-51.
248. Li CY, Nagasawa H, Dahlberg WK, Little JB. Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced G1 arrest in established human tumor cell lines. *Oncogene.* 1995;11(9):1885-92.
249. Chaurasia M, Bhatt AN, Das A, Dwarkanath BS, Sharma K. Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. *Free radical research.* 2016;50(3):273-90.
250. White E. Entosis: it's a cell-eat-cell world. *Cell.* 2007;131(5):840-2.
251. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103(5):653-66.
252. Hewitt HB, Wilson CW. A survival curve for mammalian cells irradiated in vivo. *Nature.* 1959;183:1060-1.
253. Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1981;7(5):621-9.
254. Cosset JM, Chargari C, Créhange G. [Which alpha/beta ratio for prostate cancer in 2019?]. *Cancer Radiother.* 2019;23(4):342-5.
255. Bodgi L, Canet A, Pujol-Menjouet L, Lesne A, Victor JM, Foray N. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *J Theor Biol.* 2016;394:93-101.
256. Chadwick KH, Leenhouts HP. A molecular theory of cell survival. *Physics Medicine Biology.* 1973;13:78-87.



257. Kellerer AM, Rossi HH. The theory of dual radiation action. *Current Topics in Radiation Research*. 1972;8:85-158.
258. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods in molecular biology*. 2011;740:1-6.
259. Bouchacourt L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différents régions du corps. *Comptes-Rendus des Sessions de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences*. 1911, 40ème Congrès - Dijon, 942-947. 1911.
260. Foray N. [Leon Bouchacourt (1865-1949): How an obstetrician pointed out individual radiosensitivity]. *Cancer Radiotherapie*. 2015;19(8):752-61.
261. Foray N, Colin C, Bourguignon M. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. *Radiology*. 2012;264(3):627-31.
262. Foray N, Colin C, Bourguignon M. Radiosensibilité : l'évidence d'un facteur individuel. *Médecine Sciences*. 2013;29:397-403.
263. Curie P, Becquerel H. Action physiologique des rayons du radium. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1901;82:1289.
264. Bergonié J, Tribondeau L. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences*. 1906;143:983-4.
265. Vogin G, Foray N. The law of Bergonie and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *International Journal of Radiation Biology*. 2013;89:2-8.
266. Wetterer J. La radiothérapie des néoplasmes sous-cutanées. *Archives d'Electricité Médicale*. 1910;18(282 - Congrès International de Physiothérapie):229-40.
267. Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research Review*. 2016;770:369-86.
268. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;79(6):606-13.
269. Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, et al. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol*. 2003;13(3):176-81.
270. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003;4(9):529-36.
271. ICRP. Avoidance of radiation injuries from medical interventional procedures. Publication 85. *Ann ICRP*. 2000;30(2):1-72.
272. ICRP. ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs-threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Publication 118. *Ann ICRP*. 2012;41(1-2):1-322.
273. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol*. 2001;61(3):223-31.
274. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1341-6.
275. National Institutes of Health. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0. May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010). 2010.
276. Fertil B, Malaise EP. The mean inactivation dose: experimental versus theoretical. *Radiat Res*. 1986;108(2):222-5.

277. Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, et al. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*. 1975;258(5534):427-9.
278. Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol*. 1990;63(752):624-8.
279. Arlett CF, Harcourt SA. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res*. 1980;40(3):926-32.
280. Little JB, Nichols WW, Troilo P, Nagasawa H, Strong LC. Radiation sensitivity of cell strains from families with genetic disorders predisposing to radiation-induced cancer. *Cancer Res*. 1989;49(17):4705-14.
281. UNSCEAR. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation - 59th Session. . New York 2012.
282. Calabrese EJ. Origin of the linearity no threshold (LNT) dose-response concept. *Arch Toxicol*. 2013;87(9):1621-33.
283. Calabrese EJ. Muller's Nobel Prize Lecture: when ideology prevailed over science. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2012;126(1):1-4.
284. Calabrese EJ. From Muller to mechanism: How LNT became the default model for cancer risk assessment. *Environ Pollut*. 2018;241:289-302.
285. ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103. *Ann ICRP*. 2007;37(2-4):1-332.
286. Shore RE, Beck HL, Boice JD, Caffrey EA, Davis S, Grogan HA, et al. Implications of recent epidemiologic studies for the linear nonthreshold model and radiation protection. *J Radiol Prot*. 2018;38(3):1217-33.
287. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, et al. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):13761-6.
288. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol*. 1997;70:130-9.
289. Calabrese EJ. Hormesis: a fundamental concept in biology. *Microb Cell*. 2014;1(5):145-9.
290. Calabrese EJ, Baldwin LA. Radiation hormesis : its historical foundations as a biological hypothesis. *Human and Experimental toxicology*. 2000;19:41-75.
291. Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(5):1310-8.
292. Fukunaga H, Yokoya A. Low-dose radiation risk and individual variation in radiation sensitivity in Fukushima. *J Radiat Res*. 2016;57(1):98-100.
293. Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. 2003. *Radiat Res*. 2012;178(2):AV146-72.
294. Hauptmann M, Byrnes G, Cardis E, Bernier MO, Blettner M, Dabin J, et al. Brain cancer after radiation exposure from CT examinations of children and young adults: results from the EPI-CT cohort study. *Lancet Oncol*. 2023;24(1):45-53.
295. Ainsbury EA, Barnard S, Bright S, Dalke C, Jarrin M, Kunze S, et al. Ionizing radiation induced cataracts: Recent biological and mechanistic developments and perspectives for future research. *Mutation Research Review*. 2016;770(238-261).
296. Boerma M, Sridharan V, Mao XW, Nelson GA, Cheema AK, Koturbash I, et al. Effects of ionizing radiation on the heart. *Mutation Research Review*. 2016;this issue.
297. Hamada N, Sato T. Cataractogenesis following high-LET radiation exposure. *Mutation Research Review*. 2016;this issue.
298. Little MP. Radiation and circulatory disease. *Mutation Research Review*. 2016;this issue.

299. Shore R. Radiation and cataract risk: Impact of recent epidemiologic studies on ICRP judgments. *Mutation Research Review*. 2016;this issue.
300. Maalouf M, Durante M, Foray N. Biological effects of space radiation on human cells: history, advances and outcomes. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2011;52(2):126-46.
301. Chaluppecky H. Uber die wirkung der röntgenstrahlen auf das Auge und die haut. *Zentralbl Augenheilkd*. 1897;21:234-71.
302. Rollins W. Notes on x-light. The effect of x-light on the crystalline lens. . *Boston Med Surg J*. 1903;148:364-5.
303. ICRP. 1954 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *British Journal of Radiology*. 1955;28(S6).
304. Hamada N, Fujimichi Y. Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *J Radiat Res*. 2014;55(4):629-40.
305. Graw J. Mouse models of cataract. *Journal of Genetics*. 2009;88:469-86.
306. Zeiss CJ, Johnson EM, Dubielzig RR. Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium. *Veterinary Pathology*. 2003;40:355-62.
307. Moulay Lakhdar I, Ferlazzo ML, Al Choboq J, Berthel E, Sonzogni L, Devic C, et al. Fibroblasts from Retinoblastoma Patients Show Radiosensitivity Linked to Abnormal Localization of the ATM Protein. *Curr Eye Res*. 2020:1-12.
308. De Stefano I, Giardullo P, Tanno B, Leonardi S, Pasquali E, Babini G, et al. Nonlinear Radiation-Induced Cataract Using the Radiosensitive Ptch1+/- Mouse Model. *Radiat Res*. 2016.
309. De Stefano I, Tanno B, Giardullo P, Leonardi S, Pasquali E, Antonelli F, et al. The Patched 1 tumor-suppressor gene protects the mouse lens from spontaneous and radiation-induced cataract. *The American journal of pathology*. 2015;185(1):85-95.
310. Hall EJ, Worgul BV, Smilenov L, Elliston CD, Brenner DJ. The relative biological effectiveness of densely ionizing heavy-ion radiation for inducing ocular cataracts in wild type versus mice heterozygous for the ATM gene. *Radiation and environmental biophysics*. 2006;45(2):99-104.
311. Hamada N, Fujimichi Y. Role of carcinogenesis related mechanisms in cataractogenesis and its implications for ionizing radiation cataractogenesis. *Cancer Letters*. 2015;368(2):262-74.
312. Kleiman NJ, David J, Elliston CD, Hopkins KM, Smilenov LB, Brenner DJ, et al. Mrad9 and atm haploinsufficiency enhance spontaneous and X-ray-induced cataractogenesis in mice. *Radiat Res*. 2007;168(5):567-73.
313. Worgul BV, Smilenov L, Brenner DJ, Junk A, Zhou W, Hall EJ. Atm heterozygous mice are more sensitive to radiation-induced cataracts than are their wild-type counterparts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9836-9.
314. Worgul BV, Smilenov L, Brenner DJ, Vazquez M, Hall EJ. Mice heterozygous for the ATM gene are more sensitive to both X-ray and heavy ion exposure than are wild type counterparts. *Advances in Space Research*. 2005;35(2):254-9.
315. Neriishi K, Hayashi T, Nakashima E, Imai K, Nakachi K. ATM haplotypes and radiosensitivity in A-bomb survivors – preliminary trial using existing data at RERF. *Abstract Book of Radiation Cataractogenesis Workshop 2009; Japan2009*.
316. Fujimichi Y, Hamada N. Ionizing irradiation not only inactivates clonogenic potential in primary normal human diploid lens epithelial cells but also stimulates cell proliferation in a subset of this population. *PLoS one*. 2014;9(5):e98154.
317. ICRP. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR), ICRP Publication 92. *Ann ICRP*. 2003;33(4).
318. Babizhayev MA, Vishnyakova KS, Yegorov YE. Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis: the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2011;25(2):139-62.

319. Blakely EA, Bjornstad KA, Chang PY, McNamara MP, Chang E, Aragon G, et al. Growth and differentiation of human lens epithelial cells in vitro on matrix. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3898-907.
320. Kim I, Saito T, Fujii N, Kanamoto T, Chatake T, Fujii N. Site specific oxidation of amino acid residues in rat lens gamma-crystallin induced by low-dose gamma-irradiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;466(4):622-8.
321. Reste J, Zvigule G, Zvagule T, Kurjane N, Eglite M, Gabruseva N, et al. Telomere length in Chernobyl accident recovery workers in the late period after the disaster. *J Radiat Res*. 2014;55(6):1089-100.
322. Darby SC, Ewertz M, Hall P. Ischemic heart disease after breast cancer radiotherapy. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2527.
323. Seddon B, Cook A, Gothard L, Salmon E, Latus K, Underwood SR, et al. Detection of defects in myocardial perfusion imaging in patients with early breast cancer treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2002;64(1):53-63.
324. Tang S, Otton J, Holloway L, Delaney GP, Liney G, George A, et al. Quantification of cardiac subvolume dosimetry using a 17 segment model of the left ventricle in breast cancer patients receiving tangential beam radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2019;132:257-65.
325. Taylor C, McGale P, Bronnum D, Correa C, Cutter D, Duane FK, et al. Cardiac Structure Injury After Radiotherapy for Breast Cancer: Cross-Sectional Study With Individual Patient Data. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2288-96.
326. Reynolds R, Little MP, Day SM, Charvat J, Blattnig S, Huff JL, et al. Cancer Incidence and Mortality in the U.S. Astronaut Corps, 1959-2017. *Research Square*. 2020;in press.
327. Reynolds RJ, Day SM. Mortality due to cardiovascular disease among Apollo Lunar astronauts. *Aerospace Medicine Human Performances*. 2017;88:492-6.
328. Hughson RL, Helm A, Durante M. Heart in space: effect of the extraterrestrial environment on the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(3):167-80.
329. Axpe E, Chan D, Abegaz MF, Schreurs AS, Alwood JS, Globus RK, et al. A human mission to Mars: Predicting the bone mineral density loss of astronauts. *PloS one*. 2020;15(1):e0226434.
330. Garcia HD, Hays SM, Tsuji JS. Modeling of blood lead levels in astronauts exposed to lead from microgravity-accelerated bone loss. *Aviat Space Environ Med*. 2013;84(12):1229-34.
331. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight. *Keio J Med*. 2005;54(2):55-9.
332. Vico L, Hargens A. Skeletal changes during and after spaceflight. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(4):229-45.
333. Farley A, Gnyubkin V, Vanden-Bossche A, Laroche N, Neefs M, Baatout S, et al. Unloading-Induced Cortical Bone Loss is Exacerbated by Low-Dose Irradiation During a Simulated Deep Space Exploration Mission. *Calcif Tissue Int*. 2020;107(2):170-9.
334. Bachelet JT, A. G, Ferlazzo M, Sonzogni L, Berthel E, C. D, et al. First Radiobiological Characterization of Skin and Bone Cells from A Patient Suffering from the PI3KCA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) Syndrome. *Archives of Medical and Clinical Case Reports*. 2020;4:1052-66.
335. El-Nachef L, Al-Choboq J, Restier-Verlet J, Granzotto A, Berthel E, Sonzogni L, et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:7158.
336. Steel G. *Basic Clinical Radiobiology*. 3rd ed: Arnold Publishers; 1993. 262 p.
337. C D, N F. Effets biologiques des radiations ionisantes. Tome 2. Applications du modèle de transit cyto-nucléaire de la protéine ATM aux faibles doses de radiations.: Editions universitaires européennes 2021; 2021.

338. Ozsahin M, Crompton NE, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7426-33.
339. Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;94(3):450-60.
340. Averbek D, Candéias S, Chandna S, Foray N, Friedl AA, Haghdoost S, et al. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2020;96(3):297-323.
341. Ferlazzo ML, Sonzogni L, Granzotto A, Bodgi L, Lartin O, Devic C, et al. Mutations of the Huntington's disease protein impact on the ATM-dependent signaling and repair pathways of the radiation-induced DNA double-strand breaks: corrective effect of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol.* 2014;49(3):1200-11.
342. Ferlazzo ML, Bach-Tobdji MKE, Djerad A, Sonzogni L, Burlet SF, Devic C, et al. Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity. *Molecular Neurobiology.* 2017;55(4973-4983).
343. Ferlazzo M, Berthel E, Granzotto A, Devic C, Sonzogni L, Bachelet JT, et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int J Radiat Biol.* 2019:1-17.
344. Foray N, Badie C, Alsbeih G, Fertil B, Malaise EP. A new model describing the curves for repair of both DNA double-strand breaks and chromosome damage. *Radiat Res.* 1996;146(1):53-60.
345. Foray N, Charvet AM, Duchemin D, Favaudon V, Lavalette D. The repair rate of radiation-induced DNA damage: a stochastic interpretation based on the gamma function. *J Theor Biol.* 2005;236(4):448-58.
346. Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, et al. ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(17):10146-51.
347. Yang DQ, Halaby MJ, Li Y, Hibma JC, Burn P. Cytoplasmic ATM protein kinase: an emerging therapeutic target for diabetes, cancer and neuronal degeneration. *Drug discovery today.* 2011;16(7-8):332-8.
348. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med.* 2008;14(7):767-72.
349. Huo YK, Wang Z, Hong JH, Chessa L, McBride WH, Perlman SL, et al. Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, X-linked agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer Res.* 1994;54(10):2544-7.
350. Hannan MA, Sackey K, Sigut D. Cellular radiosensitivity of patients with different types of neurofibromatosis. *Cancer genetics and cytogenetics.* 1993;66(2):120-5.
351. Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol.* 1993;63(5):639-50.
352. Joiner MC, Marples B, Johns H. The response of tissues to very low doses per fraction: a reflection of induced repair? Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer.* 1993;130:27-40.
353. Thomas C, Charrier J, Massart C, Cherel M, Fertil B, Barbet J, et al. Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: impact of DNA repair. *International Journal of Radiation Biology.* 2008;84:533-48.
354. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;49(2):379-89.
355. Short SC, Woodcock M, Marples B, Joiner MC. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 2003;79(2):99-105.

356. Wykes SM, Piasentin E, Joiner MC, Wilson GD, Marples B. Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat Res.* 2006;165(5):516-24.
357. Xue L, Yu D, Furusawa Y, Cao J, Okayasu R, Fan S. ATM-dependent hyper-radiosensitivity in mammalian cells irradiated by heavy ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;75(1):235-43.
358. Tubiana M, Masse R, De Vathaire F, Auerbeck D, Aurengo A. La controverse sur les effets des faibles doses de rayonnements ionisants et la relation linéaire sans seuil. *Radioprotection.* 2007;42:133-61.
359. Thomas C, Martin J, Devic C, Bräuer-Krisch E, Diserbo M, Thariat J, et al. Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. *Int J Radiat Biol.* 2013;89(10):813-22.
360. Devic C, Ferlazzo ML, Berthel E, Foray N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose Response.* 2020;18(2):1559325820913784.
361. Devic C, Ferlazzo ML, Foray N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose Response.* 2018;16(3):1-11.
362. Schwab M. *Encyclopedia of cancer.* Heidelberg, Germany: Springer; 2011.
363. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science.* 1984;223(4636):594-7.
364. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222(1):122-8.
365. Joiner MC, Lambin P, Marples B. Adaptive response and induced resistance. *C R Acad Sci III.* 1999;322(2-3):167-75.
366. Southam C, M., Ehrlich J. Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology.* 1943;33:517-24.
367. Calabrese EJ. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(7):1451-74.
368. Luckey TD. *Hormesis with ionizing radiation* New York, USA: CRC Press; 1980.
369. Chen WL, Luan YC, Shieh MC, Chen ST, Kung HT, Soong KL, et al. Effects of cobalt-60 exposure on health of Taiwan residents suggest new approach needed in radiation protection. *Dose Response.* 2006;5(1):63-75.
370. Rithidech KN, Scott BR. Evidence for radiation hormesis after in vitro exposure to human lymphocytes to low doses of ionizing radiation *Dose Response.* 2008;6:252-71.
371. Raaphorst GP, Boyden S. Adaptive response and its variation in human normal and tumour cells. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(7):865-73.
372. Broome EJ, Brown DL, Mitchel RE. Dose responses for adaption to low doses of (60)Co gamma rays and (3)H beta particles in normal human fibroblasts. *Radiat Res.* 2002;158(2):181-6.
373. Fornalski KW, Dobrzynski L. The cancer mortality in high natural radiation areas in poland. *Dose Response.* 2012;10(4):541-61.
374. Gaetani S, Monaco F, Bracci M, Ciarapica V, Impollonia G, Valentino M, et al. DNA damage response in workers exposed to low-dose ionising radiation. *Occup Environ Med.* 2018;75(10):724-9.
375. Gamulin M, Garaj-Vrhovac V, Kopjar N, Ramic S, Viculin T, Juretic A, et al. DNA and cytogenetic damage in white blood cells of postmenopausal breast cancer patients treated with radiotherapy. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2010;45(3):292-304.

376. Hart J. Cancer mortality for a single race in low versus high elevation counties in the u.s. *Dose Response*. 2011;9(3):348-55.
377. Hart J, Hyun S. Cancer mortality, state mean elevations, and other selected predictors. *Dose Response*. 2012;10(1):58-65.
378. Kato H, Schull WJ, Awa A, Akiyama M, Otake M. Dose-response analyses among atomic bomb survivors exposed to low-level radiation. *Health Physics*. 1987;52:645-52.
379. Kojima S, Thukimoto M, Cuttler JM, Inoguchi K, Ootaki T, Shimura N, et al. Recovery From Rheumatoid Arthritis Following 15 Months of Therapy With Low Doses of Ionizing Radiation: A Case Report. *Dose Response*. 2018;16(3):1559325818784719.
380. Kojima S, Tsukimoto M, Shimura N, Koga H, Murata A, Takara T. Treatment of Cancer and Inflammation With Low-Dose Ionizing Radiation: Three Case Reports. *Dose Response*. 2017;15(1):1559325817697531.
381. Kuciel-Lewandowska JM, Pawlik-Sobecka L, Placzkowska S, Kokot I, Paprocka-Borowicz M. The assessment of the integrated antioxidant system of the body and the phenomenon of spa reaction in the course of radon therapy: A pilot study. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(10):1341-6.
382. Lee YT, Sung FC, Lin RS, Hsu HC, Chien KL, Yang CY, et al. Peripheral blood cells among community residents living near nuclear power plants. *Sci Total Environ*. 2001;280(1-3):165-72.
383. Lehrer S, Rosenzweig KE. Lung cancer hormesis in high impact states where nuclear testing occurred. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(2):152-5.
384. Li SJ, Liang XY, Li HJ, Yang GZ, Li W, Li Z, et al. Low-dose irradiation inhibits proliferation of the p53null type human prostate cancer cells through the ATM/p21 pathway. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):548-54.
385. Mine M, Okumura Y, Ichimaru M, Nakamura T, Kondo S. Apparently beneficial effect of low to intermediate doses of A-bomb radiation on human lifespan. *International Journal of Radiation Biology*. 1990;58:1035-43.
386. Palm S, Bäck T, Claesson I, Delle U, Hultborn R, Javobsson L, et al. Effects of the alpha-particle emitter At-211 and low-dose-rate gamma-radiation on the human cell line Colo-205 as studied with a growth assay. *Anticancer Research*. 1998;18:1671-6.
387. Thompson RE. Epidemiological Evidence for Possible Radiation Hormesis from Radon Exposure: A Case-Control Study Conducted in Worcester, MA. *Dose Response*. 2010;9(1):59-75.
388. Vieira Dias J, Gloaguen C, Kereselidze D, Manens L, Tack K, Ebrahimian TG. Gamma Low-Dose-Rate Ionizing Radiation Stimulates Adaptive Functional and Molecular Response in Human Aortic Endothelial Cells in a Threshold-, Dose-, and Dose Rate-Dependent Manner. *Dose Response*. 2018;16(1):1559325818755238.
389. Wang Y, Li Y, Yang L, Yin D. Intermittent low dose irradiation enhances the effectiveness of radio- and chemo-therapy for human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29. *Oncol Rep*. 2017;38(1):591-7.
390. Yang G, Yu D, Li W, Zhao Y, Wen X, Liang X, et al. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget*. 2016;7(44):71856-72.
391. Velegzhaninov IO, Ermakova AV, Klovov DY. Low dose ionizing irradiation suppresses cellular senescence in normal human fibroblasts. *Int J Radiat Biol*. 2018;94(9):825-8.
392. Doss M. Evidence supporting radiation hormesis in atomic bomb survivor cancer mortality data. *Dose Response*. 2012;10:584-92.
393. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi F, Soda M, Grant EJ, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res*. 2012;177(3):229-43.
394. Shimizu Y, Schull WJ, Kato H. Cancer risk among atomic bomb survivors. The RERF Life Span Study. Radiation Effects Research Foundation. *JAMA*. 1990;264(5):601-4.

395. Holzman D. Hormesis: fact or fiction? *J Nucl Med.* 1995;36(12):13N-4N, 6N.
396. Little MP, Wakeford R, Tawn EJ, Bouffler SD, Berrington de Gonzalez A. Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. *Radiology.* 2009;251(1):6-12.
397. Sies H, Feinendegen LE. Radiation Hormesis: The Link to Nanomolar Hydrogen Peroxide. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(9):596-8.
398. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
399. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17(10):1195-214.
400. Foray N. [Radiobiological features of anti-cancer treatments involving synchrotron radiation: outcome and perspectives]. *Cancer Radiother.* 2010;14(2):145-54.
401. Le Reun E, Bodgi L, Granzotto A, Sonzogni L, Ferlazzo ML, Al-Choboq J, et al. Quantitative Correlations between Radiosensitivity Biomarkers Show That the ATM Protein Kinase Is Strongly Involved in the Radiotoxicities Observed after Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18).
402. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995;268(5218):1749-53.
403. El Nacheff L, Berthel E, Ferlazzo ML, Le Reun E, Al-Choboq J, Restier-Verlet J, et al. Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity the Primum Movens? *Cancers (Basel).* 2022;14(24).
404. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. 2011.
405. Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37538-43.
406. Luteijn RD, Drexler I, Smith GL, Lebbink RJ, Wiertz EJHJ. Mutagenic repair of double-stranded DNA breaks in vaccinia virus genomes requires cellular DNA ligase IV activity in the cytosol. *J Gen Virol.* 2018;99(6):790-804.
407. Thariat J, Chevalier F, Orbach D, Ollivier L, Marcy PY, Corradini N, et al. Avoidance or adaptation of radiotherapy in patients with cancer with Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Lancet Oncol.* 2021;22(12):e562-e74.
408. Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol.* 2001;21(6):2184-91.
409. Cai Z, Chehab NH, Pavletich NP. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol Cell.* 2009;35(6):818-29.
410. Rodriguez JA, Au WW, Henderson BR. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Experimental cell research.* 2004;293(1):14-21.
411. Combemale P, Sonzogni L, Devic C, Bencokova Z, Ferlazzo ML, Granzotto A, et al. Individual Response to Radiation of Individuals with Neurofibromatosis Type I: Role of the ATM Protein and Influence of Statins and Bisphosphonates. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):556-73.
412. El-Nacheff L, Le Reun E, Bourguignon M, Foray N. [Individual risk of breast cancer and the triptych "environment, genetics and genomics": a story of DNA repair?]. *Imagerie de la Femme.* 2022 Dec;32(4):76-81. doi: 10.1016/j.femme.2022.10.002. 2022.
413. Le Reun E, L B, M B, N F. The strategies of anti-tumor radiotherapy and their corresponding radiobiological outcomes: some questions of time, energy, and space. *Revue en préparation.* In: Bodgi L, Bourguignon M, N F, editors.
414. MOLE RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol.* 1953;26(305):234-41.



415. Roti Roti JL, Wright WD. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry*. 1987;8(5):461-7.
416. Mothersill C, Rusin A, Fernandez-Palomo C, Seymour C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int J Radiat Biol*. 2018;94(8):696-707.
417. Mothersill C, Rusin A, Seymour C. Relevance of Non-Targeted Effects for Radiotherapy and Diagnostic Radiology; A Historical and Conceptual Analysis of Key Players. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).
418. Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):158-64.
419. Mirjolet C, Truc G. [Abscopal effect: Myth or reality?]. *Cancer Radiother*. 2021;25(6-7):533-6.
420. Abuodeh Y, Venkat P, Kim S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr Probl Cancer*. 2016;40(1):25-37.
421. Stone HB, Peters LJ, Milas L. Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 1979;63(5):1229-35.
422. Chicas-Sett R, Morales-Orue I, Rodriguez-Abreu D, Lara-Jimenez P. Combining radiotherapy and ipilimumab induces clinically relevant radiation-induced abscopal effects in metastatic melanoma patients: A systematic review. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2018;9:5-11.
423. Restier-Verlet J, Joubert A, Ferlazzo ML, Granzotto A, Sonzogni L, Al-Choboq J, et al. X-rays-Induced Bystander Effect Consists in the Formation of DNA Breaks in a Calcium-Dependent Manner: Influence of the Experimental Procedure and the Individual Factor. *Biomolecules*. 2023;13(3).
424. Le Reun E, Foray N. Low-Dose Radiation Therapy (LDRT) against Cancer and Inflammatory or Degenerative Diseases: Three Parallel Stories with a Common Molecular Mechanism Involving the Nucleoshuttling of the ATM Protein? *Cancers (Basel)*. 2023;15(5).
425. Joiner MC, Denekamp J. The effect of small radiation doses on mouse skin. *Br J Cancer Suppl*. 1986;7:63-6.
426. Marples B, Joiner MC. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat Res*. 1993;133(1):41-51.
427. Lambin P, Malaise EP, Joiner MC. The effect of very low radiation doses on the human bladder carcinoma cell line RT112. *Radiother Oncol*. 1994;32(1):63-72.
428. Short SC, Kelly J, Mayes CR, Woodcock M, Joiner MC. Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro. *Int J Radiat Biol*. 2001;77(6):655-64.
429. Yang EJ, Kim H, Choi Y, Kim HJ, Kim JH, Yoon J, et al. Modulation of Neuroinflammation by Low-Dose Radiation Therapy in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2021;111(3):658-70.
430. Wilson GD, Wilson TG, Hanna A, Fontanesi G, Kulchycki J, Buelow K, et al. Low Dose Brain Irradiation Reduces Amyloid- $\beta$  and Tau in 3xTg-AD Mice. *J Alzheimers Dis*. 2020;75(1):15-21.
431. Wang S, Mims PN, Roman RJ, Fan F. Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Parkinsonism Dement*. 2016;1(2).
432. Kim S, Nam Y, Kim C, Lee H, Hong S, Kim HS, et al. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Low-Moderate Dose Ionizing Radiation in Models of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
433. Luyten FP, Lories RJ, Verschueren P, de Vlam K, Westhovens R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):829-48.
434. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallesse EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev*. 2005;208:228-51.

435. Zoulikha M, Huang F, Wu Z, He W. COVID-19 inflammation and implications in drug delivery. *J Control Release*. 2022;346:260-74.
436. Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Biete A, Piqué JM, et al. Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: correlation with TGF-beta(1) expression. *Radiother Oncol*. 2008;86(3):399-406.
437. Arenas M, Gil F, Gironella M, Hernández V, Jorcano S, Biete A, et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66(2):560-7.
438. Rödel F, Schaller U, Schultze-Mosgau S, Beuscher HU, Keilholz L, Herrmann M, et al. The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlenther Onkol*. 2004;180(4):194-200.
439. Le Reun E, Casutt A, Durham A, Bouchaab H, Romano E, Lovis A, et al. Lung stereotactic radiation therapy: Intercomparison of irradiation devices in terms of outcome and predictive factors. *Cancer Radiother*. 2023;27(1):31-41.
440. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abastabar H, Abd-Allah F, Abdel-Rahman O, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2019;5(12):1749-68.
441. Haasbeek CJA, Palma D, Visser O, Lagerwaard FJ, Slotman B, Senan S. Early-stage lung cancer in elderly patients: a population-based study of changes in treatment patterns and survival in the Netherlands. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2743-7.
442. Palma D, Visser O, Lagerwaard FJ, Belderbos J, Slotman BJ, Senan S. Impact of introducing stereotactic lung radiotherapy for elderly patients with stage I non-small-cell lung cancer: a population-based time-trend analysis. *J Clin Oncol*. 2010;28(35):5153-9.
443. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl\_4):iv1-iv21.
444. Videtic GMM, Woody NM, Reddy CA, Stephans KL. Never too old: A single-institution experience of stereotactic body radiation therapy for patients 90 years and older with early stage lung cancer. *Pract Radiat Oncol*. 2017;7(6):e543-e9.
445. Weder W, Moghanaki D, Stiles B, Siva S, Rocco G. The great debate flashes: surgery versus stereotactic body radiotherapy as the primary treatment of early-stage lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018;53(2):295-305.
446. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie AV, Haasbeek C, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial. *Lancet*. 2019;393(10185):2051-8.
447. Claude L, Morelle M, Mahé MA, Pasquier D, Boisselier P, Bondiau PY, et al. A comparison of two modalities of stereotactic body radiation therapy for peripheral early-stage non-small cell lung cancer: results of a prospective French study. *Br J Radiol*. 2020;93(1116):20200256.
448. Muller DA, Dutta SW, Aliotta E, Sanders JC, Wijesooriya K, Watkins WT, et al. Clinical Outcomes and Predictors of Lung Toxicity After Multiple Courses of Lung Stereotactic Body Radiotherapy for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2021;22(3):234-41.
449. Saha A, Beasley M, Hatton N, Dickinson P, Franks K, Clarke K, et al. Clinical and dosimetric predictors of radiation pneumonitis in early-stage lung cancer treated with Stereotactic Ablative radiotherapy (SABR) - An analysis of UK's largest cohort of lung SABR patients. *Radiother Oncol*. 2021;156:153-9.

450. Chao PJ, Tsai IH, Huang CC, Lin CH, Shieh CS, Hsieh YW, et al. Radiation-Induced Secondary Cancer Risk Assessment in Patients With Lung Cancer After Stereotactic Body Radiotherapy Using the CyberKnife M6 System With Lung-Optimized Treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:306.
451. Le Reun E, Granzotto A, Pêtre A, Bodgi L, Beldjoudi G, Lacornerie T, et al. Influence of the Hypersensitivity to Low Dose Phenomenon on the Tumor Response to Hypofractionated Stereotactic Body Radiation Therapy. *Cancers (Basel).* 2023;15(15).
452. Lipani J. Tumors of the Spine 2008, Chapter 16 - Stereotactic Radiosurgery of the Spine. Pages 346-355. 2008.
453. Berthel E, Pujo-Menjouet L#, Le Reun E#, Sonzogni L#, Al-Choboq J, Chekroun A, et al. Toward an Early Diagnosis for Alzheimer's Disease Based on the Perinuclear Localization of the ATM Protein. *Cells.* 2023 Jun 29;12(13):17-47. doi: 10.3390/cells12131747. 2023.
454. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2021;20(1):68-80.
455. Soares HD, Morgan JI, McKinnon PJ. Atm expression patterns suggest a contribution from the peripheral nervous system to the phenotype of ataxia-telangiectasia. *Neuroscience.* 1998;86(4):1045-54.
456. C M, A J, A G, M V, F S, J B, et al. Prediction of the human radiosensitivity : What is the most relevant endpoint? Gene expressions, mutations or functions? In: Hauppauge NY, editor *Genotoxicity, testing and prediction.* New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.; 2009. 2009.
457. Schae D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res.* 2012;178(6):505-23.
458. Rödel F, Kamprad F, Sauer R, Hildebrandt G. [Functional and molecular aspects of anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy]. *Strahlenther Onkol.* 2002;178(1):1-9.
459. Roedel F, Kley N, Beuscher HU, Hildebrandt G, Keilholz L, Kern P, et al. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(8):711-9.
460. Baisch H. Effects of X-rays on cell membranes. II. Changes of permeability measured by fluorescein efflux. *Radiation and environmental biophysics.* 1978;15(3):221-8.
461. Le Reun E, Chargari C. Curiethérapie à bas débit de dose pulsé (PDR) pour le traitement conservateur des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques de l'enfant. Communication orale au 33ème congrès de la Société Française de Radiothérapie Oncologique, session scientifique du 28 septembre 2022. In: C C, editor. 2022.
462. Le Reun E, Espenel S, Garcia MA, Minard V, Guérin F, Chargari C. Image-guided brachytherapy for pediatric bladder and/or prostate rhabdomyosarcoma: toward an increased personalization of treatment. *Article en préparation.*

## VII. ANNEXES

---

### *Publications dans des journaux à comité de lecture (peer-reviewed)*

- **ARTICLE 1** : Choix de la protéine ATM comme biomarqueur radiobiologique (401)
- **REVUE A** : Causes et conséquences d'un retard de RIANS (403)
- **REVUE B** : Modèle RIANS face à la répétition de faibles doses (413)
- **REVUE C** : Hypothèses mécanistiques de la radiothérapie par faibles doses (424)
- **ARTICLE 2** : Choix du CyberKnife® comme outil expérimental (439)
- **ARTICLE 3** : Phénomène HRS en radiothérapie stéréotaxique par CyberKnife® (451)
- **ARTICLE 4** : Diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer et perspectives de LDRT (453)
- Effet bystander et dommages de l'ADN calcium-dépendants (423)

### *Vulgarisation scientifique*

- Dommages de l'ADN et risque individuel de cancer du sein (412)

### *Communication en congrès*

- Curiethérapie PDR des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques de l'enfant (461)

*Les annexes sont présentées ci-après dans l'ordre précédemment énoncé.*



Article

# Quantitative Correlations between Radiosensitivity Biomarkers Show That the ATM Protein Kinase Is Strongly Involved in the Radiotoxicities Observed after Radiotherapy

Eymeric Le Reun <sup>1,†</sup>, Larry Bodgi <sup>1,2,3,†</sup> , Adeline Granzotto <sup>1</sup>, Laurène Sonzogni <sup>1</sup>, Mélanie L. Ferlazzo <sup>1</sup>, Joëlle Al-Choboq <sup>1</sup> , Laura El-Nachef <sup>1</sup>, Juliette Restier-Verlet <sup>1</sup>, Elise Berthel <sup>1</sup> , Clément Devic <sup>1</sup> , Audrey Bouchet <sup>1</sup> , Michel Bourguignon <sup>1,4</sup> and Nicolas Foray <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Inserm, U1296 Unit, «Radiation: Defense, Health and Environment», Centre Léon-Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France  
<sup>2</sup> Department of Radiation Oncology, American University of Beirut Medical Center, Riad El-Solh, Beirut 1107-2020, Lebanon  
<sup>3</sup> Department of Anatomy, Cell Biology and Physiological Sciences, Faculty of Medicine, American University of Beirut, Bliss Street, 11-0236 Riad El-Solh, Beirut 1107-2020, Lebanon  
<sup>4</sup> Department of Biophysics and Nuclear Medicine, Université Paris Saclay Versailles St. Quentin en Yvelines, 78035 Versailles, France  
\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-4-78-78-28-28  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative Correlations between Radiosensitivity Biomarkers Show That the ATM Protein Kinase Is Strongly Involved in the Radiotoxicities Observed after Radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. <https://doi.org/10.3390/ijms231810434>

Academic Editors: Yi-Jang Lee and Yu-Chan Chang

Received: 30 July 2022

Accepted: 7 September 2022

Published: 9 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Tissue overreactions (OR), whether called adverse effects, radiotoxicity, or radiosensitivity reactions, may occur during or after anti-cancer radiotherapy (RT). They represent a medical, economic, and societal issue and raise the question of individual response to radiation. To predict and prevent them are among the major tasks of radiobiologists. To this aim, radiobiologists have developed a number of predictive assays involving different cellular models and endpoints. To date, while no consensus has been reached to consider one assay as the best predictor of the OR occurrence and severity, radiation oncologists have proposed consensual scales to quantify OR in six different grades of severity, whatever the organ/tissue concerned and their early/late features. This is notably the case with the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Few radiobiological studies have used the CTCAE scale as a clinical endpoint to evaluate the statistical robustness of the molecular and cellular predictive assays in the largest range of human radiosensitivity. Here, by using 200 untransformed skin fibroblast cell lines derived from RT-treated cancer patients eliciting OR in the six CTCAE grades range, correlations between CTCAE grades and the major molecular and cellular endpoints proposed to predict OR (namely, cell survival at 2 Gy (SF2), yields of micronuclei, recognized and unrepaired DSBs assessed by immunofluorescence with  $\gamma$ H2AX and pATM markers) were examined. To our knowledge, this was the first time that the major radiosensitivity endpoints were compared together with the same cohort and irradiation conditions. Both SF2 and the maximal number of pATM foci reached after 2 Gy appear to be the best predictors of the OR, whatever the CTCAE grades range. All these major radiosensitivity endpoints are mathematically linked in a single mechanistic model of individual response to radiation in which the ATM kinase plays a major role.

**Keywords:** radiosensitivity; radiotherapy; DNA double-strand breaks; ATM; overreactions; predictive assays

## 1. Introduction

Among cancer patients treated with radiation therapy (RT), about 5 to 20% may elicit tissue overreactions (OR) (also called adverse effects, radiotoxicity, or radiosensitivity reactions) occurring during or after the treatment. Such ORs can limit the application of the scheduled treatment and increase morbidity: ORs represent therefore a significant medical,

economic, and societal issue [1–10]. One of the major tasks of radiobiologists is to better understand, predict, and prevent them [11]. However, the diversity of the predictive assays proposed, the number of different experimental protocols, cohorts, and cellular models, the biases linked to the extrapolation of data from animal models, and the lack of a systematic biomathematical approach that would justify and consolidate each step of the prediction process have not helped radiobiologists to reach a consensus about the predictive assay to be applied in routine [3,11,12].

First, the existence of ORs, which is likely to be specific to each individual, has long been debated: since ORs may be similar to the tissue reactions expected after a dose excess, ORs have been suggested to be caused by dosimetry errors. However, the RT accident in Epinal (France) demonstrated that the same dose excess may produce a large spectrum of OR severities among treated patients, likely reflecting individual responses to RT [13,14]. This last statement must be modulated by the considerable progress in the quantification of the physical dose of ionizing radiation (IR) in the irradiated tissue area. In addition, a number of genetic diseases associated with significant radiosensitivity have highlighted the impact of individual predisposition in the final outcome of RT-treated patients, independently of any dosimetry error [3,15].

In order to establish the requirements for a relevant and robust prediction of ORs, let us survey the major features of the post-RT ORs based on clinical observations:

- *Spectrum of OR severities*: ORs show a large and continuous spectrum of severities, from non-hazardous effects on irradiated healthy tissues to fatal reactions. Hence, any relevant predictive assay should reflect this spectrum with constant statistical robustness. In other terms, the power of OR prediction of the predictive assays should be independent of the OR severity [3].
- *Dose–response*: The higher the dose, the more severe and the earlier the OR. Such observations suggest that predictive assays should also be consistent with the dose–response relationships observed both in vivo and in vitro [5].
- *Early/late OR prediction*: The early or late occurrence of ORs does not condition their severities. In other terms, both early and late ORs may show a large spectrum of severities, from non-hazardous effects on irradiated healthy tissues to fatal reactions. Hence, the power of the OR prediction of the predictive assays should be independent of the early or late nature of ORs [6,16,17].
- *Tissue representativeness*: ORs potentially concern all the irradiated organs/tissues of the body. Hence, the molecular and cellular models chosen for the predictive assay should be representative enough to account for ORs occurring in all the tissues of the human body [3].
- *OR severity scales endpoint*: In practice, OR occurrence and severity are generally estimated with the local experience of each oncologist and each medical staff of each radiotherapy department. To alleviate the subjectivity of such approaches, some grading severity scales have been proposed to characterize post-RT ORs for each irradiated organ/tissue of the body. This is notably the case of the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) [16,17] and the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) [6] scales, which are the most extensively used. These two scales consist of classifying OR severity into six grades (from grade 0: no event, to grade 5: death). Hence, to establish a statistically robust correlation between the clinical features of ORs and molecular and/or cellular assays, the OR severity scales should be systematically used as clinical endpoints to quantify the individual response of each treated patient to RT [6,16,17].

Several approaches have been chosen by radiobiologists to develop predictive assays [3,11]. Among them, the *genomic* approach based on the determination of DNA sequences whether through single nucleotide polymorphisms (SNPs) or genome-wide association studies (GWAS) cannot reach the above dose–response requirement since DNA sequences, whatever their form, cannot predict the dose–response specific to each tissue and individual since it does not change after irradiation [18,19]. Hence, one SNP cannot be

associated with a unique dose–response of a given healthy tissue for a given RT schedule. Conversely, a genomic approach consisting of a systematic analysis of all the mutations of all the genes potentially involved in radiotoxicity is interesting, particularly if some mutations are found in common with patients with the same nature and occurrence of OR [3]. However, even if the genotype/phenotype relationships are well known for one specific gene, such an approach would not reach the above dose–response requirement because many other mutated genes can interplay to provide a specific dose–response observed in each patient. Lastly, a genomic approach that would consist of quantifying the dose-dependent expression of one given gene involved in the individual response to IR is very promising, but further investigations are still needed to better understand the interplay with the radiation-induced expression of other genes involved in the final outcome [20,21].

Unlike the genomic approach, the *functional* approach privileges the assessment of biological functions essential for a normal individual response to IR, *independently of the knowledge of the DNA sequence* or the genes involved [3]. Such a “blind” approach reaches all the above requirements but does not directly provide a diagnosis of the mutations of the gene(s) that cause(s) ORs. The data accumulated all along the history of radiobiology converge to propose the clonogenic cell survival assay as the gold standard for predicting individual response to IR. The clonogenic cell survival assay is considered as belonging to the functional approach since it is based on the assessment of the whole radiation-induced (RI) cell death, independently of its nature (mitotic death, senescence, or apoptosis) [22–27]. Unfortunately, the clonogenic cell survival assay is too time-consuming to ensure a routine prediction of ORs. The same conclusions were reached with predictive assays based on cytogenetics endpoints, similarly to the micronuclei and the chromosome breaks assays that have been also found correlated to cell survival [3,28,29]. Lastly, since cell survival, micronuclei, and chromosome breaks were found to be correlated with unrepaired DNA double-strand breaks (DSBs), the yield of unrepaired DSBs may be of interest to predicting ORs [30–35]. However, according to the technique applied, there are numerous DSB endpoints proposed in the literature [36–40]. This is notably the case of immunofluorescence against the phosphorylated forms of the variant X of the H2AX histone ( $\gamma$ H2AX) [38,41] and the phosphorylated forms of the ATM protein (pATM) [42] that both form nuclear foci at the DSB sites. Unfortunately, low yields of unrepaired DSBs were not accurate in predicting moderate radiosensitivity [40,43].

ATM kinase, whose mutations cause ataxia telangiectasia, the human syndrome associated with the highest radiosensitivity, is upstream of the major DSB repair and signaling pathways [44–46]. Since 2003, our group has accumulated hundreds of skin fibroblasts from RT-treated patients eliciting a large range of OR severities, the COPERNIC collection [35]. From the COPERNIC collection, we have provided experimental and theoretical clues showing that the radiation-induced (RI) nucleoshuttling of ATM (RIANS) is a statistically robust and reliable predictor of OR [43,47,48]. Lastly, it is noteworthy that the RIANS model is also at the basis of a novel resolution of the linear quadratic (LQ) model, the general formula that aims to link cell survival and radiation dose and whose biological interpretation has remained unsolved since the 1970s [49,50].

Here, with 200 COPERNIC skin fibroblast cell lines deriving from OR patients, inter-correlations between CTCAE grades, cell survival, micronuclei, and yields of recognized and unrepaired DSBs from  $\gamma$ H2AX and pATM data were examined. A general, coherent, and multi-parametric analysis of the prediction of post-RT OR is proposed from quantitative correlations between the above radiosensitivity endpoints.

## 2. Results

### 2.1. Clonogenic Cell Survival vs. CTCAE Grades

Since a dose of 2 Gy X-rays generally represents the current dose applied per standard radiotherapy session, the survival fraction at 2 Gy (SF2) has been used to quantify radiosensitivity [22,24]. Here, the clonogenic cell survival assay was not systematically applied to all

the cell lines of the COPERNIC collection but to a representative subset of 36 COPERNIC cell lines (including 10, 1, 6, 6, 6, and 7 cell lines derived from patients with CTCAE grade 0, 1, 2, 3, and 6 reactions, respectively (Figure 1A)). It must be stressed that, in practice, the clinical criteria of CTCAE grade 1 still remain subjective and some grade 1 ORs may be preferentially and provisionally graded to 0 or 2 CTCAE grade. No significant correlation was observed between the clonogenicity (plating efficiency) and the corresponding CTCAE grades, suggesting that the proliferation capacity is not a predictor of OR. The SF2 data were plotted against the corresponding CTCAE grades. The SF2 data from the patients who were apparently healthy or did not show ORs were not found significantly different ( $p > 0.8$ ), and the corresponding SF2 values were in agreement with the most radioresistant cells in the literature (average SF2 value:  $62.1 \pm 1.4\%$ ; CTCAE grade 0). The SF2 values corresponding to patients who succumbed to RT (here, *ATM*- and *LIG4*-mutated patients) were also found consistent with published data (average SF2 value:  $3.3 \pm 0.5\%$ ; CTCAE grade 5). Hence, to obey the mathematical constraints, these bounded values suggested either a linear or a sigmoidal law between SF2 data and CTCAE grades. By plotting all the SF2 data available, the best data fit chosen among the current mathematical laws was found to be a linear law (Table 1):

$$\text{SF2 (\%)} = 61.55 - 11.72 \times \text{grade}; r^2 = 0.98. \quad (1)$$

**Table 1.** Fitting parameters for the relationships between the radiosensitivity endpoints.

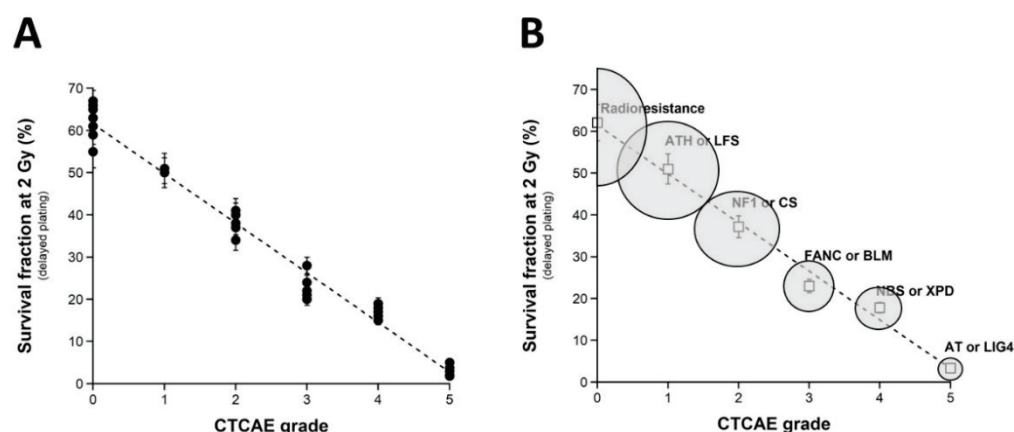
Endpoints Concerned	Fitting Function	Adjusted a1 Value *	Adjusted a2 Value *	Adjusted $r^2$	SSE **	RMS ***
SF2 = f(grade)	$f(x) = a \cdot x + a2$	-11.72 (-12.3, -11.15)	61.55 (59.77, 63.32)	0.9805	329.9	3.162
SF2 = f(MN <sub>24h</sub> )	$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x)$	68.55 (62.39, 74.72)	-0.1142 (-0.1363, -0.09208)	0.8839	1966	7.719
SF2 = f(H2AX <sub>24h</sub> )	$f(x) = a \cdot \exp(b \cdot x)$	62.56 (57.25, 67.87)	-0.2168 (-0.261, -0.1726)	0.8685	2228	8.217
pATMmax = f(grade)	$f(x) = a1 \cdot x + a2$	-6.786 (-7.356, -6.215)	41.72 (39.99, 43.45)	0.7399	3912	4.514
SF2 = f(pATMmax)	$f(x) = a1 \cdot x$	1.422 (1.322, 1.523)	NA	0.8794	1971	7.848

\* with 95% confidence bounds; \*\* SSE: sum squared error; \*\*\* RMSE: root mean square error; NA: non-applicable. See also Materials and Methods.

Whatever the variation of grade 1 data, a sigmoidal law between SF2 and CTCAE grades was not possible. Altogether, our data suggest that decreasing every 11.72% cell survival increment leads to a decrease in one additional CTCAE grade (Figure 1A). It must be stressed here that such a conclusion was reached in the largest OR severity range possible. Altogether, these data consolidate the power of the OR prediction of the clonogenic cell survival assay. Interestingly, by calculating the average SF2 corresponding to each grade data (grade 0:  $62.1 \pm 1.4\%$ ; grade 1:  $51.0\%$ ; grade 2:  $37.2 \pm 3.8\%$ ; grade 3:  $23.0 \pm 1.4\%$ ; grade 4:  $17.8 \pm 0.6\%$ ), some similarities appeared with the SF2 values associated with some well-characterized genetic diseases and the database of our research group [15]. These diseases are mentioned in Figure 1B. Such findings strengthened the fact that ORs and the radiosensitivity of genetic origin reflect the same large and continuous spectrum of responses to IR. Reciprocally, the CTCAE grades showed the relevant values that can be found in the case of the IR exposure of the patients suffering from the indicated genetic diseases associated with radiosensitivity (Figure 1B).

It is noteworthy that no fibroblast cell line of the COPERNIC collection elicited apoptotic death, whether irradiated or not. Since the COPERNIC fibroblasts cover the largest OR severity range possible, the absence of apoptosis suggests that this specific cellular death cannot explain radiotoxicity observed in fibroblasts, which represents the majority of human tissues.





**Figure 1.** Clonogenic cell survival vs. CTCAE grades. **(A)** The SF2 data from 36 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding CTCAE grade values (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The best data fit was obtained with the linear law:  $SF2 (\%) = 61.55 - 11.72 \times \text{grade}$ ;  $r^2 = 0.98$  (dotted line). **(B)** The average SF2 values ( $\pm$ SEM) of the data shown in Fig1A were plotted against the corresponding CTCAE grade (open squares). The dotted line is the reproduction of the data fit shown in (A). An arbitrary 25% relative error was applied to the SF2 and grade values. The resulting 25% confidence circle zones were built in grey. They schematically reproduce the average SF2 values observed from fibroblasts deriving from patients suffering from the indicated syndromes (AT: ataxia telangiectasia, homozygous mutations of *ATM*; LIG4: homozygous mutations of *LIG4*; NBS: Nijmegen's syndrome, homozygous mutations of *NBS1*; XPD, xeroderma pigmentosum D, homozygous mutations of *XPD*; BLM, Bloom's syndrome, homozygous mutations of *BLM*; FANC, Fanconi anemia, homozygous mutations of *FANC*; NF1, neurofibromatosis type 1, heterozygous mutations of neurofibromin; CS, Cockayne's syndrome, homozygous mutations of *CS*; LFS: Li-Fraumeni's syndrome, heterozygous mutations of p53; ATH, heterozygous mutations of *ATM*). The syndromes data were obtained from our lab and published elsewhere [3,15].

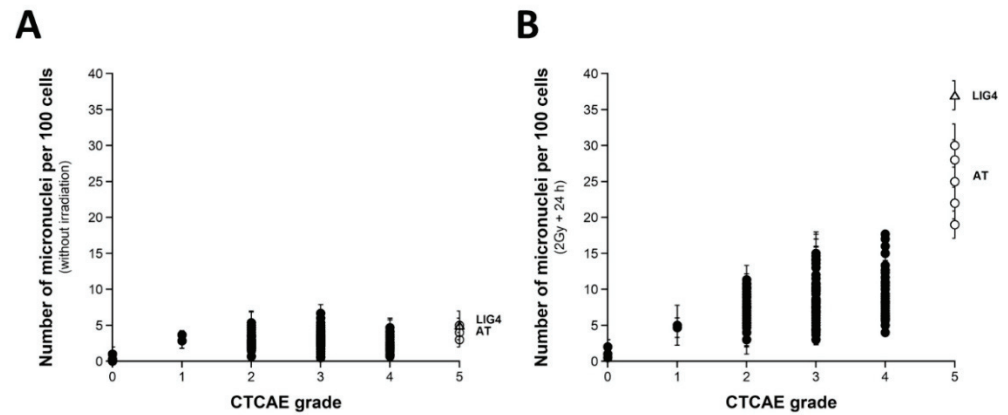
## 2.2. Number of Micronuclei vs. CTCAE Grades and SF2-Micronuclei Relationships

Micronuclei lead to irreversibly damaged chromosomal fragments causing mitotic death [51]. Micronuclei have been shown to be quantitatively correlated with cellular radiosensitivity when assessed by the clonogenic cell survival assay [28,52–54]. However, to our knowledge, such cytogenetic endpoints have not yet been tested in a large spectrum of CTCAE grades, with the notable exception of our previous report gathering 117 COPERNIC cell lines [43]. Here, micronuclei were scored before or 24 h after irradiation in 200 COPERNIC cells. With regard to spontaneous micronuclei, no significant correlation was found with the CTCAE grades (Figure 2A). Conversely, when 24 h data were plotted against the CTCAE grades, a tendency appeared suggesting that the higher the number of micronuclei assessed at 24 h post-irradiation, the larger the CTCAE grade. However, the prediction of the CTCAE grades from the residual micronuclei was not reliable, with the notable exception of grades 0 and 5 ORs (Figure 2B). In addition, Table 2 showed that the number of micronuclei assessed 24 h post-irradiation cannot discriminate grade 2 from grade 3 and grade 3 from grade 4 ORs at a high degree of significance. The mathematical law that would link the number of micronuclei assessed at 24 h post-irradiation to CTCAE grades appeared complex. Further analysis will be discussed in the next chapters.

Since a correlation between SF2 and micronuclei has been previously established, we investigated the link between these two endpoints by plotting SF2 data against micronuclei assessed at 24 h post-irradiation. Among the current mathematical laws, an exponential law appeared to provide the best fit to link SF2 and the number of micronuclei assessed 24 h post-irradiation ( $MN_{24h}$ ) (Figure 3A) (Table 1):

$$SF2 (\%) = 62.2 \exp(-0.107 \times MN_{24h}); r^2 = 0.939 \quad (2)$$

Such a mathematical law is relevant whatever the CTCAE grade and appeared also relevant for fitting data from cell lines provided from genetic syndromes associated with radiosensitivity (published data, [3,15,30,43]), supporting again the fact that radiosensitivity from genetic syndromes obeys the same mathematical laws as radiotoxicity observed in cells from RT-treated patients (Figure 3B).

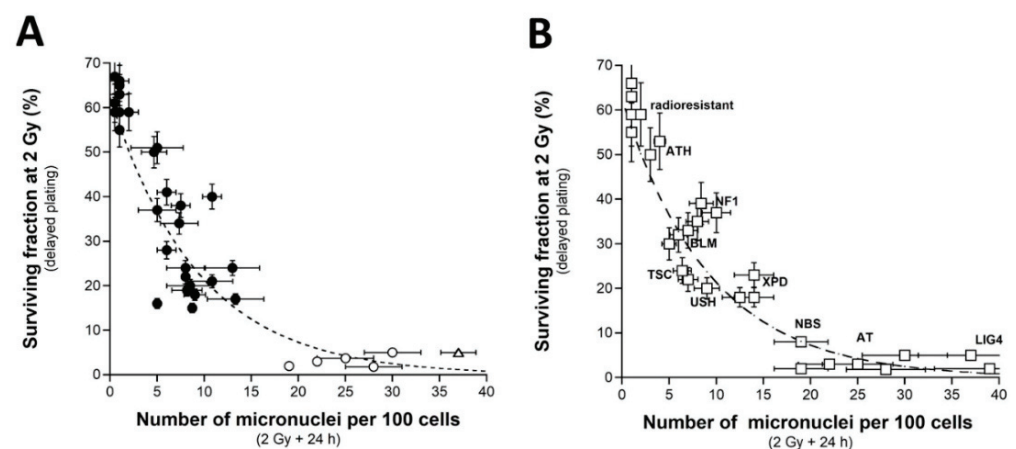


**Figure 2.** Micronuclei vs. CTCAE grades. The number of spontaneous micronuclei per 100 cells (A) or micronuclei assessed 24 h post-irradiation per 100 cells (B) from 200 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding CTCAE grade values (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated.

**Table 2.** Discrimination power of the major molecular radiosensitivity endpoints\*.

Compared CTCAE Grades	<i>p</i> Values for MN <sub>24h</sub>	<i>p</i> Values for H2AX <sub>24h</sub>	<i>p</i> Values for pATMmax
2,3 and 4	0.045	0.0115	$8.55 \times 10^{-30}$
2 and 3	0.140	0.018	$4.15 \times 10^{-6}$
3 and 4	0.055	0.017	$6.51 \times 10^{-20}$
2 and 4	0.030	0.81	$2.09 \times 10^{-24}$

\* quantified by one-way ANOVA test. See also Section 4.



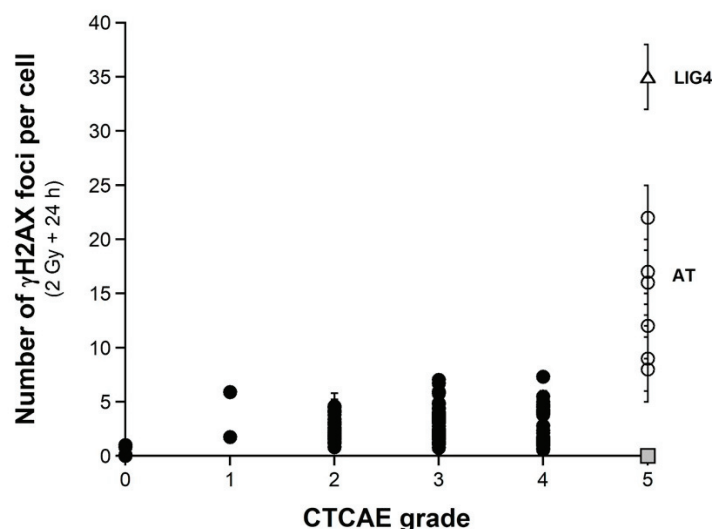
**Figure 3.** SF2 vs. micronuclei. (A) The SF2 data from 36 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding number of micronuclei per 100 cells assessed 24 h post-irradiation (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates,

at least. The best data fit was obtained with the linear law:  $SF2 (\%) = 62.2 \exp(-0.107 MN_{24h})$ ;  $r^2 = 0.939$  (dotted line). The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated. (B) The SF2 values ( $\pm$ SEM) and the corresponding numbers of micronuclei per 100 cells assessed 24 h post-irradiation ( $\pm$ SEM) from fibroblasts deriving from patients suffering from the indicated syndromes (open squares) (AT: ataxia telangiectasia, homozygous mutations of *ATM*; LIG4: homozygous mutations of *LIG4*; NBS: Nijmegen's syndrome, homozygous mutations of *NBS1*; XPD, xeroderma pigmentosum D, homozygous mutations of *XPD*; USH, Usher's syndrome, homozygous mutations of *USH*; TSC, tuberous sclerosis, heterozygous mutation of *TSC*; Bloom's syndrome, homozygous mutations of *BLM*; NF1, neurofibromatosis type 1, heterozygous mutations of neurofibromin; ATH, heterozygous mutations of *ATM*). The dotted line is the reproduction of the data fit shown in (A). The syndromes data were obtained from our lab and published elsewhere [3,15,30,43].

### 2.3. Number of H2AX Foci vs. CTCAE Grades and SF2-Micronuclei- $\gamma$ H2AX Foci Relationships

As evoked above, one of the most current ways of assessing DSBs is the immunofluorescence assay performed with the anti- $\gamma$ H2AX antibody [38,41,55–58]. However, while IR “physically” induces about 40 DSBs per Gy in all the human fibroblasts, whatever their radiosensitivity, the number of  $\gamma$ H2AX foci assessed early (10 min) after irradiation may depend on their radiosensitivity [43]. The nuclear  $\gamma$ H2AX foci have been associated with the DSBs recognized by the ATM-dependent non-homologous end-joining (NHEJ), the most predominant DSB repair and signaling pathways in human quiescent cells [38,41,55–58]. In human radioresistant quiescent fibroblast cell lines, about 40 nuclear  $\gamma$ H2AX foci per Gy per cell have been currently scored early after irradiation. This value was found similar to those deduced from other techniques assessing DSBs, which strongly supports that the anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence permits to detect the great majority of RI DSBs as far as the NHEJ pathway is predominant in the cells tested [3]. However, in radiosensitive cells, the amount of DSBs recognized by NHEJ was shown to be lower than the number of DSBs “physically” induced by IR [42,43], suggesting an impairment in the DSB recognition by NHEJ in these cells [42,43]. We, therefore, examined the number of early and residual  $\gamma$ H2AX foci in the 200 COPERNIC cells. The COPERNIC cells have been exposed to 2 Gy X-rays followed by 10 min, 1, 4 (not shown), and 24 h for repair. No significant correlation was found between spontaneous  $\gamma$ H2AX foci and CTCAE grades, in agreement with previous data [43]. The number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 24 h post-irradiation ( $H2AX_{24h}$ ) was plotted against the corresponding CTCAE grade (Figure 4). In agreement with the literature, the radioresistant controls showed the lowest  $H2AX_{24h}$  [41]. Cells from *ATM*-mutated patients did not show  $\gamma$ H2AX foci (since the phosphorylation of H2AX is strongly ATM-dependent) or, if any,  $\gamma$ H2AX foci were found very tiny and dispersed [43,59]. Hence, the number of  $\gamma$ H2AX foci in *ATM*-mutated cells can be considered either as nil (grey square in Figure 4) by defining the  $\gamma$ H2AX foci as similar to that of the other cell lines or as non-nil by taking into account the tiny  $\gamma$ H2AX foci. In the fibroblast cell line (180BR) derived from a *LIG4*-mutated patient who succumbed to RT, the  $\gamma$ H2AX foci data were found to be very specific: while the 180BR cells showed an SF2 value similar to those of the *ATM*-mutated cell lines, they elicited a number of early  $\gamma$ H2AX foci similar to that observed in radioresistant controls (which suggests a normal DSB recognition) but with a number of residual  $\gamma$ H2AX foci higher than 30 (which suggests a gross DSB repair defect). These data were found in agreement with literature that has provided a relevant interpretation of these specific radiobiological features: in fact, in 180BR cells, the recognition step is not affected by the *LIG4* mutations while the DSB repair step is strongly impaired [60–62]. All the other COPERNIC cell lines that correspond to grades 1–4 showed intermediate  $H2AX_{24h}$  [43]. As for micronuclei, there was a tendency of  $H2AX_{24h}$  to increase with the CTCAE grade. However, unlike with micronuclei, statistical analysis showed that  $H2AX_{24h}$  can discriminate between grades 2 and 3, and 3 and 4 but not between grades 2 and 4 (Table 2). Similarly for micronuclei, the mathematical law that would link  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub> with

CTCAE grades appeared complex. Further mathematical analysis will be discussed in the next chapters.



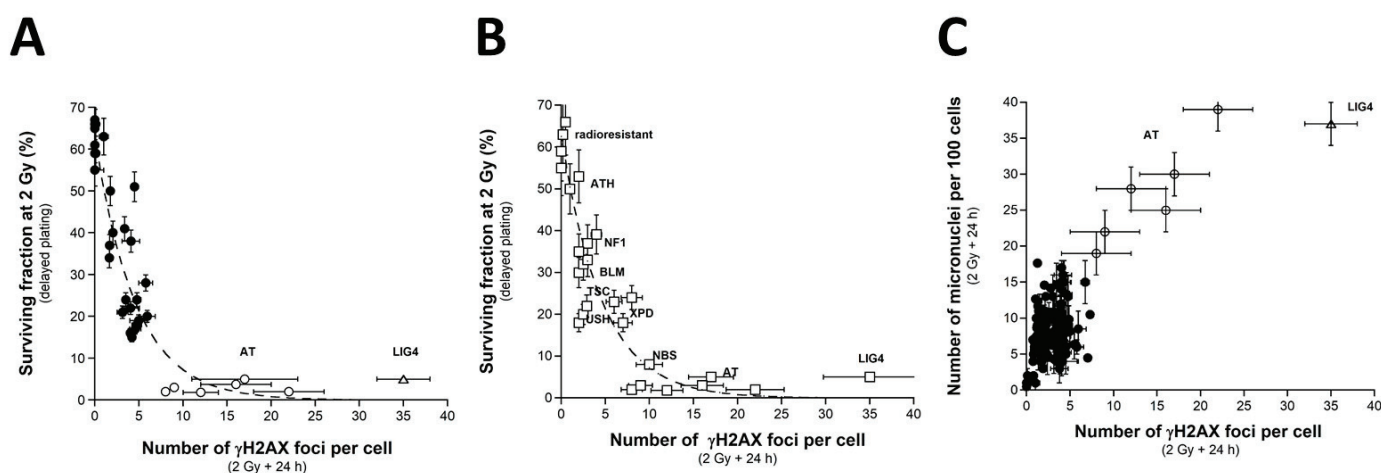
**Figure 4.**  $\gamma$ H2AX foci vs. CTCAE grades. The number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 24 h post-irradiation from 200 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding CTCAE grade values (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated. The grey square indicates all the *AT* data if considering  $\gamma$ H2AX foci in *ATM*-mutated cells as absent.

Since a correlation between SF2 and unrepaired DSBs has been established already [30], we investigated the link between these two endpoints by plotting SF2 data against  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub>. Among the current mathematical laws, an exponential function appeared to provide the best fit between SF2 and  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub> (Figure 5A) (Table 1):

$$\text{SF2 (\%)} = 62.56 \exp(-0.216 \times \gamma\text{H2AX}_{24\text{h}}); r^2 = 0.87 \quad (3)$$

Such mathematical law did not change with the pattern of the  $\gamma$ H2AX foci defined from the *ATM*-mutated cells. These data strongly suggested that the SF2 decreased with  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub>. However, for the cases showing intermediate radiosensitivity, while the corresponding SF2 values ranged from 7 to 60%,  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub> varied only from 0 to 10%. In other terms, the intermediate radiosensitivity is poorly predicted by  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub> but provides higher statistical performance than the micronuclei assay (Table 2). This mathematical law was found to be relevant to fit data from fibroblasts deriving from genetic syndromes (Figure 5B). Again, these findings support that radiotoxicity observed after RT and radiosensitivity observed in cells deriving from genetic syndromes obey similar quantitative links between cellular and molecular endpoints of radiosensitivity.

When plotted against  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub>, MN<sub>24h</sub> obeyed a linear or else a curvilinear function depending on whether the data corresponding to the *LIG4*-mutated cell line has been taken into account. Further mathematical analysis will be discussed in the next chapters. Such correlation shows that the  $\gamma$ H2AX foci and/or else micronuclei are not relevant to predict the cases corresponding to the OR with CTCAE grades ranging from 1 to 4 (Figure 5C).



**Figure 5.** SF2 vs.  $\gamma$ H2AX foci and micronuclei vs.  $\gamma$ H2AX foci (A) The SF2 data from 36 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding number of  $\gamma$ H2AX foci per cell assessed 24 h post-irradiation (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The best data fit was obtained with the linear law: SF2 (%) = 62.56 exp ( $-0.216$  H2AX<sub>24h</sub>);  $r^2 = 0.87$  (dotted line). (B) The SF2 values ( $\pm$ SEM) and the  $\gamma$ H2AX foci assessed 24 h post-irradiation ( $\pm$ SEM) from fibroblasts deriving from patients suffering from the indicated syndromes (open squares) (AT: ataxia telangiectasia, homozygous mutations of *ATM*; LIG4: homozygous mutations of *LIG4*; NBS: Nijmegen's syndrome, homozygous mutations of *NBS1*; XPD, xeroderma pigmentosum D, homozygous mutations of *XPD*; USH, Usher's syndrome, homozygous mutations of *USH*; TSC, tuberous sclerosis, heterozygous mutation of *TSC*; Bloom's syndrome, homozygous mutations of *BLM*; NF1, neurofibromatosis type 1, heterozygous mutations of neurofibromin; ATH, heterozygous mutations of *ATM*). The dotted line is the reproduction of the data fit shown in (A). The syndromes data were obtained from our lab and published elsewhere [3,15,30,43]. (C) The number of micronuclei assessed 24 h post-irradiation shown in Figure 2A (from 200 COPERNIC cell lines) was plotted against the corresponding numbers of  $\gamma$ H2AX foci per cell assessed 24 h post-irradiation shown in Figure 4. The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated.

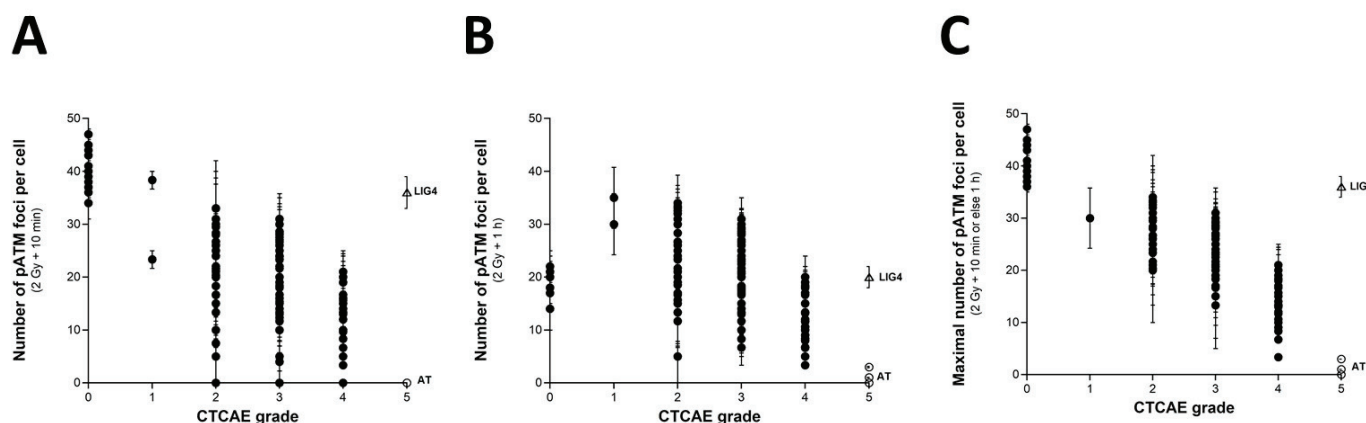
#### 2.4. Number of pATM Foci vs. CTCAE Grades and SF2-Micronuclei- $\gamma$ H2AX Foci vs. pATM Foci Relationships

As described elsewhere, and as Section 2.3 suggests, the number of RI  $\gamma$ H2AX foci scored 10 min after irradiation in the COPERNIC fibroblasts was found to be systematically lower than those of the radioresistant controls [43]. These data do not suggest that fewer DSBs were physically induced but that fewer DSBs were recognized by the ATM phosphorylation of H2AX histone at the DSB sites via NHEJ. The RIANS model is based on the assumption that any delay in the ATM nucleoshuttling is responsible for radiosensitivity and abnormal individual response [42]. IR triggers the monomerization of cytoplasmic pATM dimers. ATM monomers diffuse in the nucleus, and re-associate as dimers at the DSB sites once the DSBs are recognized [42,49]. From our historical data, an exposure to 2 Gy X-rays generally results in the formation of about 40 pATM foci per cell at 10 min post-irradiation in radioresistant fibroblast controls. In the *ATM*-mutated cells, no pATM foci were observed. The number of pATM foci, therefore, varies from about 40 to 0 [43]. Such a hypothesis was verified by plotting the pATM foci against the CTCAE. As already reported in a published paper with 117 COPERNIC cell lines [43], the 200 COPERNIC cells tested here showed a maximal number of pATM foci at 10 min or else at 1 h after 2 Gy. Hence, the maximal number of pATM foci reached at 10 min or 1 h post-irradiation, pATM<sub>max</sub>, reflects the maximal ATM kinase activity in the nucleus [43]. When plotted against the corresponding CTCAE grades, the number of pATM foci per cell assessed 10 min (Figure 6A) or 1 h (Figure 6B) post-irradiation decreased by obeying a

linear law whose correlation coefficient varied and appeared low ( $r^2 = 0.70$  and  $r^2 = 0.38$ , respectively). Interestingly, the number of pATM foci assessed at 1 h post-irradiation in radioresistant controls were found systematically lower than the 10 min data values and, than those of the other COPERNIC cells, suggesting that DSB repair was already efficient at this post-irradiation time (Figure 6A,B). Furthermore, the dispersion of pATM data for both conditions appeared too large to discriminate data in the CTCAE grade 2 to 4 range (Figure 6 A,B). Such findings reflect the differences in the kinetics of the nuclear ATM kinase activity that may exist in human cells. Hence, pATM data assessed either at 10 min or else 1 h post-irradiation cannot predict CTCAE grades reliably. By contrast, by plotting pATMmax with the corresponding CTCAE grade data, a linear function of the grade associated with a good discrimination of CTCAE grades appeared (Figure 6C) (Table 1):

$$\text{pATMmax (grade)} = 41.72 - 6.78 \times \text{grade}; r^2 = 0.74 \quad (4)$$

Interestingly, such a mathematical formula suggests that decreasing every 6.78 aly pATM foci per cell increment leads to a decrease in one additional CTCAE grade (Figure 6C). Such conclusions did not significantly depend on whether the *LIG4*-mutated cell data are integrated or not in the calculations.



**Figure 6.**  $\gamma$ H2AX foci vs. CTCAE grades. The number of pATM foci per cell assessed 10 min (A) or 1 h (B) post-irradiation from 200 COPERNIC cell lines was plotted against the corresponding CTCAE grade values (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 3 independent triplicates, at least. (C) The maximal number of pATM foci per cell among the 10 min and 1h data shown in panels (A,B) was plotted against the corresponding CTCAE grade values (closed circles). The best data fit was obtained with the linear law:  $\text{pATMmax (grade)} = 41.72 - 6.78 \times \text{grade}$  ( $r^2 = 0.74$ ) (dotted line). The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated.

It must be stressed that, among the molecular endpoints tested here, the pATMmax provided the best discrimination of the CTCAE grades (Table 2).

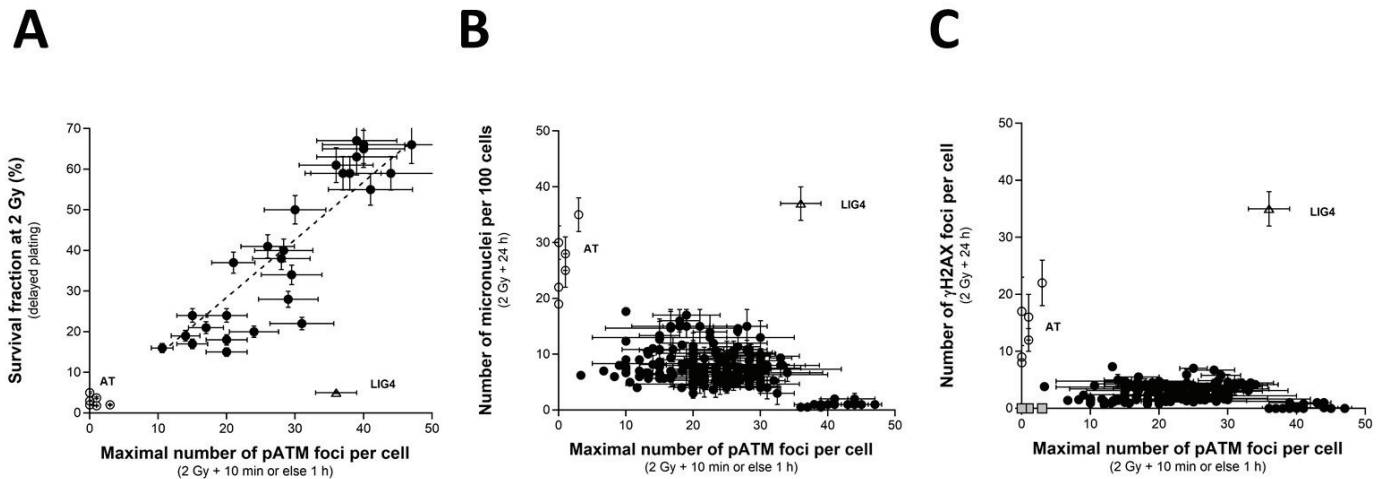
When SF2 values are plotted against the corresponding pATMmax values, a linear correlation appeared between the two endpoints (Figure 7A) (Table 1):

$$\text{SF2 (pATMmax)} = 1.422 \times \text{pATMmax}; r^2 = 0.87 \quad (5)$$

Such a linear correlation was found consistent with the fact that both SF2 and pATMmax elicited a linear correlation with CTCAE grades. The value of the coefficient of proportionality will be discussed in the next chapters.

Lastly, by plotting the pATMmax with  $\text{MN}_{24\text{h}}$  or else  $\text{H2AX}_{24\text{h}}$ , it appeared that the higher the pATMmax, the lower the  $\text{MN}_{24\text{h}}$ , and the lower the  $\text{H2AX}_{24\text{h}}$ , in coherence with the existence of a linear or a curvilinear law between these last two endpoints (see above chapters) (Figure 7B,C). Again, these last findings showed that data can be discriminated

into three distinct categories: the radioresistant cell lines (corresponding to CTCAE grade 0), the hyper-radiosensitive cell lines (corresponding to CTCAE grade 5), and the cell lines showing an intermediate radiosensitivity (corresponding to CTCAE grades 1–4). The case of the unique *LIG4*-mutated cell lines can be considered as a fourth category.



**Figure 7.** SF2 vs. pATMmax, pATmax vs. MN<sub>24h</sub> and pATMmax vs. H2AX<sub>24h</sub> relationships. (A) The SF2 data from 36 COPERNIC cell lines were plotted against the corresponding number of  $\gamma$ H2AX foci per cell assessed 24 h post-irradiation (closed circles). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The best data fit was obtained with the linear law: SF2 (pATMmax) = 1.422  $\times$  pATMmax;  $r^2 = 0.87$  (dotted line). (B) The pATMmax from 200 COPERNIC cells were plotted against the corresponding number of micronuclei assessed 24 h post-irradiation (B) or the corresponding number of micronuclei assessed 24 h post-irradiation (C) Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent triplicates, at least. The grey square indicates all the AT data if considering  $\gamma$ H2AX foci in *ATM*-mutated cells as absent. The points corresponding to the *ATM*- (open circles) and the *LIG4*- (open triangles) mutated cell lines are indicated.

2.5. A Global Inter-Correlations System with the Major Radiosensitivity Endpoints

Altogether, our findings confirm the existence of multiple correlations between the major radiosensitivity endpoints, namely the CTCAE grades, SF2, MN<sub>24h</sub>, H2AX<sub>24h</sub>, and pATMmax. If we define max(SF2), min(SF2), and  $\Delta$ SF2 as the maximal SF2 reflecting the highest radioresistance, the highest radiosensitivity observed in human fibroblasts, and the difference between max(SF2) and min(SF2), respectively:

Formula (1) suggests that:

$$SF2(\text{grade}) = \max(SF2) - \frac{\Delta SF2}{5} \text{grade} \tag{6}$$

Formula (6) suggests a solution of the following differential equation:

$$\frac{dSF2(\text{grade})}{d\text{grade}} = -k_0 \tag{7}$$

in which:

$$k_0 = \frac{\Delta SF2}{5} \tag{8}$$

If we define max(MN<sub>24h</sub>) as the maximal MN<sub>24h</sub> value:

Formula (2) suggests that:

$$SF2(MN_{24h}) = \max(SF2)e^{-k_1 MN_{24h}} \tag{9}$$

in which:

$$k_1 = \ln(\max(\text{SF2})/\min(\text{SF2}))/\max(\text{MN}_{24\text{h}}) \quad (10)$$

Formula (9) is the solution of the following differential equation:

$$\frac{d\text{SF2}(\text{MN}_{24\text{h}})}{d\text{MN}_{24\text{h}}} = -k_1 \text{SF2} \quad (11)$$

If we define  $\max(\text{H2AX}_{24\text{h}})$  as the maximal  $\text{H2AX}_{24\text{h}}$ :  
Formula (3) suggests that:

$$\text{SF2}(\text{H2AX}_{24\text{h}}) = \max(\text{SF2})e^{-k_2 \text{H2AX}_{24\text{h}}} \quad (12)$$

in which:

$$k_2 = \ln(\max(\text{SF2})/\min(\text{SF2}))/\max(\text{H2AX}_{24\text{h}}) \quad (13)$$

Formula (12) is the solution of the following differential equation:

$$\frac{d\text{SF2}(\text{H2AX}_{24\text{h}})}{d\text{H2AX}_{24\text{h}}} = -k_2 \text{SF2} \quad (14)$$

If we define  $\max(\text{pATMmax})$ ,  $\min(\text{pATMmax})$ , and  $\Delta\text{pATMmax}$  as the highest, the lowest values taken among the  $\text{pATMmax}$ , and the difference between  $\max(\text{pATMmax})$  and  $\min(\text{pATMmax})$ , respectively (i.e., corresponding to the radioresistant controls), Formula (3) suggests that:

$$\text{pATMmax}(\text{grade}) = \max(\text{pATMmax}) - \frac{\Delta\text{pATMmax}}{5}\text{grade} \quad (15)$$

Formula (15) suggests the following differential equation:

$$\frac{d\text{pATMmax}(\text{grade})}{d\text{grade}} = -k_3 \quad (16)$$

in which:

$$k_3 = \frac{\Delta\text{pATMmax}}{5} \quad (17)$$

Formula (5) suggests that:

$$\text{SF2}(\text{pATMmax}) = k_4 \times \text{pATMmax} \quad (18)$$

in which:

$$k_4 = \max(\text{SF2})/\max(\text{pATMmax}) \quad (19)$$

Formula (18) is the solution of the following differential equation:

$$\frac{d\text{SF2}(\text{pATMmax})}{d\text{pATmax}} = k_4 \quad (20)$$

It is noteworthy that Formulas (6), (9), (12) and (15) provide:

$$\text{MN}_{24\text{h}}(\text{grade}) = \ln\left(\frac{1}{-k_0 \text{grade}}\right)^{1/k_1} \quad (21)$$

$$\text{H2AX}_{24\text{h}}(\text{grade}) = \ln\left(\frac{1}{-k_0 \text{grade}}\right)^{1/k_2} \quad (22)$$

$$\text{MN}_{24\text{h}}(\text{H2AX}_{24\text{h}}) = \frac{k_2}{k_1} \text{H2AX}_{24\text{h}} \quad (23)$$



$$pATM_{max}(MN_{24h}) = \frac{\max(SF2)}{k_4} e^{-k_1 MN_{24h}} \quad (24)$$

$$pATM_{max}(H2AX_{24h}) = \frac{\max(SF2)}{k_4} e^{-k_2 H2AX_{24h}} \quad (25)$$

Interestingly, all of Formula (11) is in agreement with the shape of the data shown in Figures 2B, 4, 5C and 7B,C.

Altogether, these formulas suggest the following global system:

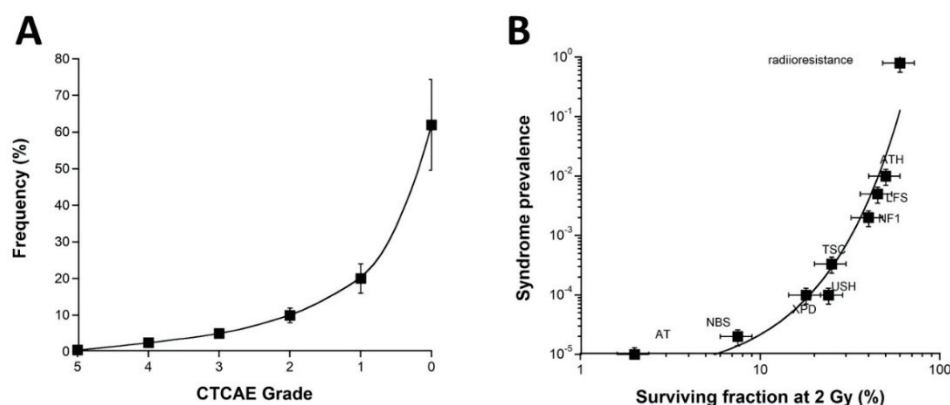
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dSF2(\text{grade})}{d\text{grade}} = -k_0 \\ \frac{dSF2(MN_{24h})}{dMN_{24h}} = -k_1 SF2 \\ \frac{dSF2(H2AX_{24h})}{dH2AX_{24h}} = -k_2 SF2 \\ \frac{d(pATM_{max})}{d\text{grade}} = -k_3 \\ \frac{dSF2(pATM_{max})}{dpATM_{max}} = k_4 \end{array} \right. \quad (26)$$

### 3. Discussion

#### 3.1. The Prediction of OR, a Clinical, Technological, Economical, and Legal Issue

In RT, the dose delivered to the tumor is often a compromise between two antagonistic goals: to reach the maximal anti-tumor efficiency and to limit the occurrence and the severity of OR in the locoregional tissues [6,7]. Indeed, OR can alter the patient quality of life during the treatment [8] and even up to several years [9,10]. The occurrence of OR during treatment may also threaten the compliance to RT by not exposing the patient to the full prescribed dose. Before the end of RT, ORs can modify the anatomy of the organs surrounding the target (by generating weight loss during a head and neck treatment for example) and thus lead to a modified dosimetry—inasmuch as tumor volume reduction can modify target dosimetry [63]. If new RT techniques, such as intensity-modulated RT (IMRT), stereotactic RT with CyberKnife irradiators, protontherapy, or hadrontherapy, tend to improve the risk–benefit balance with a better dose conformation to the target volume, none of them allow for RT without risk for patients [64,65]. Besides, new techniques are not even always superior to reducing ORs [64,66,67]. Above all, according to recent data, it is also noteworthy that ORs may be underestimated by clinicians [68].

In parallel, it must be stressed that ORs with CTCAE grades 2–5 represent a significant but small subset of post-RT events generally evaluated to about 5 to 20% of patients [3]. Furthermore, the CTCAE grade-distribution of ORs may show a semi-gaussian shape with subsets of CTCAE grades 0, 1, 2, 3, 4, and 5, representing, from previous COPERNIC data and in agreement with the literature [43], about 65, 17, 10, 5, 2.5, and 0.5% of RT-treated patients (with a relative error of about 20% each), respectively. Besides, such estimation strongly depends on whether the CTCAE grade 1 ORs are still considered as tissue reactions without significant clinical consequence or as radiosensitivity reactions. Furthermore, such grade distribution strongly depends on the RT modality and the type of tumor to be treated. The fatal reactions remain very exceptional and are likely due to a genetic predisposition to hyper-radiosensitivity similarly to for *ATM* and *LIG4* mutations [3,15]. Interestingly, the frequency of genetic syndromes as a function of the radiosensitivity level (SF2) reported previously [15] obeys a similar shape to the CTCAE grade distribution of ORs (Figure 8).



**Figure 8.** (A) Frequency of the OR as a function of the CTCAE grades. These data were established from the COPERNIC collection ([43] and N.F. personal communication). (A) A 20% relative error was applied to all the data. The best data fit was obtained with an exponential law. (B) Prevalence of the indicated genetic syndromes associated with radiosensitivity as a function of SF2 data [43]. These data have been published in a previous report in another form. Error bars were built on the basis of 20% relative error for SF2 and prevalence, respectively. (AT: ataxia telangiectasia, homozygous mutations of *ATM*; NBS: Nijmegen’s syndrome, homozygous mutations of *NBS1*; XPD, xeroderma pigmentosum D, homozygous mutations of *XPD*; USH, Usher’s syndrome, homozygous mutations of *USH*; TSC, tuberous sclerosis, heterozygous mutation of *TSC*; NF1, neurofibromatosis type 1, heterozygous mutations of neurofibromin; LF2, Li-Fraumeni’s syndrome, heterozygous mutations of *p53*; ATH, heterozygous mutations of *ATM*). The best data fit was obtained with an exponential law.

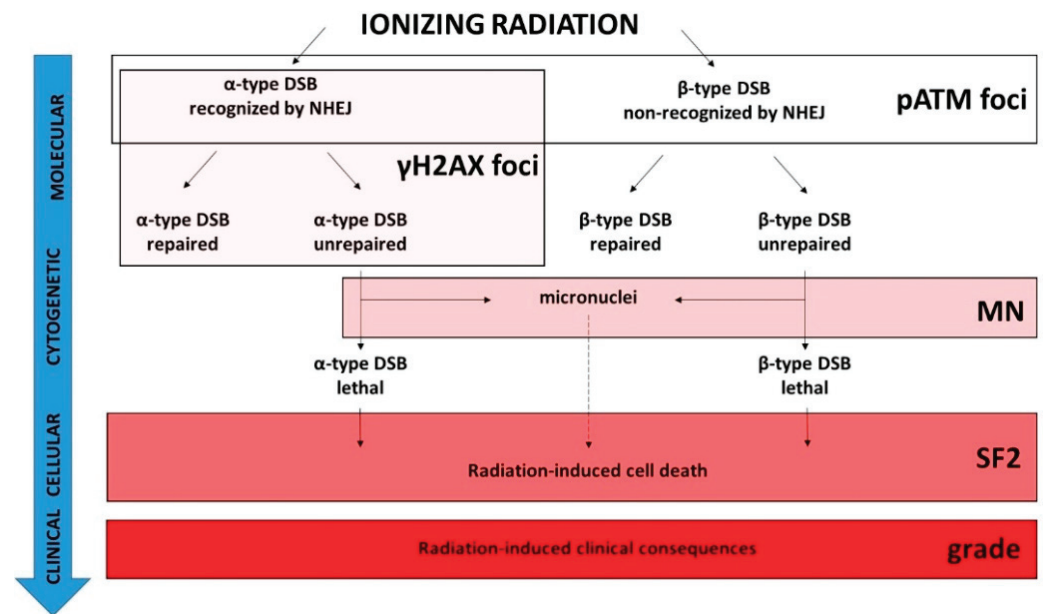
Such a statement strengthens again the fact that the clinical, cellular, and biostatistical features of the radiotoxicity observed in RT are similar to those of the radiosensitivity observed with genetic diseases. Another important consequence of such a statement is that the CTCAE grade distribution may introduce some biases in the analysis of the data from clinical studies. Indeed, since severe ORs remain exceptional, the prospective studies may be based on cohorts of RT-treated patients with a majority of radioresistant patients and a minority of radiosensitive ones. Consequently, in this case, the statistical robustness of any predictive assay may be overestimated for the lowest grades and underestimated for the highest ones. Conversely, the retrospective studies can be based on a specific distribution of the cohorts: hence, the best compromise would be to obtain the same number of cases for each CTCAE grade to ensure an OR prediction that would not be dependent on the severity grade of the OR [3]. Further investigations are needed to optimize the methodology and all these statistical constraints.

### 3.2. The Diverse Predictive Assays and Their Associated Endpoints

There is a large body of evidence that ORs are the clinical consequences of RI cell death [3,6,16,17]. The clonogenic survival assay, first developed in 1956 by Puck and Markus, is the current measurement of RI death in vitro [69,70]. In 1981, a quantitative correlation between tumor radio responsiveness (quantified in vivo by using tumor local control as an endpoint) and cellular radiosensitivity (quantified in vitro by using SF2 as an endpoint) was pointed out for the first time, validating the clonogenic cell survival assay as the most reliable predictive assay of anti-tumor efficiency of the RT [24]. The clonogenic cell survival assay has been also applied to a number of non-tumor cellular models, notably lymphoblasts and fibroblasts [26,27,71]; in 1975, Taylor et al. pointed out, for the first time with the clonogenic cell survival assay, the extreme radiosensitivity associated with ataxia telangiectasia (*ATM* mutations) [45]. After this discovery, a considerable number of studies have reported the radiobiological characterization of various genetic syndromes which permits to propose, to date, a complete view of human radiosensitivity [22,52–54,72–76]. Conversely, with regard to the radiobiological characterization of cells provided from OR patients, there are a few reports about the link between clonogenic cell survival data and

the CTCAE grade. For example, Pouliliou et al. (2015) investigated SF2 in peripheral blood lymphocytes from RT-treated patients. However, the corresponding CTCAE grades of this study were grouped into three categories of grades of early reactions (0, 1, and 2 + 3) [77]. To our knowledge, no report with SF2 has involved the full range of CTCAE grades like our work published in 2016 [43] and this present study. Lastly, it must be stressed that the range of SF2 observed in cells from OR patients is similar to that observed in cells from patients suffering from genetic syndromes, which demonstrates that the two phenomena are similar. Besides, all the young *ATM*- or *LIG4*-mutated patients suffering from hyper-radiosensitivity and treated with RT succumbed by eliciting CTCAE grade 5 ORs [45,60,78–80]. To date, the clonogenic cell survival assay as a predictive assay for OR occurrence and severity has been abandoned because it is based on a long procedure of cell culture: (1) the plating efficiency of each cell line tested must be determined with precision by seeding a series of numbers of non-irradiated cells and scoring the resulting colonies that generally appear in 7 to 14 days; (2) in order to avoid the feeder effects, the concentration of cells giving the highest plating efficiency is then deduced; (3) a series of numbers of irradiated cells are seeded and the resulting colonies and fractions of cell survival are calculated. Hence, the clonogenic cell survival protocol requires some weeks, which means its routine clinical application is very complex [70].

The clonogenic cell survival accounts for the whole RI cell death and is not specific to a particular cell death pathway (Figure 9). The major RI cell deaths are mitotic death, senescence, and apoptosis [3]. Mitotic death is predominant in cells that can proliferate, whether that be fibroblasts or lymphocytes. Micronuclei are one of the current endpoints reflecting mitotic death and they have been observed when NHEJ or any other DSB repair pathways (like homologous recombination) were impaired, suggesting that micronuclei do not occur only when NHEJ is faulty [3,51] (Figure 9). Furthermore, the occurrence of a micronucleus requires not only unrepaired DNA breaks but, overall, a bypass of G2/M arrest. However, radiosensitivity may be independent of the G2/M arrest status [15]. For example, the ratio between unrepaired breaks and micronuclei may drastically differ between cells from aging syndromes (generally arrested in G0/G1) and cells from cancer syndromes (generally impaired in G2/M arrest) [15]. Together with clonogenic assays, cytogenetic assays, similarly to the micronuclei assay, were initially based on the staining techniques like Giemsa and require metaphases and therefore a significant period of time to reach new cell cycle phases [28]. Hence, the most current protocol for scoring micronuclei is based on the cytokinesis block with cytochalasin B that accelerates the passage in the G2/M phase. However, this step may introduce bias by mixing the capacity of cells to pass G2/M (and therefore by artificially increasing the micronuclei production rate) with the dose-dependent ratio between micronuclei and unrepaired chromosome breaks [28,81–83]. To overcome such bias, the micronuclei assay protocol applied in the present study did not involve any artificial block cells in G2/M but followed the same protocol as that applied in  $\gamma$ H2AX and pATM immunofluorescence to better facilitate data inter-comparisons (see materials and methods). A high number of unrepaired chromosome breaks (and therefore micronuclei) has been shown to characterize many radiosensitive genetic syndromes [34,83–85]. Conversely, the great majority of studies failed to confirm the applicability of the micronuclei assay to predict OR for RT-treated patients [83]. Furthermore, to our knowledge, no report has investigated the relationships between yields of micronuclei and a large range of CTCAE grades. This short review is consistent with the fact that the micronuclei assay is unable to discriminate the CTCAE grades 1 to 4 ORs reliably. The fact that Cornforth and Bedford demonstrated that one unrepaired chromosome break corresponds to one lethal event for non-transformed human fibroblasts does not contradict the general tendency observed in the present study (*the higher the number of micronuclei, the higher the radiosensitivity, the more severe the OR*) but illustrates well that the ratio between unrepaired DSB and micronuclei may differ among the human cell lines according to their radiosensitivity status and their capacity to bypass the G2/M arrest [15,34].



**Figure 9.** Schematic view of the molecular, cytogenetic, cellular, and clinical consequences of exposure to IR and the validity domain of the major radiosensitivity endpoints. IR induces two types of DSB. The  $\alpha$ -type DSBs are recognized by the NHEJ DSB repair pathway while the  $\beta$ -type DSBs are not [49]. For each type of DSB, there are some subsets of unrepaired DSB [49]. Among them, some may be unreparable and contribute to the lethal effect. Some unrepaired DSBs may also provide micronuclei according to the radiosensitivity status and the capacity of irradiated cells to bypass the G2/M arrest [15]. The pATM foci biomarker detects the DSBs recognized by NHEJ, and the DSBs non-recognized by NHEJ or recognized by another DSB repair pathway can be deduced from the induction rate of DSBs “physically” induced by IR. The  $\gamma$ H2AX foci biomarker detects the  $\alpha$ -type DSBs only. Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -type unrepaired DSBs may provide some micronuclei, but the ratio between unrepaired DSBs and micronuclei is not necessarily equal to 1. Some subsets of micronuclei can contribute to the lethal effect. SF2 reflects all the RI cell deaths and therefore reflects the whole cellular response to IR independently of the DSB repair pathways involved. The dashed line indicates that the link is different from a one-to-one correlation.

In coherence with the causal links between SF2, micronuclei, and unrepaired DSBs, there is a plethora of studies aiming to characterize radiosensitivity with DSB repair assays [3,15,36,37]. In the 1990s, radiobiologists focused on the yield of unrepaired DSBs as a potential radiosensitivity predictor by using notably pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), comet, and immunofluorescence techniques [12,36]. The major advantage of DSB repair assays based on the assessment of RI DNA fragmentation like PFGE, elution, or sucrose sedimentation is that they provide data independent of any specific DSB repair pathway. Conversely, their major inconvenience is that they require very high doses (often non-biologically relevant) to allow the DNA breaks to be detectable, which raises the question of the dose-dependence of the DSB repair rate when assessed by these techniques [3]. By contrast, the  $\gamma$ H2AX immunofluorescence assay requires the same dose range as those applied in RT, clonogenic cell survival, and micronuclei assays. However, does each nuclear  $\gamma$ H2AX foci correspond to one DSB, whatever the cell lines, their radiosensitivity status, and the irradiation conditions? As evoked in Section 2.3, the formation of  $\gamma$ H2AX foci is ATM-dependent and represents a major early step of NHEJ. The number of  $\gamma$ H2AX foci assessed per Gy early after irradiation is similar to the number of DSBs induced per Gy by using PFGE [38,41,55–58]. However, such an observation has been performed with the radioresistant quiescent human cells and with the *LIG4*-mutated cell lines that show normal ATM kinase activity [42,43]. Conversely, in radiosensitive cells that show impaired ATM kinase activity, the number of early  $\gamma$ H2AX foci was shown to be lower than the number of

DSBs “physically” induced by IR, suggesting an impairment in DSB recognition by NHEJ in these cells [42,43]. Hence, the  $\gamma$ H2AX foci represent a limited subset of all the RI DSBs: the DSBs recognized by NHEJ only. Consequently, the residual (or persistent)  $\gamma$ H2AX foci observed 24 h post-irradiation do not necessarily represent all the DSBs that contribute to the RI lethal effect (Figure 9). The RIANS model has integrated two types of RI and lethal DSBs [49]: (1) the  $\alpha$ -type DSBs, recognized by the ATM monomers in the nucleus (therefore by NHEJ) early after irradiation (presence of  $\gamma$ H2AX foci). Some of them may remain unreparable and contribute to the RI lethal effect (persistent  $\gamma$ H2AX foci). Their number was demonstrated to be proportional to the dose [49]; (2) the  $\beta$ -type DSB, not recognized by the ATM monomers in the nucleus (therefore not managed by NHEJ) because of a delay or an absence of the RIANS. Some of them may remain unreparable and contribute to the RI lethal effect. However, these DSBs are not visible by using  $\gamma$ H2AX immunofluorescence. Their number was demonstrated to be proportional to the square of the dose [49]. As a result, the number of all these lethal DSBs is the same as the linear-quadratic expression found in the LQ model [49] (Figure 9). Besides, such a definition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -type DSBs is also consistent with the radiobiological features of the unique *LIG4*-mutated 180BR cell line.

How does one explain the pATM data and their prediction power? As evoked in Sections 2.3 and 2.4, the fact that less early  $\gamma$ H2AX foci were observed in the radiosensitive COPERNIC cells does not suggest that fewer DSBs are induced “physically” in these cells but, rather than fewer DSBs are recognized by the ATM-dependent phosphorylation of H2AX, consistently with lower nuclear ATM kinase activity, caused by a delay in the RIANS [43]. In a previous report, with 117 COPERNIC cell lines, the correlation between pATMmax, and the CTCAE grade was found to be significant (concordance coefficient:  $p = 0.86$ ) [43]. By adding here 83 additional COPERNIC fibroblasts, the statistical robustness of the correlation between pATMmax and the CTCAE grade was confirmed (Figure 6). To our knowledge, there is no equivalent of such correlation in the literature with the complete range of CTCAE grades. Logically, by considering a binary approach, i.e., by gathering OR of grades 0, 1, and 2 in one category and grades 3, 4, and 5 in another category, the superiority of pATMmax and SF2 in the prediction of ORs was also found to be enhanced, in agreement with previous reports [43,47,48] (Table 3). Since our group particularly focuses on the RIANS model, there is no equivalent of SF2-pATMmax, MN<sub>24h</sub>-pATMmax, and  $\gamma$ H2AX<sub>24h</sub>-pATMmax correlation in the literature either. Our findings strongly suggest that, with SF2, pATMmax appears to be the most powerful predictor of the CTCAE grade ORs.

**Table 3.** Discrimination power of the major molecular radiosensitivity endpoints in a binary approach \*.

<i>p</i> Values for SF2	<i>p</i> Values for MN <sub>24h</sub>	<i>p</i> Values for H2AX <sub>24h</sub>	<i>p</i> Values for pATMmax
$1.90 \times 10^{-12}$	$1.52 \times 10^{-6}$	$1.51 \times 10^{-4}$	$9.91 \times 10^{-20}$

\* Patients were divided into two groups, radioresistant (CTCAE scores of 0, 1, and 2) and radiosensitive (CTCAE scores of 3, 4, and 5). A One-Way ANOVA test was performed to assess the discrimination power of each molecular endpoint.

The conclusion that both SF2 and pATMmax appear to be the best predictors of ORs has been reached but not simply because a linear function has been found between these endpoints and the CTCAE grades. Some correlation coefficients may be higher with other mathematical laws and other endpoints. The high prediction power of the pATMmax endpoint is based on the fact that the pATM foci account for all the DSBs managed by NHEJ and that the number of the DSBs managed by other DSB repair pathways, if any, can be easily estimated from the well-documented DSB induction rate of about 40 DSBs per Gy per human untransformed fibroblast [42]. Hence, by integrating all the RI DSBs that may potentially contribute to the lethal effect, independently of any DSB repair pathway involved or impaired, both SF2 and pATMmax provide a more exact view of the radiobiological response of human cells. The other endpoints (micronuclei and  $\gamma$ H2AX foci) reflect only a limited subset of the RI DSBs (Figure 9). In addition to this explanation, it

must be also stressed that both SF2 and pATMmax vary in ranges ([3–62%] and [0–42 pATM foci], respectively) larger than those of the other endpoints tested. Hence, the different levels of cellular and molecular response to IR can be better discriminated with SF2 and pATMmax [3,42].

### 3.3. The Detection of Radiosensitivity, a Unique Multiparametric System?

The mathematical approach applied in this study consisted in:

- considering that some causal or partially causal link documented by the literature exists between each of the endpoints tested.
- the nature of such links can be reflected by a specific mathematical link between each of the endpoints tested.
- the data-fitting analysis was conducted with some current mathematical laws (linear, curvilinear, exponential, and power functions). Hence, some other (but more complex) mathematical laws can be tested in further investigations.
- we have considered that the best data fit was the solution of a differential equation linking two endpoints.
- the k-coefficient, the type, and the order of each differential equation found were hypothesized to reflect the complexity of the link between the two endpoints considered.

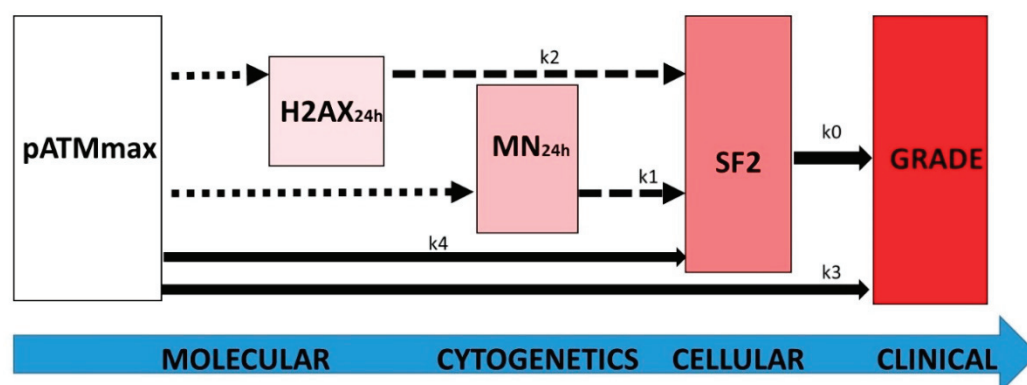
The differential equations described in the last sections of the Results chapter may suggest Michaelis–Menten equations. However, the CTCAE grades, the cell survival (SF2), the number of micronuclei, and the number of  $\gamma$ H2AX and pATM foci do not represent the same scale (cell, chromosome, DNA, and proteins, respectively) and these endpoints cannot be considered as interplaying substrates: consequently, the theory of enzymatic kinetics is not applicable here.

Conversely, the biological features and specificities of each endpoint tested (summarized in Figure 9) and their mathematical constraints may lead to the following interpretations that illustrate the direct (linear) and indirect or incomplete (non-linear) links between the endpoints tested (Figure 10):

- the k0 coefficient represents the direct link between the RI cellular death (SF2) and the clinical OR (grade). It illustrates that any clonogenic cell death corresponds to an RI tissue event. The mathematical constraints are simple: the k0 coefficient only depends on the maximal range of the scale (i.e., six grades and therefore five inter-grade intervals for CTCAE) and the range of SF2 (i.e.,  $\Delta$ SF2) (see Formula (8). Quantitatively, decreasing every 11.72% cell survival increment leads to a decrease in one CTCAE grade.
- the k3 coefficient represents the direct link between the maximal nuclear RI ATM kinase activity (pATMmax) and the clinical OR (grade). It illustrates the fact that the pATM foci lacking (due to the non-recognition of DSBs by NHEJ or by another DSB repair pathway) directly represent a subset proportional to the number of lethal DSBs responsible for an RI tissue event. As for k0, the k3 coefficient only depends on the maximal range of the scale (i.e., six grades and therefore five inter-grade intervals for CTCAE) and the range of pATMmax (i.e.,  $\Delta$ pATMmax) (see Formula (17). Quantitatively, decreasing every 6.78 pATM foci per cell increment leads to a decrease of one CTCAE grade.
- the k4 coefficient supports that the maximal nuclear ATM kinase activity (pATMmax) directly conditions cell survival: the higher the pATMmax, the higher the SF2. As specified above, pATMmax reflects the maximal nuclear RI ATM kinase activity. By combining Formulas (6) and (15), the k4 coefficient appears to directly depend on k0, k3, max(SF2), and max(pATMmax). Quantitatively, decreasing every 6.78 early pATM foci per cell increment leads to a decrease of 11.72% cell survival.
- the k2 coefficient represents the number of DSBs that contribute to the RI lethal event among the unrepaired DSBs reflected by persistent  $\gamma$ H2AX foci (i.e., recognized by NHEJ) (Figure 9). Since  $k_2 = 0.21$ , our findings suggest that about one event per five unrepaired DSBs recognized by NHEJ may be lethal. Such interpretation leads to the

notion of the tolerance of DSBs: some unrepaired DSBs may be not lethal, which is in agreement with previous reports and the current observation that some cells can elicit a significant number of spontaneous DSBs without impacting on their capacity of repair [30,43]. It is noteworthy that Formula (22), deduced from the other formulas, fits well when the  $H2AX_{24h}$  data are plotted against the CTCAE grades (Figure 4).

- the  $k_1$  coefficient represents the number of micronuclei per 100 cells that contribute to the RI lethal event among all the micronuclei detected. Since  $k_1 = 0.107$ , our findings suggest that about 1 per about 10 micronuclei observed per 100 cells is lethal. As for  $H2AX_{24h}$ , such interpretation also leads to the notion that some micronuclei may not contribute to the RI lethal event, maybe by enhancing the transformation (misrepair) of the cells [30,43]. It is noteworthy that Formula (21), deduced from the other formulas, fits well when the  $MN_{24h}$  data are plotted against the CTCAE grades (Figure 3). Interestingly, the link between  $MN_{24h}$  and  $H2AX_{24h}$ , illustrated by Formula (23), suggests that there is a constant subset of unrepaired DSBs reflected by  $\gamma H2AX$  foci that leads to the formation of micronuclei. According to Formula (23), this rate suggests that all the unrepaired DSBs recognized by NHEJ do not lead to the formation of micronuclei.



**Figure 10.** Schematic view of the link between the major radiosensitivity endpoints with the  $k$  coefficients of the differential equations described at the end of the Results chapter. The dotted, dashed, and full-line arrows represent complex, exponential, and linear laws, respectively.

Interestingly, the resulting equations system linking the major radiosensitivity endpoints described by Formula (26) may be also relevant for all mammalian cells, especially for rodent models. Indeed, the  $k$  coefficients linking the SF2,  $MN_{24h}$ ,  $H2AX_{24h}$ , and pATMmax endpoints were shown to depend on their maximal and minimal values. It must be stressed that the most radioresistant and the most radiosensitive rodent cellular models show similar bounded values as those observed in humans. For example, SF2 is generally limited to 1 to 80% in mammals. This is also the case for the yields of residual micronuclei and unrepaired DSB yields [40].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Fibroblast Cell Lines

All of the experiments were performed with untransformed skin fibroblast cells in the plateau phase of growth under standard culture conditions described elsewhere [43,54]. Skin biopsies sampling was performed in unirradiated areas (generally under the forearm) after local anesthesia, similarly to standardized dermatologic punch. All the anonymous patients were informed and gave signed consent according to the ethics recommendations. Clinical data on tumor characteristics and therapy regimens were extracted from the medical records. The OR severity was graded by two independent clinicians according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.03. Only OR patients with consensual clinical grading were included in this study. Both early and

late reactions were considered. Cancer patients suffered from breast, prostate, nose ear throat, lymphoma, nervous system (central and peripheral), lung, anal canal, pediatrics, cervix, sarcoma, skin, testis, bone, rectum, and esophagus cancer. In order to avoid bias, no tumor type subset represented more than 40% of the collection. There was no correlation between the CTCAE grade and age, sex, regimen, or total cumulated dose of the treatment. All the sampling procedures were done in the frame of the experimental protocol of the "COPERNIC" collection, approved by the national ethical committee in agreement with the current national regulations about the clinical studies. The resulting fibroblast cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437, and DC2021-3957 to the Ministry of Research. This study involved 200 COPERNIC fibroblast cell lines, including:

- A total of 117 COPERNIC cell lines already described in a published report. This subset is composed of 12 radioresistant, 4 ATM-mutated, and 1 LIG4-mutated gifted cell lines and the 100 first registered cell lines of the COPERNIC collection derived from RT-treated patients who showed grades 1–4 CTCAE ORs. The Radiobiological Database of this subset is protected under the reference IDDN.FR.001.510017.000.D.P2014.000.10300
- A total of 82 additional COPERNIC cell lines. This subset is composed of 2 additional radioresistant, 2 ATM-mutated cell lines, and 78 cell lines of the COPERNIC collection derived from RT-treated patients who showed grades 1–4 CTCAE ORs that were chosen randomly in a subset of 150 available ones. The protection procedure of the radiobiological database of this subset is in progress.

#### 4.2. X-rays Irradiation

Irradiations were performed with a 6 MeV X-ray medical irradiator (SL 15 Philips) (dose-rate:  $6 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ ) at the anti-cancer Centre Léon-Bérard (Lyon, France) [43,86]. In all the experiments, a dose of 2 Gy was chosen because it simulates a current dose per session in a standard radiotherapy. The dosimetry was certified by radiophysicists of the Centre Léon-Bérard.

#### 4.3. Clonogenic Cell Survival

The intrinsic cellular radiosensitivity was quantified from clonogenic cell survival data obtained from standard delayed plating procedures that were described elsewhere [24]. Cells in the plateau phase of growth were irradiated at the indicated doses, incubated for 24 h at 37 °C, harvested, counted using hemocytometer, and then diluted to a pre-defined number of cells to be seeded in Petri dishes. After 15 days at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator, the cells were and stained in crystal violet. Only the colonies with more than 50 cells were scored. The survival data were fitted to the linear-quadratic (LQ) model that describes the cell survival  $S$  as a function of dose  $D$ , as follows:  $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ , in which  $\alpha$  and  $\beta$  are adjustable parameters to be determined. The intrinsic radiosensitivity was quantified by calculating the surviving fraction at 2 Gy (SF2) [49].

#### 4.4. Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol and nuclear protein foci scoring was described elsewhere [43,54]. Anti- $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> antibody (#05-636; Merck Millipore, Burlington, VT, USA) was used at 1:800. The monoclonal anti-mouse anti-pATM<sup>ser1981</sup> (#05-740) from Merck Millipore was used at 1:100. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at 1:100 at 37 °C for 20 min. By following the same procedure, micronuclei were scored on the same slides by using 4',6'-Diamidino-2-Phényl-indole (DAPI)-counter staining. Foci and micronuclei were scored by eye with an Olympus BX51 fluorescence microscope. For each of the three independent experiments, 100 nuclei were analyzed. The patented procedures of foci scoring have been detailed elsewhere [26]. It is noteworthy that post-irradiation times indicated in the text represent an equal period of time of the incubation of cells at 37 °C without any genotoxic stress (i.e., under standard culture conditions). Such a period is currently considered to be a time for repair [43,54].



#### 4.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA), Graphpad Prism (San Diego, CA, USA) and MATLAB R2020B (MathWorks, Natick, MA, USA). Since each experiment is the result of three independent replicates, the mean is given with the standard error of the mean (SEM) of the three independent experiments. The discrimination power of each molecular endpoints was performed with the one-way ANOVA test.

The mathematical analysis of correlations between the different endpoints was based on the following procedure: (1) The data fitting analysis was attempted with the current mathematical laws (linear, curvilinear, exponential, and power functions). The adjustable parameters and the quality of fit were calculated systematically. If the data fitting is not acceptable, the link between the two endpoints is considered as “complex” and is thereafter deduced from the other links established (crossed resolution). (2) The differential equation whose solution is provided by the best data fit is established. (3) The k-coefficient and all the bounded values were deduced numerically.

### 5. Conclusions

By analyzing radiobiological data from 200 skin fibroblast cell lines from RT-treated patients showing a large spectrum of OR severity grades obtained with the major assays predicting radiosensitivity, it appears that SF2 and the maximal number of early pATM foci are the best predictors of all the CTCAE grades while the number of residual micronuclei and  $\gamma$ H2AX foci do not predict well the intermediate grades. These findings are consistent with the fact that the clonogenic cell survival assay account for all the dead cells, independently of the cell death pathway. Similarly, the pATM immunofluorescence permits the quantification of DSBs unrecognized by the predominant NHEJ pathway, which directly impact on the RI cell death. Conversely, the residual micronuclei and the  $\gamma$ H2AX foci correspond to a limited subset of lethal DSB. Gathered all in a differential equations system, these major radiosensitivity endpoints are mathematically linked in a single mechanistic model of individual response to radiation in which the ATM kinase plays a major role. Further investigations are needed to better exploit this system in the prediction of the deleterious effects of any exposure of mammalian cells to IR and, more generally, to any DSB-inducer agent.

**Author Contributions:** The authors of this manuscript have contributed in the following manners: Conceptualization, E.L.R., L.B., N.F. and M.B.; data acquisition and methodology, A.G., L.S., M.L.F., J.A.-C., L.E.-N., J.R.-V., C.D., E.B. and A.B.; data analysis, E.L.R., L.B. and N.F.; writing and original draft preparation, J.A.-C., E.B. and N.F.; writing, reviewing and editing, all the authors; project administration, and funding acquisition, N.F., A.B. and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir—INDIRA project), the Institut National du Cancer (InCa)—PROUST project, the National Space Agency (CNES)—ICARE project, the French-Lebanon partenariat Hubert Curien—CEDRE 47880PE project, Région Auvergne Rhône-Alpes—ERATOSTHENE R21107CC project.

**Institutional Review Board Statement:** As already mentioned in Materials and Methods, this study has been performed with human fibroblast cell lines that belong to the COPERNIC collection of the lab that has been approved by the regional Ethical Committee. Cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437, and DC2021-3957 to the Ministry of Research.

**Informed Consent Statement:** All of the anonymous donors of the COPERNIC collection evoked above were informed and signed consent according to the ethics and regulatory recommendations, notably for their consent to participate and for publication of anonymous data.

**Data Availability Statement:** All the data can be provided on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** N.F. reports the following related patents: FR3040178A1, FR3040179A1, WO-2017098190A1, EP3685163A. The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Turesson, I.; Nyman, J.; Holmberg, E.; Oden, A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *36*, 1065–1075. [[CrossRef](#)]
2. ICRP Publication 105. Radiation protection in medicine. *Ann. ICRP* **2007**, *37*, 1–63. [[CrossRef](#)]
3. Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. Rev.* **2016**, *770*, 369–386. [[CrossRef](#)]
4. Dorr, W. Skin and other reactions to radiotherapy—Clinical presentation and radiobiology of skin reactions. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* **2006**, *39*, 96–101. [[PubMed](#)]
5. Stewart, F.A.; Akleyev, A.V.; Hauer-Jensen, M.; Hendry, J.H.; Kleiman, N.J.; Macvittie, T.J.; Aleman, B.M.; Edgar, A.B.; Mabuchi, K.; Muirhead, C.R.; et al. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs—Threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann. ICRP* **2012**, *41*, 1–322. [[CrossRef](#)]
6. Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
7. Stone, H.B.; Coleman, C.N.; Anscher, M.S.; McBride, W.H. Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 529–536. [[CrossRef](#)]
8. Fuzissaki, M.A.; Paiva, C.E.; Oliveira, M.A.; Lajolo Canto, P.P.; Paiva Maia, Y.C. The Impact of Radiodermatitis on Breast Cancer Patients' Quality of Life during Radiotherapy: A Prospective Cohort Study. *J. Pain Symptom Manag.* **2019**, *58*, 92–99.e1. [[CrossRef](#)]
9. Alicikus, Z.A.; Yamada, Y.; Zhang, Z.; Pei, X.; Hunt, M.; Kollmeier, M.; Cox, B.; Zelefsky, M.J. Ten-year outcomes of high-dose, intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Cancer* **2011**, *117*, 1429–1437. [[CrossRef](#)]
10. Zhao, J.; Yorke, E.D.; Li, L.; Kavanagh, B.D.; Li, X.A.; Das, S.; Miften, M.; Rimner, A.; Campbell, J.; Xue, J.; et al. Simple Factors Associated with Radiation-Induced Lung Toxicity after Stereotactic Body Radiation Therapy of the Thorax: A Pooled Analysis of 88 Studies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *95*, 1357–1366. [[CrossRef](#)]
11. Averbeck, D.; Candeias, S.; Chandna, S.; Foray, N.; Friedl, A.A.; Haghdoost, S.; Jeggo, P.A.; Lumniczky, K.; Paris, F.; Quintens, R.; et al. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96*, 297–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ferlazzo, M.L.; Bourguignon, M.; Foray, N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin. Radiat. Oncol.* **2017**, *27*, 310–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ash, D. Lessons from Epinal. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 614–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Peiffert, D.; Simon, J.M.; Eschwege, F. Epinal radiotherapy accident: Passed, present, future. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2007**, *11*, 309–312.
15. El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.; Leblond, P.; Combemale, P.; et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7158. [[CrossRef](#)]
16. National Institutes of Health; National Cancer Institute. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0*. May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010); National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA, 2010.
17. Trotti, A.; Colevas, A.D.; Setser, A.; Rusch, V.; Jaques, D.; Budach, V.; Langer, C.; Murphy, B.; Cumberlin, R.; Coleman, C.N.; et al. CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin. Radiat. Oncol.* **2003**, *13*, 176–181. [[CrossRef](#)]
18. Barnett, G.C.; Coles, C.E.; Elliott, R.M.; Baynes, C.; Luccarini, C.; Conroy, D.; Wilkinson, J.S.; Tyrer, J.; Misra, V.; Platte, R.; et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: A prospective analysis study. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 65–77. [[CrossRef](#)]
19. Barnett, G.C.; Thompson, D.; Fachal, L.; Kerns, S.; Talbot, C.; Elliott, R.M.; Dorling, L.; Coles, C.E.; Dearnaley, D.P.; Rosenstein, B.S.; et al. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2014**, *111*, 178–185. [[CrossRef](#)]
20. Badie, C.; Dziwura, S.; Raffy, C.; Tsigani, T.; Alsbeih, G.; Moody, J.; Finnon, P.; Levine, E.; Scott, D.; Bouffler, S. Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1845–1851. [[CrossRef](#)]
21. Badie, C.; Kabacik, S.; Balagurunathan, Y.; Bernard, N.; Brengues, M.; Faggioni, G.; Greither, R.; Lista, F.; Peinnequin, A.; Poyot, T.; et al. Laboratory intercomparison of gene expression assays. *Radiat. Res.* **2013**, *180*, 138–148. [[CrossRef](#)]
22. Deschavanne, P.J.; Fertil, B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *34*, 251–266. [[CrossRef](#)]
23. Fertil, B.; Dertinger, H.; Courdi, A.; Malaise, E.P. Mean inactivation dose: A useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat. Res.* **1984**, *99*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fertil, B.; Malaise, E.P. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1981**, *7*, 621–629. [[CrossRef](#)]

25. Fertil, B.; Deschavanne, P.J. Relationships between colony forming efficiency and parameters of intrinsic radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 1275–1282. [[PubMed](#)]
26. Little, J.B.; Nichols, W.W.; Troilo, P.; Nagasawa, H.; Strong, L.C. Radiation sensitivity of cell strains from families with genetic disorders predisposing to radiation-induced cancer. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4705–4714.
27. Arlett, C.F.; Harcourt, S.A. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 926–932.
28. Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* **2000**, *455*, 81–95. [[CrossRef](#)]
29. Darroudi, F.; Fomina, J.; Meijers, M.; Natajara, A.T. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat. Res.* **1998**, *404*, 55–65. [[CrossRef](#)]
30. Joubert, A.; Zimmerman, K.M.; Bencokova, Z.; Gastaldo, J.; Rénier, W.; Chavaudra, N.; Favaudon, V.; Arlett, C.; Foray, N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 107–125. [[CrossRef](#)]
31. Dikomey, E.; Borgmann, K.; Brammer, I.; Kasten-Pisula, U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* **2003**, *193*, 125–135. [[CrossRef](#)]
32. Nunez, M.I.; Villalobos, M.; Olea, N.; Valenzuela, M.T.; Pedraza, V.; McMillan, T.J.; Ruiz de Almodovar, J.M. Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br. J. Cancer* **1995**, *71*, 311–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ruiz de Almodovar, J.M.; Nunez, M.I.; McMillan, T.J.; Olea, N.; Mort, C.; Villalobos, M.; Pedraza, V.; Steel, G.G. Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: A correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br. J. Cancer* **1994**, *69*, 457–462. [[CrossRef](#)]
34. Cornforth, M.N.; Bedford, J.S. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* **1987**, *111*, 385–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Granzotto, A.; Bencokova, Z.; Vogin, G.; Devic, C.; Joubert, A.; Balosso, J.; Foray, N. DNA double-strand breaks repair and signaling of human gliomas and normal brain cells in response to radiation: Potential impact of the ATM- and BRCA1-dependent pathways. In *Brain Tumors—Current and Emerging Therapeutic Strategies*; Abujamra, A.L., Ed.; Intechweb: Rijeka, Croatia, 2011.
36. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **1991**, *13*, 641–648.
37. Jeggo, P.A.; Lobrich, M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* **2007**, *26*, 7717–7719. [[CrossRef](#)]
38. Kinner, A.; Wu, W.; Staudt, C.; Iliakis, G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5678–5694. [[CrossRef](#)]
39. Ganguly, T.; Iliakis, G. A cell-free assay using cytoplasmic cell extracts to study rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cell nuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* **1995**, *68*, 447–457. [[CrossRef](#)]
40. Berthel, E.; Ferlazzo, M.L.; Devic, C.; Bourguignon, M.; Foray, N. What does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?—A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5339. [[CrossRef](#)]
41. Rothkamm, K.; Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)]
42. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 905. [[CrossRef](#)]
43. Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.; Forcheron, F.; Viau, M.; et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 450–460. [[CrossRef](#)]
44. Lobrich, M.; Jeggo, P.A. The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2005**, *76*, 112–118. [[CrossRef](#)]
45. Taylor, A.M.; Harnden, D.G.; Arlett, C.F.; Harcourt, S.A.; Lehmann, A.R.; Stevens, S.; Bridges, B.A. Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* **1975**, *258*, 427–429. [[CrossRef](#)]
46. Foray, N.; Marot, D.; Gabriel, A.; Randrianarison, V.; Carr, A.M.; Perricaudet, M.; Ashworth, A.; Jeggo, P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2860–2871. [[CrossRef](#)]
47. Vogin, G.; Bastogne, T.; Bodgi, L.; Gillet-Daubin, J.; Canet, A.; Pereira, S.; Foray, N. The Phosphorylated ATM Immunofluorescence Assay: A High-performance Radiosensitivity Assay to Predict Postradiation Therapy Overreactions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *101*, 690–693. [[CrossRef](#)]
48. Pereira, S.; Bodgi, L.; Duclos, M.; Canet, A.; Ferlazzo, M.L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Deneuve, S.; Vogin, G.; Foray, N. Fast and binary assay for predicting radiosensitivity based on the nucleoshuttling of ATM protein: Development, validation and performances. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *100*, 353–360. [[CrossRef](#)]
49. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)]
50. Bodgi, L.; Canet, A.; Pujo-Menjouet, L.; Lesne, A.; Victor, J.M.; Foray, N. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *J. Theor. Biol.* **2016**, *394*, 93–101. [[CrossRef](#)]
51. Grote, S.J.; Joshi, G.P.; Revell, S.H.; Shaw, C.A. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1981**, *39*, 395–408. [[CrossRef](#)]

52. Al-Choboq, J.; Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; El-Nachef, L.; Maalouf, M.; Berthel, E.; Foray, N. Usher Syndrome Belongs to the Genetic Diseases Associated with Radiosensitivity: Influence of the ATM Protein Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1570. [[CrossRef](#)]
53. Combemale, P.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Bencokova, Z.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Burlet, S.F.; Pinson, S.; Amini-Adle, M.; Al-Choboq, J.; et al. Individual Response to Radiation of Individuals with Neurofibromatosis Type I: Role of the ATM Protein and Influence of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *59*, 556–573. [[CrossRef](#)]
54. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)]
55. Rogakou, E.P.; Pilch, D.R.; Orr, A.H.; Ivanova, V.S.; Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5858–5868. [[CrossRef](#)]
56. Sedelnikova, O.A.; Rogakou, E.P.; Panyutin, I.G.; Bonner, W.M. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* **2002**, *158*, 486–492. [[CrossRef](#)]
57. Burma, S.; Chen, B.P.; Murphy, M.; Kurimasa, A.; Chen, D.J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42462–42467. [[CrossRef](#)]
58. Rothkamm, K.; Kruger, I.; Thompson, L.H.; Lohrich, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 5706–5715. [[CrossRef](#)]
59. Kuhne, M.; Riballo, E.; Rief, N.; Rothkamm, K.; Jeggo, P.A.; Lohrich, M. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 500–508. [[CrossRef](#)]
60. Badie, C.; Goodhardt, M.; Waugh, A.; Doyen, N.; Foray, N.; Calsou, P.; Singleton, B.; Gell, D.; Salles, B.; Jeggo, P.; et al. A DNA double-strand break defective fibroblast cell line (180BR) derived from a radiosensitive patient represents a new mutant phenotype. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4600–4607.
61. Badie, C.; Iliakis, G.; Foray, N.; Alsbeih, G.; Cedervall, B.; Chavaudra, N.; Pantelias, G.; Arlett, C.; Malaise, E.P. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat. Res.* **1995**, *144*, 26–35. [[CrossRef](#)]
62. Badie, C.; Iliakis, G.; Foray, N.; Alsbeih, G.; Pantelias, G.E.; Okayasu, R.; Cheong, N.; Russell, N.S.; Begg, A.C.; Arlett, C.F.; et al. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1232–1234.
63. Yang, S.N.; Liao, C.Y.; Chen, S.W.; Liang, J.A.; Tsai, M.H.; Hua, C.H.; Lin, F.J. Clinical implications of the tumor volume reduction rate in head-and-neck cancer during definitive intensity-modulated radiotherapy for organ preservation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2011**, *79*, 1096–1103. [[CrossRef](#)]
64. Pozniak-Balicka, R.; Chomiak, B.; Woskowiak, P.; Nowicki, N.; Bojarski, J.; Salagierski, M. Does the radiation approach affect acute toxicity in prostate cancer patients? A comparison of four radiation techniques. *Cent. Eur. J. Urol.* **2020**, *73*, 295–299.
65. Amaldi, U. Future trends in cancer therapy with particle accelerators. *Z. Med. Phys.* **2004**, *14*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Le Reun, E.; Casutt, A.; Durham, A.; Bouchaab, H.; Romano, E.; Lovis, A.; Krueger, T.; Von Garnier, C.; Ozshahin, E.M.; Kinj, R. Lung stereotactic radiation therapy: Intercomparison of irradiation devices in terms of outcome and predictive factors. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2022**, *in press*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Thomas, A.; Keller, A.; Menoux, I.; Brahimi, Y.; Vigneron, C.; Le Fevre, C.; Chambrelant, I.; Pietta, G.A.; Guihard, S.; Clavier, J.B.; et al. Prognostic factors of acute radiodermatitis in breast cancer after adjuvant radiotherapy treated with RT3D or IMRT. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2022**, *26*, 684–691.
68. Lapen, K.; King, C.; Braunstein, L.Z.; Khan, A.J.; Kamrava, M.R.; Gillespie, E.F.; Cook, K.A. A Comparison of Patient- and Clinician-Reported Acute Toxicity during Radiotherapy for Primary Breast Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2022**, *114*, 301–309. [[CrossRef](#)]
69. Puck, T.T.; Marcus, P.I. Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* **1956**, *103*, 653–666. [[CrossRef](#)]
70. Elkind, M.M.; Whitmore, G.F. *The Radiobiology of Cultured Mammalian Cells*; Gordon and Breach: New York, NY, USA, 1967.
71. Arlett, C.F.; Green, M.H.; Priestley, A.; Harcourt, S.A.; Mayne, L.V. Comparative human cellular radiosensitivity: I. The effect of SV40 transformation and immortalisation on the gamma-irradiation survival of skin derived fibroblasts from normal individuals and from ataxia-telangiectasia patients and heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.* **1988**, *54*, 911–928. [[CrossRef](#)]
72. Ferlazzo, M.L.; Bach-Tobdjji, M.K.E.; Djerad, A.; Sonzogni, L.; Burlet, S.F.; Devic, C.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Djefal-Kerrar, A.; Foray, N. Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *55*, 4973–4983. [[CrossRef](#)]
73. Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Lartin, O.; Devic, C.; Vogin, G.; Pereira, S.; Foray, N. Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 1200–1211. [[CrossRef](#)]
74. Moulay Lakhdar, I.; Ferlazzo, M.L.; Al Choboq, J.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Thariat, J.; Foray, N. Fibroblasts from Retinoblastoma Patients Show Radiosensitivity Linked to Abnormal Localization of the ATM Protein. *Curr. Eye Res.* **2020**, *46*, 546–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Bachelet, J.T.; Granzotto, A.; Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Berthel, E.; Devic, C.; Foray, N. First Radiobiological Characterization of Skin and Bone Cells from a Patient Suffering from the PI3KCA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) Syndrome. *Arch. Med. Clin. Case Rep.* **2020**, *4*, 1052–1066. [[CrossRef](#)]
76. Bachelet, J.T.; Granzotto, A.; Ferlazzo, M.; Sonzogni, L.; Berthel, E.; Devic, C.; Foray, N. First radiobiological characterization of the McCune-Albright syndrome: Influence of the ATM protein and effect of statins + bisphosphonates treatment. *Int. J. Radiat. Biol.* **2021**, *97*, 317–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Pouliliou, S.E.; Lialiaris, T.S.; Dimitriou, T.; Giatromanolaki, A.; Papazoglou, D.; Pappa, A.; Pisteovou, K.; Kalamida, D.; Koukourakis, M.I. Survival Fraction at 2 Gy and gammaH2AX Expression Kinetics in Peripheral Blood Lymphocytes from Cancer Patients: Relationship with Acute Radiation-Induced Toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2015**, *92*, 667–674. [[CrossRef](#)]
78. Attard-Montalto, S.P.; Saha, V.; Kingston, J.; Plowman, N.; Taylor, M.; Arlett, C.; Bridges, B.; Eden, O. Increased radiosensitivity in a child with T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **1996**, *27*, 564–570. [[CrossRef](#)]
79. Plowman, P.N.; Bridges, B.A.; Arlett, C.F.; Hinney, A.; Kingston, J.E. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br. J. Radiol.* **1990**, *63*, 624–628. [[CrossRef](#)]
80. Pietrucha, B.M.; Heropolitanska-Pliszka, E.; Wakulinska, A.; Skopczynska, H.; Gatti, R.A.; Bernatowska, E. Ataxia-telangiectasia with hyper-IgM and Wilms tumor: Fatal reaction to irradiation. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2010**, *32*, e28–e30. [[CrossRef](#)]
81. Scott, D.; Barber, J.B.; Levine, E.L.; Burrill, W.; Roberts, S.A. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: A test for predisposition? *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 614–620. [[CrossRef](#)]
82. Rothfuss, A.; Schutz, P.; Bochum, S.; Volm, T.; Eberhardt, E.; Kreienberg, R.; Vogel, W.; Speit, G. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 390–394.
83. Sommer, S.; Buraczewska, I.; Kruszewski, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1534. [[CrossRef](#)]
84. Duker, N.J. Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am. J. Med. Genet.* **2002**, *115*, 125–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Bedford, J.S.; Cornforth, M.N. Relationship between the recovery from sublethal X-ray damage and the rejoining of chromosome breaks in normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* **1987**, *111*, 406–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Foray, N.; Priestley, A.; Alsbeih, G.; Badie, C.; Capulas, E.P.; Arlett, C.F.; Malaise, E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 271–283. [[PubMed](#)]

Review

# Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity the Primum Movens?

Laura El Nacheff <sup>1</sup>, Elise Berthel <sup>1</sup>, Mélanie L. Ferlazzo <sup>1</sup>, Eymeric Le Reun <sup>1</sup>, Joelle Al-Choboq <sup>1</sup>, Juliette Restier-Verlet <sup>1</sup>, Adeline Granzotto <sup>1</sup>, Laurène Sonzogni <sup>1</sup>, Michel Bourguignon <sup>1,2</sup> and Nicolas Foray <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm, U1296 Unit, Radiation: Defense, Health and Environment, Centre Léon-Bérard, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup> Department of Biophysics and Nuclear Medicine, Université Paris Saclay (UVSQ), 78035 Versailles, France

\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-04-7878-2828

**Simple Summary:** A review of the molecular and cellular features of the major cancer syndromes associated with radiosensitivity revealed the importance of the ATM protein, either as an impaired kinase in the nucleus or as a complex in the cytoplasm, with the mutated protein responsible for the syndrome.

**Abstract:** There are a number of genetic syndromes associated with both high cancer risk and clinical radiosensitivity. However, the link between these two notions remains unknown. Particularly, some cancer syndromes are caused by mutations in genes involved in DNA damage signaling and repair. How are the DNA sequence errors propagated and amplified to cause cell transformation? Conversely, some cancer syndromes are caused by mutations in genes involved in cell cycle checkpoint control. How is misrepaired DNA damage produced? Lastly, certain genes, considered as tumor suppressors, are not involved in DNA damage signaling and repair or in cell cycle checkpoint control. The mechanistic model based on radiation-induced nucleoshuttling of the ATM kinase (RIANS), a major actor of the response to ionizing radiation, may help in providing a unified explanation of the link between cancer proneness and radiosensitivity. In the frame of this model, a given protein may ensure its own specific function but may also play additional biological role(s) as an ATM phosphorylation substrate in cytoplasm. It appears that the mutated proteins that cause the major cancer and radiosensitivity syndromes are all ATM phosphorylation substrates, and they generally localize in the cytoplasm when mutated. The relevance of the RIANS model is discussed by considering different categories of the cancer syndromes.

**Keywords:** cancer; genetic syndromes; radiosensitivity; ATM protein



**Citation:** El Nacheff, L.; Berthel, E.; Ferlazzo, M.L.; Le Reun, E.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Bourguignon, M.; Foray, N. Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity the Primum Movens? *Cancers* **2022**, *14*, 6141. <https://doi.org/10.3390/cancers14246141>

Academic Editor: David Wong

Received: 28 October 2022

Accepted: 9 December 2022

Published: 13 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. The Syndromes Combining Cancer Proneness and Radiosensitivity

To date, radiotherapy (RT) remains as one of the major tools for cancer treatment to control and eradicate cancer cells. Radiation oncologists have to face a double challenge: kill the tumor and spare the healthy tissues. After more than one century of anti-cancer RT, a considerable amount of data has been accumulated to better understand the molecular mechanisms underlying the cellular response of tumors and healthy tissues to ionizing radiation (IR) but also to some chemotherapy agents that mimic IR [1–5]. Particularly, in 5 to 20% of RT-treated cancer cases, some adverse tissue reactions, ranging from radiation-induced (RI) blishes without consequence to fatal reactions, can occur during or after RT, which oblige clinicians to modify or stop the scheduled treatment [6–8]. The prediction and prevention of such adverse reactions of exposed tissue, called radiosensitivity reactions or radiotoxicities, is a big challenge in radiotherapy and in radiobiology [9]. Hence, cancer proneness can be associated with a large spectrum of RI adverse reactions, therefore defining

some “syndromes” that link both cancer proneness and radiosensitivity. These particular syndromes raise the question of the interplay between the cellular transformation process leading to cancer and an abnormal response to IR leading to tissue injuries [4,5].

### 1.2. Interplay between DNA Damage Repair and Signaling and Cell Cycle Checkpoint Arrests

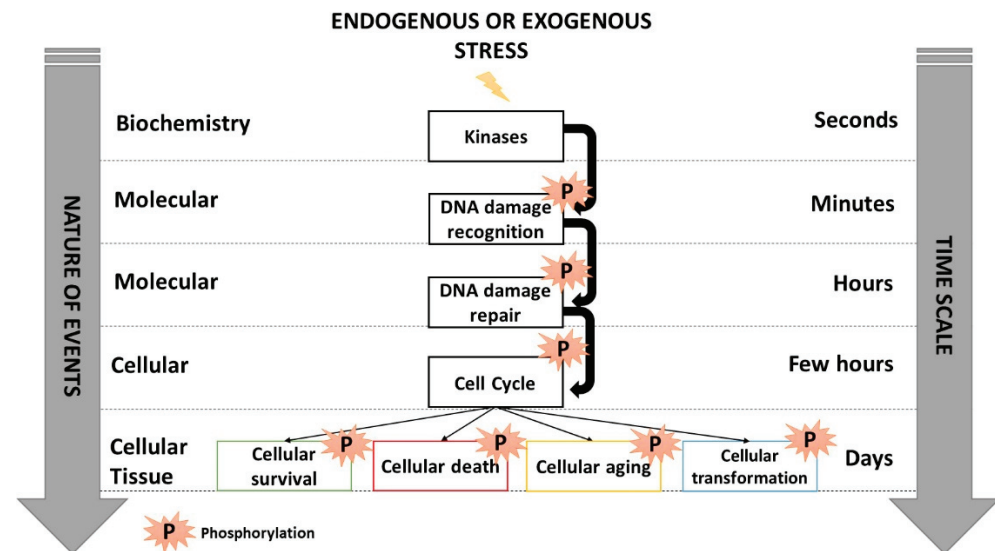
While carcinogenesis and the cellular transformation process have been mainly associated with a lack of control of cell cycle checkpoint arrests enabling cellular proliferation, radiosensitivity has been generally linked to dysfunctions in chromosomal and DNA damage signaling and repair pathways [9–11]. However, such interplay between cancer and radiosensitivity remains unclear. For example, some mutations of the *LIG4* and *XP* genes that cause cancer and radiosensitivity syndromes have been shown to directly impact DNA damage signaling and repair but not on the cell cycle checkpoint arrest control. Conversely, some mutations of the *p53* or *CHK2* genes that cause some other cancer and radiosensitivity syndromes have been shown to directly impact the cell cycle checkpoint arrest controls but not DNA damage signaling and repair [4,5]. Lastly, the mutations of *NF1* or *TSC* genes, whose biological function directly impacts DNA damage signaling and repair and cell cycle checkpoint arrest controls, have been associated with cancer and radiosensitivity [12,13]. Hence, these examples reveal not only that the molecular bases of cancer proneness remain to be more documented, but also their link with radiosensitivity is still poorly understood.

### 1.3. The ATM Protein as the Crossroads of Cancer and Radiosensitivity

IR generally causes three major types of DNA damage: base damage (BD), single-strand breaks (SSB) and DNA double-strand breaks (DSB). Throughout the natural selection, cells are equipped with various pathways to manage BD, SSB and DSB specifically [4,14]. Each type of DNA damage triggers a specific ordered succession of enzymatic steps, frequently operating via a cascade of phosphorylations directed by upstream kinases: DNA damage is firstly recognized several minutes post-stress, is repaired for a few hours, cell cycle checkpoint arrests are activated some hours post-stress, and then cellular death is triggered several hours thereafter together with the initiation of cell transformation or aging processes (Figure 1) [15]. Any lack or impairment of the most upstream molecular events occurring immediately after the DNA damage formation results in the most severe biological effects and may condition the next molecular and cellular steps [15]. Such an RI cascade of phosphorylations reveals that RI DNA damage formation, recognition and repair occur systematically before cell cycle checkpoint arrests, suggesting that cells do not arrest their cycle to repair their DNA damage since the great majority of them are already recognized and/or repaired [10,16].

Among the RI DNA damage, DSB appears to be the key damage of cell lethality [17,18]. Among the kinases involved in both DSB signaling and repair and cell cycle checkpoint arrest control, the ATM kinase is considered as a major actor of the response to IR, since it phosphorylates numerous protein substrates belonging to the RI cascade of phosphorylations evoked above [15,19]. More recently, we have documented the role of the RI ATM nucleoshuttling (RIANS) in the individual response to IR and showed that the RIANS may serve as a reliable marker of radiosensitivity, whatever the nature and the dose of IR [8,18,20]. Briefly, after exposure to IR, the cytoplasmic ATM dimers dissociate as ATM monomers and diffuse in the nucleus. Once in the nucleus, ATM monomers phosphorylate the X variant of the H2A histone protein ( $\gamma$ H2AX), which triggers the recognition of the RI DSB by the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway, the most predominant DSB signaling and repair pathway in humans [8,18,20]. However, the RIANS can be delayed by the overexpression of some cytoplasmic substrates of ATM (called X-proteins). These X-proteins hold SQ and TQ domains that are specifically phosphorylated by ATM after exposure to IR [19]. The X-proteins sequester the RI ATM monomers, decrease their flux in the nucleus and therefore affect the nuclear ATM kinase activity and the number of DSB recognized by NHEJ [20–22]. Hence, an overexpression of cytoplasmic X-proteins and a delayed RIANS may cause radiosensitivity because some DSB are not recognized

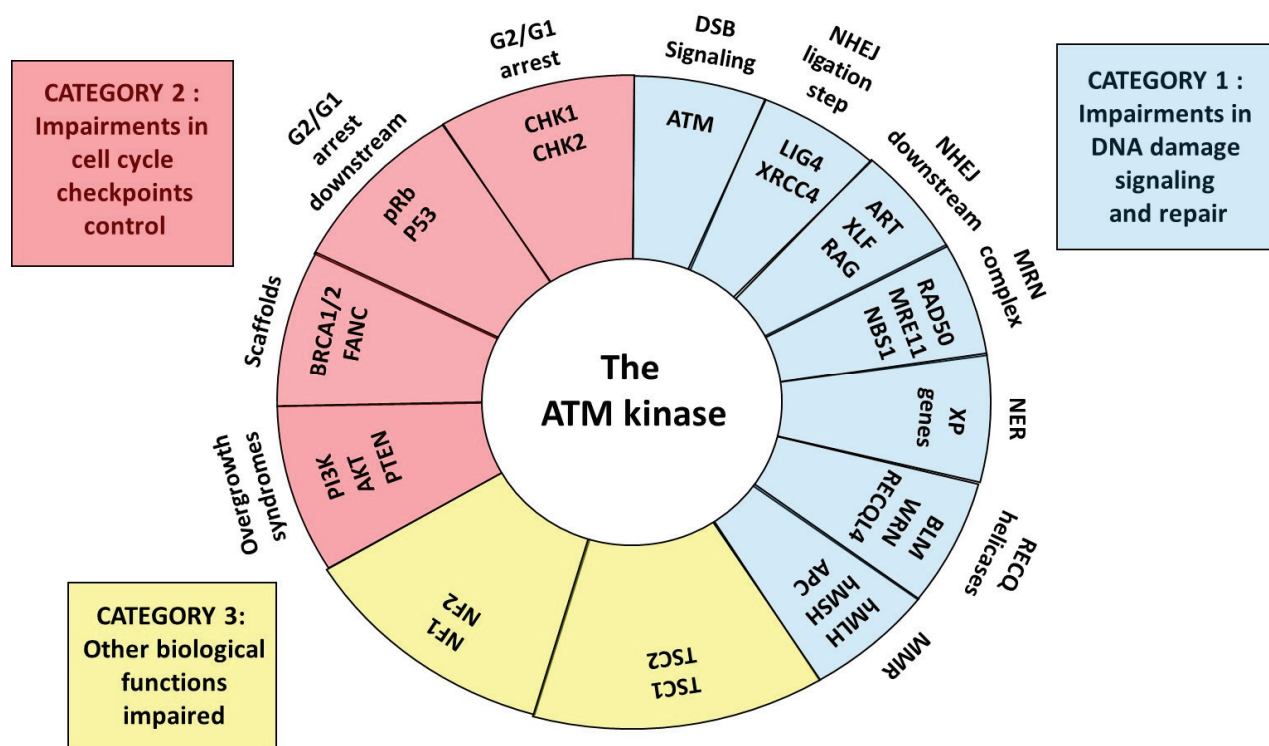
or repaired, and cancer because of DSB non-recognized by NHEJ may be misrepaired [4]. In the RIANS model, the mutated protein responsible for each syndrome associated with delayed RIANS may elicit two impaired functions: one in the nucleus or cytoplasm, as a single mutated protein, and the other, as an overexpressed cytoplasmic ATM substrate. These two impaired functions may explain impaired DSB signaling and repair defects on one hand and lack of cell cycle checkpoint arrest on the other hand [20].



**Figure 1.** Schematic view of the cascades of phosphorylations occurring in response to IR activated by kinases that trigger DNA damage recognition, repair, cell cycle arrests and cellular death. Inspired from [15].

The RIANS model has been validated in a subset of cancer and radiosensitivity syndromes [8,13,23,24]. This review aims to better identify and understand the molecular and cellular features of the major cancer syndromes associated with radiosensitivity by successively examining the syndromes related to impairments of DNA damage signaling and repair (category 1), impairments of cell cycle checkpoint arrest control (category 2), and the other syndromes for which impairments of both DNA damage signaling and repair and cell cycle checkpoint arrest control are not obvious (category 3) (Figure 2). For each syndrome described, the potential role of the ATM kinase and the RIANS, the presence of SQ/TQ domains potentially phosphorylated by ATM, and the cytoplasmic forms of the mutated proteins will be discussed to provide a novel and unified mechanistic model for both cancer susceptibility and radiosensitivity (Figure 2).





**Figure 2.** Schematic view of the central role of ATM as a kinase and partner for the proteins whose mutations cause cancer and radiosensitivity syndromes. Three categories can be defined: syndromes due to some impairments in DNA damage signaling and repair, some impairments in cell cycle checkpoint control and to other impaired biological functions.

## 2. Diseases of DNA Damage Repair and Signaling

### 2.1. Mutations of the ATM and ATR Kinases

The phosphatidylinositol-3 (PI3) kinases are the components of a large family of enzymes involved in various cellular functions such as cell proliferation, survival and signaling of DNA damage, through their capacity to phosphorylate their substrates [25]. Among them, the ATM and ATR kinases are the two major actors [15,26,27].

The ATM mutations play a major role in DNA break recognition, repair and signaling but also in the cell cycle checkpoint control. Homozygous ATM mutations cause ataxia telangiectasia (AT), the human syndrome associated with the highest radiosensitivity [1,28,29]. AT was described for the first time by Syllaba and Hennen in 1926 and by Madame Louis Bar in 1941 [30,31]. AT is characterized by cerebellar ataxia with severe prognosis oculocutaneous telangiectasia, a deficient synthesis of immunoglobulins IgA, IgE and IgG2 and a strong predisposition to certain cancers, notably leukemias and lymphomas [32–34]. AT is also associated with a spontaneous reorganization of chromosomes (10% of metaphases elicit aberrations on chromosomes 7 and 14) [35]. In the United States and Great Britain, the incidence of AT is estimated to be about 1/100,000 [36]. AT cell lines are systematically characterized by hyper-radiosensitivity [28]. Other radiobiological features of AT cells include numerous chromosomal aberrations, lack of control of the G1 cycle and inhibition of DNA synthesis (called radio-resistant synthesis). No hypersensitivity to UV has been observed in AT patients [32,37–40]. The ATM gene has been cloned and sequenced in 1995 [29,41]. As evoked above, the ATM kinase preferentially phosphorylates the SQ/TQ domains in response to IR [19]. Most of the homozygous ATM mutations lead to complete inactivation of the protein [42]. For example, cells from AT patients either do not show  $\gamma$ H2AX foci or show a small number of tiny  $\gamma$ H2AX foci, suggesting an absent or impaired RANS [18].

About 15% of AT patients, with so-called variants, suffer from mutations that lead to a less severe pathology, less marked clinical signs, and a life expectancy of 50–60 years (vs. less than 30 years for “classical” AT patients). Such mutations do not concern the kinase domain of ATM [43,44]. Heterozygous carriers (ATH) represent about 1% of the whole population and elicit an increased risk of breast cancer [45], although this epidemiological feature is still debated [46–48]. ATH cells may be not more radiosensitive than cells from radioresistant, apparently healthy individuals, although such a hypothesis remains to be confirmed [49–52]. Altogether, this short review shows that homozygous “classical” and variant *ATM* mutations are associated with both impaired DNA damage signaling and repair and a lack of cell cycle checkpoint control.

The ATR kinase also belongs to the PI3K family and elicits an ATM-like structure with the same affinity for the SQ/TQ domains as ATM. However, ATR is activated by UV, SSB and BD rather than IR and DSB, such as ATM [15,27,53]. ATR may be more essential than ATM for cell viability since only punctual mutations of *ATR* have been observed: such *ATR* mutations cause Seckel syndrome (or microcephalic primordial dwarfism (SCKL)) [54–56]. SCKL is associated with severe microcephaly, bird-headed dwarfism, growth and mental retardation. However, literature data suggest that SCKL is not associated with a strong radiosensitivity such as that observed in AT cells [56]. Regarding the susceptibility to cancer, it seems that it is not a major feature of SCKL, although some cases of leukemias have been reported [56]. Lastly, it has been shown that mutations of the pericentrin *PCNT* gene cause a SCKL-like syndrome, suggesting a possible interaction between the *PCNT* and *ATR* proteins. *PCNT* mutations have been associated with high cancer risk. However, the level of radiosensitivity potentially associated with *PCNT* mutations needs to be documented [57]. Hence, the literature data suggest that further investigations are needed to better document that SCKL and SCKL-like syndromes can be considered as cancer and radiosensitivity syndromes.

## 2.2. Non-Homologous End-Joining Diseases

### 2.2.1. Mutations of Ku and DNA-PKcs Genes

As said above, the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway is the most predominant DSB repair pathway in G0/G1 mammalian cells [58,59]. Historically, as opposed to homologous recombination (HR), another DSB repair pathway, the term “non-homologous” has been added to “end-joining” to give “non-homologous end-joining” [16]. As explained in another review, this term has produced confusion since the notion of strand homology has no sense in the G0/G1 phase (what would “homologous” end-joining mean?) [4].

The end-joining consists in a ligation of both broken DNA ends. The Ku80 and Ku70 proteins bind to DNA to form the Ku heterodimer. The Ku heterodimer slides on DNA and stops at the broken ends: a third protein, DNA-PKcs, is then recruited and the trimeric complex, named DNA-PK, and acts as a serine-threonine kinase [60]. When activated as kinases (generally after an oxidative stress), ATM and DNA-PK can phosphorylate certain protein substrates such as  $\gamma$ H2AX, which triggers the formation of nuclear  $\gamma$ H2AX foci at the DSB sites. As evoked above, the formation of nuclear  $\gamma$ H2AX foci is considered as the earliest recognition step of DSB managed by NHEJ [61,62]. After this step, ligase IV (LIG4) and XRCC4 proteins are recruited at the DSB sites, and broken DNA ends are joined. This is the ligation step [60]. The biological role of the DNA-PK components (Ku70, Ku80, DNA-PKcs) is so crucial for cell viability that no human syndrome is caused by their mutations. However, in rodents, some Ku and DNA-PKs mutants exist, and they are characterized by a severe defect of DSB repair and hyper-radiosensitivity [63]. In humans, only the glial tumor line MO59J shows a mutation of *DNA-PKs* [64,65], and only one patient has been identified with a *DNA-PK* mutation that does not concern the kinase domain [66,67]. In some cases of lupus erythematosus, an autoimmune disease, the expression of Ku proteins is generally low. However, no systematic link between lupus and radiosensitivity has been established yet, probably because the Ku protein is so abundant that a decreased expression does not significantly affect its role in the response to IR [68]. Hence, considering their importance

in cell viability, no cancer and radiosensitivity syndrome associated with mutations of the early actors of NHEJ (namely the components of the DNA-PK complex) have been described yet.

### 2.2.2. Mutations of the LIG4 and XRCC4 Genes

In 2003, from the case of a patient suffering from a lymphoma who succumbed to its radio-chemotherapeutic treatment [69,70], O'Driscoll et al. have defined a human syndrome associated with *LIG4* mutations, characterized by high radiosensitivity, immunodeficiency, strong pancytopenia, growth retardation and dysmorphic facial features [54]. To date, in addition to this historical case, about forty cases of patients holding *LIG4* mutations have been described [71,72].

As evoked above, the XRCC4 protein forms a complex with LIG4. *XRCC4* mutations may cause microcephalic primordial dwarfism associated with cardiomyopathy but not with immunodeficiency nor predisposition to any malignancy [73,74]. About 15 cases of *XRCC4* mutations have been reported in humans. The first was described in 2014 [75].

In the frame of the RIANS model, can the LIG4 and XRCC4 proteins serve as X-proteins? The LIG4 and XRCC4 proteins hold seven and one SQ/TQ domain, respectively, but no ATM phosphorylated form of these two proteins has been described yet. Some cytoplasmic forms of LIG4 have been reported in response to specific viral infections [76] and the LIG4 protein has been shown to regulate the nuclear localization of XRCC4 [77,78], suggesting that XRCC4 may potentially interact with ATM in the cytoplasm in the case of specific mutations of *LIG4*. However, considering the limited number of LIG4 and XRCC4 patients, further experiments are needed to verify such hypotheses.

### 2.2.3. Mutations of Art, XLF, 53BP1, RAG1 and RAG2 Genes

The Artemis protein, encoded by the *Art/DCLRE1C* gene, is a DNA exo/endonuclease that acts with DNA-PK to prepare broken DNA ends for ligation [79,80]. Such a step is important, not only for DSB repair via NHEJ but also for the V(D)J recombination process, required for immunoglobulins production. The hypomorphic (homozygous or compound heterozygous) mutations of *Art* cause Artemis syndrome, a human severe combined immunodeficiency associated with a moderate radiosensitivity but a variable predisposition to lymphoma [81–85]. With 10 SQ/TQ domains, the Artemis protein was found to be a major ATM phosphorylation substrate in response to IR that may serve as a regulator of the G2/M cell cycle checkpoint [86]. However, the subcellular localization of the Artemis protein when mutated needs to be documented.

Another important but non-essential NHEJ protein, XLF/Cernunnos, has been identified. Similar to Artemis, XLF/Cernunnos also acts downstream DNA-PK [87–89]. Hypomorphic (homozygous or compound heterozygous) mutations of this gene cause Cernunnos syndrome that is associated with mental retardation, microcephaly, strong lymphopenia, and severe immunodeficiency [90]. XLF interacts with XRCC4-LIG4 complex, which stimulates the LIG4 ligase activity by helping to align broken DNA ends. To date, only five Cernunnos syndrome patients have been identified. Similar to Artemis, Cernunnos syndrome is associated with moderate radiosensitivity and a variable predisposition to lymphoma [87–90]. With four SQ/TQ domains, the XLF/Cernunnos protein was also found to be an ATM phosphorylation substrate in response to IR [91]. The Akt kinase was shown to phosphorylate XLF, which triggers its dissociation from the LIG4-XRCC4 complex and its cytoplasmic relocation [92]. Further investigations are needed to identify the role of ATM in the cascade of phosphorylation between Akt, XLF, XRCC4 and LIG4.

The 53BP1 protein has been hypothesized to act as a NHEJ protein, although its role is still poorly understood. The 53BP1 protein forms nuclear foci after irradiation, such as many repair proteins cited in this review [93]. The absence of 53BP1 nuclear foci in a patient who showed strong immunodeficiency, dysmorphic aspects, intellectual difficulties and radiosensitivity comparable to Artemis syndrome has been reported. This case was at the origin of the definition of the RIDDLE syndrome (radiosensitivity, immunodeficiency,

dysmorphic features and learning difficulties). However, further investigations have documented the molecular features of RIDDLE syndrome that appeared to be caused not by mutations of *53BP1* but by mutations of the ubiquitin-ligase RNF168 [93–95]. Hence, while loss of *53BP1* function has been observed in some tumors, no syndrome associated with *53BP1* mutations has been defined yet [93–95].

Finally, in this list of syndromes associated with NHEJ impairments, Omenn syndrome (OS) was found to be caused by mutations of the *RAG1* and *RAG2* genes but also by certain mutations of Artemis [96,97]. OS is a severe immunodeficiency syndrome associated with erythroderma, hepatocellular carcinoma, splenomegaly, lymphadenopathy, and some alopecia. OS patients have a low or total absence of B lymphocytes. The few radiobiological studies about OS suggest that the radiosensitivity of OS is similar to that associated with Artemis and Cernunnos syndromes [98,99]. Phosphorylation of *RAG1* or *RAG2* by ATM has been described [100] but the subcellular localization of the mutated *RAG1* and *RAG2* proteins needs to be better documented before considering *RAG* proteins as potential X-proteins.

#### 2.2.4. NHEJ Impairments: Immunodeficiency Rather Than Radiosensitivity?

Unlike with the early actors of the NHEJ pathway, the mutations of the downstream NHEJ actors such as *Art*, *XLF*, *RAG1*, *RAG2* cause a moderate radiosensitivity rather than hyper-radiosensitivity, probably because their functions are redundant during the NHEJ process. When cancer proneness was also reported, all the proteins concerned were found to be phosphorylation substrates of ATM. Since the NHEJ actors are required for a normal V(D)J recombination process, unlike for DSB repair, the major clinical features of the NHEJ impairments described above is severe immunodeficiency rather than severe radiosensitivity. Furthermore, considering the importance of the role of NHEJ actors in lymphocytes, the NHEJ impairments are generally associated with a high risk of leukemia/lymphoma rather than any other cancer type. Most of the mechanistic NHEJ models proposed in the literature do not integrate ATM kinase, while this protein acts upstream the NHEJ actors that serve as phosphorylation substrates, and *ATM* mutations lead to the lack of recognition of a great majority of RI DSB [4,5,16].

### 3. Recombination Repair Diseases

#### 3.1. Mutations of the *RAD51* and *RAD52* Genes

In general, recombination consists in replacing the damaged DNA sequence either by the identical sequence of the homologous chromosome (homologous recombination, HR) [101] or by a sequence taken randomly (illegitimate or non-homologous recombination, NHR), the most frequent ones being the AGCT (*AluI*) sequences [102–104]. While a functional HR is required for meiosis and mitosis, and more generally, in proliferating organisms (e.g., bacteria, yeasts), HR is nearly absent from quiescent cells [101]. Although many studies suggest that the *RAD51*-*RAD52* multimeric complex is essential for the recognition of DSB by HR, the subsequent DNA strand exchange process is still poorly understood. Similar to the Ku heterodimer, the *RAD52* protein, as a multimeric ring, was hypothesized to slide along the DNA and stop at the DSB sites. At the DSB sites, *RAD51* may associate with *RAD52*, and its phosphorylation by tyrosine kinases may activate both its nuclease function and its change of shape as a filament [101–104]. While the *RecA* protein is considered as the human *RAD51* homolog and is essential for the exchange of DNA strands in bacteria, the *RecA* sequence is however much smaller than that of *RAD51* and does not hold any endonuclease site such as *RAD51* [105]. Furthermore, resolvases and the complex process of DNA strand exchange (Holliday junctions) remain misunderstood in humans [106]. As evoked for the upstream NHEJ proteins, the mutations of the upstream HR actors lead to the absence of viability, and no corresponding human syndrome exists. Lastly, yeast strains carrying *Rad52* mutations are among the most hyper-radiosensitive ones, confirming the importance of HR for proliferating organisms and the differences existing between micro-organisms and mammals [107].

### 3.1.1. The Hyper-Recombination Process—At the Origin of Carcinogenesis?

Many proteins other than RAD51 and RAD52 are involved in the recombination process and ensure the stability of the genome via multiprotein complexes. This is particularly the case of scaffold proteins such as BRCA1, BRCA2, and FANCD1, whose mutations combine cancer predisposition and lack of control of the cell cycle checkpoints (the consequences of their mutations will be discussed in the next chapter). In addition, the mutations of these proteins cause a lack of control of recombination (also called hyper-recombination). The hyper-recombination process is responsible for the production of additional and mis-repaired DNA breaks [108–110]. In other terms, hyper-recombination results in an accumulation of errors and numerous spontaneous breaks, notably through the impairment of nucleases function [108–110]. Hyper-recombination is a common feature of all the syndromes associated with a high risk of cancer. In the frame of the model of carcinogenesis proposed by Weinberg, hyper-recombination and the resulting gene mutations may serve as the endogenous initiation step required for cell transformation and tumorigenesis [111].

### 3.1.2. Mutations of the RAD50-MRE11-NBS1 Complex

The RAD50, MRE11 and NBS1 proteins form a complex involved during the several steps of DNA damage response from DNA damage recognition to assembly repair complexes, and mutations of proteins constituting this complex are associated with neurological syndromes with tumorigenic potential. Furthermore, the MRE11 endonuclease activity was shown to strongly depend on the integrity of the RAD50-MRE11-NBS1 complex [112–114].

The mutations of *NBS1* cause Nijmegen's syndrome (NBS), first described in the 1980s [115]. NBS was long considered as a variant form of the AT syndrome, but with a lower radiosensitivity [116,117]. Microcephaly, small stature, mental retardation, high lymphoma susceptibility and immunodeficiency are the main clinical manifestations of NBS [115]. NBS patients elicit neither ataxia nor telangiectasia [116]. *NBS1*-mutated cells are characterized by chromosomal instability, and their radiosensitivity may be considered as hyper-radiosensitivity even if it is systematically lower than that observed in AT cells [4,116–118]. *NBS1*-mutated cells show a lack of cycle arrest in G1 [116]. Two groups of complementation V1 (Berlin syndrome) and V2 (Nijmegen's syndrome) were described with the same absence of cycle arrest in G1 [119,120]. However, some studies have reported that there is only one *NBS1* gene and that it is located on chromosome 8 [121–123]. The NBS1 protein (also called nibrin) may serve as a phosphorylation substrate of ATM with seven SQ/TQ domains [124]. As a scaffold for the RAD50-MRE11-NBS1 complex, in NBS cells, the NBS1 protein is absent in NBS cells, and MRE11 and RAD50 are cytoplasmic, suggesting that these two proteins may serve as X-proteins in the case of mutations of the *NBS1* gene [125] (see also below).

Mutations of *MRE11* have been initially identified in three patients whose fibroblasts have been found radiosensitive and deficient in DNA damage repair. The radiosensitivity associated with mutations of *MRE11* is lower than with *NBS1* mutations [126]. Historically, the first identified family with homozygous mutations of *MRE11* showed similar clinical features to AT but with less pronounced intensity. The associated syndrome has been therefore called Ataxia–Telangiectasia-Like Disorder (ATLD) [126]. After identifying other families, ATLD is now considered as a neurological syndrome with radiosensitivity comparable to NBS but associated neither with immunodeficiency nor with high susceptibility to cancer [127–129]. With seven SQ/TQ domains, MRE11 is a phosphorylated substrate of ATM that is localized in both the cytoplasm and nucleus and provides nuclear foci after exposure to IR in an ATM-dependent manner. We have shown that cancer syndromes are generally associated with the formation of MRE11 foci early (some minutes) after irradiation while aging syndromes are generally associated with the formation of late foci (24 h) after irradiation [5].

Finally, the case of a patient showing a mutation of *RAD50* has been described in 2009 with microcephaly, mental retardation, a bird face, and a small stature [130]. This *RAD50*-mutated patient developed a malignant lymphoma at the age of 23 without se-

vere immunodeficiency. The cells from this patient elicited radiosensitivity similar to those observed with NBS. Such a syndrome has been called Nijmegen Breakage Syndrome Like-Disorder (NBSLD) [130]. With seven SQ/TQ domains, the RAD50 protein is phosphorylated by ATM at Ser-635 that plays an important adaptor role in signaling for cell cycle control and DNA repair [131,132]. However, in the cells from the single NBSLD case, the MRE11 protein predominantly appeared cytoplasmic, and the RAD50 protein was absent [130].

Altogether, this brief review about the mutations of the RAD50-MRE11-NBS1 complex reveals that all the components of the complex are some ATM phosphorylation substrates, and the mutation of one component may lead to the cytoplasmic localization of at least one of the other components of the RAD50-MRE11-NBS1 and to at least the possibility of sequestering ATM and preventing rapid RANS.

### 3.1.3. Mutations of the Nucleotide and Base Excision Repair Genes

The single-strand annealing (SSA) pathway has been defined only in vitro with very specific sequences (short DNA sequences in which some reporter genes have been placed very close (few hundred bases) to each other) [133,134]: in such a limited and specific DNA sequence system, even a random phenomenon can lead to a faithful repair. Hence, caution must be taken about any in vivo extrapolation of the SSA phenomenon since coding sequences are generally much more spaced and the genome is much longer than the sequences used for the investigations about SSA. Lastly, few proteins have been considered specific to SSA, which relativizes again the existence of such a repair pathway in vivo, especially in response to IR [4].

It has been shown that ligase III, PARP, XRCC1 are the major proteins involved in the base excision resynthesis (BER) [135,136]. However, no genetic syndrome has been associated with mutations of the BER proteins in humans. Such a situation is similar to that discussed above with the Ku heterodimer and with the RAD51 and RAD52 proteins: XRCC1, PARP, ligase III, and DNA polymerase  $\beta$  are proteins required for DNA damage recognition (here BD recognition). They may be so abundant and essential for survival that their mutations systematically lead to a loss of viability: the homozygous mutations of these three genes are lethal at the embryonic state. However, the literature regularly reports diseases associated with BER defects or impairments, but these are generally either the syndromes already mentioned whose mutated genes are not directly involved in BER, or else polymorphisms [136]. Lastly, PARP inhibitors are currently used in the treatments of *BRCA1/2*-mutated tumors in which DNA breaks accumulate until cell killing [137].

Unlike SSA and BER, the nucleotide excision resynthesis (NER) pathway involves many proteins acting from BD recognition to final DNA sequences polymerization, whose mutations may cause human syndromes associated with cancer, radiosensitivity or even photosensitivity. Particularly, the mutations of some *XP* genes involved in the transcription factor II H (TFIIH) complex, essential for a functional NER, can cause xeroderma pigmentosum syndrome (XP). XP is dispatched in several groups of complementation [138,139]. Some XP proteins are involved in the NER as endonucleases, helicases, or oriented polymerases. This is notably the case of *XP-A* to *XP-G* *XP-G*, whose mutations are linked to photosensitivity, neurodegeneration and/or brain or skin cancer [139–141]. In addition, some complementation groups such as XPD may be also associated with moderate radiosensitivity, suggesting some role in DSB repair and signaling [23,142]. All the mutations of *XP-A* to *XP-G* genes may cause misrepaired BD, SSB and/or DSB [4]. All the *XP-A* to *XP-G* genes hold SQ/TQ domains and show cytoplasmic forms when mutated, suggesting that ATM may phosphorylate and interact with them in the cytoplasm. For example, some specific mutations of XPD were shown to sequester ATM in the cytoplasm after exposure to IR and lead to cancer proneness and radiosensitivity [23].

Often necessary during or after the DNA strands exchange process, the RECQ helicases are inextricably linked to the maintenance of genome integrity. The RECQ family contains three proteins identified in humans, including WRN, BLM, RECQL4 [143,144]. Mutations

of *BLM*, *WRN* and *RECQL4* cause Bloom (*BLM*), Werner (*WRN*) and Rothmund–Thompson (*RTS*) syndromes, respectively. The *BLM*, *WRN* and *RECQL4* proteins show nuclease domains, which support their involvement in hyper-recombination processes [145–147]. In addition to growth disorders and accelerated aging, these three syndromes have in common a strong predisposition to sarcoma. With regard to aging and predisposition to early senescence, it can be hypothesized that an instable helicase–endonuclease complex would be responsible of the generation of spontaneous breaks that may promote a senescence phenomenon [145–147]. All these syndromes are associated with significant but moderate radiosensitivity [1].

The *WRN* and *BLM* proteins hold SQ/TQ domains and have been shown to be phosphorylated by ATM [148,149]. The *WRN* and *BLM* cells show cytoplasmic forms [150,151]. With regard to *RECQL4* cells, we recently pointed out the existence of the SQ/TQ domain, the cytoplasmic forms of some mutated *RECQL4* proteins, and the delay of RANS.

#### 4. Mutations of Mismatch Repair Genes

Human non-polyposis hereditary colon cancers (HNPCC) syndromes are often grouped under the name of Lynch syndrome (LS), even though some physicians distinguish both [152–154]. HNPCC syndromes are caused by mutations of DNA mismatch repair genes (MMR) [155]. MMR is a DNA damage repair and signaling pathway that manages erroneous insertions or deletions of bases during DNA replication (S phase) and recombination (mitosis) [156]. Such a pathway is therefore particularly active in proliferating cells and tissues. By highlighting the biases raised by the extrapolation from micro-organisms to mammals evoked above, it is noteworthy that many MMR genes found in yeasts do not exist in humans. Mutations of the MMR *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* and *hPMS2* genes are responsible for many forms of HNPCC [152–155]. HNPCC show a high susceptibility to colon cancer but also to endometrial, ovarian, stomach, small intestine, liver, upper urinary tract, brain, and skin cancers [153,157]. HNPCC are generally characterized by chemosensitivity and moderate radiosensitivity. However, some cases of severe radiosensitivity have been reported but always in the context of Turcot syndrome (TS), a pathology often associated with the mutation of *hMSH2* [158]. Intestinal pathologies generally associated with mutations of the *APC* gene may also be associated with MMR gene mutations: familial recto-colic polyposis and attenuated forms of familial recto-colic polyposis, Gardner syndrome (GS) and Turcot syndrome [154,158]. The last two syndromes are associated with other tumors such as osteomas, fibroids, lipomas and thyroid or adrenal tumors for GS and central nervous system tumors for TS [154,158]. Although polyposis is generally associated with mutations of the *APC* gene, mutations of *hMSH2* can also cause TS as mentioned above. Both GS and TS are associated with significant but moderate radiosensitivity. However, the biological functions of the *APC* gene are still unknown, but some studies have reported a role of *APC* in the regulation of mitosis microtubules, which cannot explain the radiosensitivity observed in quiescent cells derived from these syndromes [1,158].

The *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS2* and *APC* proteins hold SQ/TQ domains, show cytoplasmic localization when mutated and can interact with ATM [159,160].

#### 5. Diseases of Cell Cycle Checkpoint Control

##### 5.1. A Lack of Control of the Cell Cycle Checkpoint, Another Requirement for Carcinogenesis?

In the frame of the most current models of carcinogenesis, including the initiation/promotion/progression model, one mutation in one cell or even one mutation in several cells does not necessarily lead to cell transformation and cancer [111]. An amplification of the number of cells holding mutations is therefore required to ensure the formation of a pre-tumor. Such amplification may occur when the cell cycle checkpoints are impaired. Let us review the major diseases of the cell cycle checkpoint control.

### 5.2. Overgrowth Syndromes

The PI3K kinase is composed of an 85 kDa regulatory subunit and a 110 kDa catalytic subunit. Among the numerous variants of these subunits, the p110 $\alpha$  one, called PI3KCA, has been shown to be involved in the control of cellular proliferation. Some somatic mosaic mutations of the *PI3KCA* gene are associated with overgrowth syndromes called PI3KCA-related overgrowth spectrum (PROS) syndromes [161–165]. Some cases of cancers have been reported in the PROS patients [164,165]. All these syndromes are associated with overgrowth malformations in skin, vasculature, bones or brain tissues due to somatic mosaic heterozygous mutations leading to overactivity of the PI3K kinase [161–165]. ATM and PI3K kinases have been shown to interact and activate in response to genotoxic stress [161,166,167]. Recently, we have shown that PROS syndromes are associated with radiosensitivity and radiosusceptibility: some mutations of the *PI3KCA* gene lead to the over-expression of cytoplasmic forms that, as substrates of ATM, result in a delayed RIANS [161].

Proteus syndrome, which does not belong to the PROS syndromes family, is characterized by tissue overgrowth, and hyperplasia of multiple tissues may also be associated with high susceptibility to the development of tumors. Proteus syndrome is caused by somatic activating mutations of the *AKT1* gene, which triggers activation of the PI3K-AKT pathway [168]. The pleckstrin homology domain of AKT binds to the cellular membrane via its affinity for PI molecules phosphorylated by PI3K, which stimulates cell proliferation and invasiveness. Cytoplasmic ATM was found to be an upstream activator of AKT1, and both proteins are involved in a common pathway with PI3K that promotes cell proliferation when altered or hyperactivated [169,170].

The PTEN protein is a phosphatase responsible of the dephosphorylation of PI molecules, which inhibits the PI3K-AKT signaling pathway described above [171,172]. In the case of *PTEN* mutations, the PI3K-AKT signaling pathway is activated, which stimulates cell proliferation and invasiveness [171–175]. Inherited mutations of the *PTEN* gene notably cause Cowden disease associated with a high risk of developing breast cancer [176]. The *PTEN*-mutated cells were found to be sensitive to radiation [177]. ATM is known to phosphorylate PTEN in the cytoplasm, which triggers its translocation from the cytoplasm to the nucleus in response to oxidative stress [178].

### 5.3. Mutations of the *CHK1* and *CHK2* Genes

Checkpoint kinases 1 and 2, namely *CHK1* and *CHK2*, are serine/threonine kinases that coordinate cell cycle response to genotoxic stress and are generally activated by the phosphorylation of both ATM and ATR kinases [15,179,180].

*CHK1* is particularly required for G2/M arrest in response to IR [15,180]. However, while *CHK1* gene overexpression (as its non-phosphorylated form) has been reported in several tumor models, no germline *CHK1* mutation has been detected in any cancer syndrome. Conversely, heritable mutations within the *CHK1* C-terminal regulatory domain have been recently shown to cause female infertility in humans through the blockage of oocytes in their first mitosis [180].

Unlike *CHK1*, *CHK2* phosphorylated by ATM is required for ensuring G1 arrest in response to IR [15,179]. Again, unlike *CHK1*, several *CHK2* mutations have been observed in different types of cancers, including prostate, colon, lung, thyroid and mainly breast cancers. Hence, to date, *CHK2* is considered as a tumor suppressor gene, a phosphorylation substrate of ATM [181]. Overexpression and cytoplasmic localization of *CHK2* was observed in a large subset of tumors and are associated with genomic instability and high levels of DNA damage [182,183].

### 5.4. Mutations of the *BRCA1*, *BRCA2*, *FANC* Genes

While the *BRCA1* and *BRCA2* proteins have almost the same acronyms, they do not share identical sequences or domains [184]. The *BRCA1* protein is a large protein (220 kDa), and two major structural domains have been identified: a RING domain in its



N-terminal region, and a tandem of two BRCT (BRCA1 C-terminal) domains [185,186]. This last domain is found in many proteins involved in DNA damage repair (e.g., LIG4) and cell cycle checkpoint control (e.g., p53) [187]. Furthermore, BRCA1 holds 13 SQ and 3 TQ domains that are specifically phosphorylated by ATM and ATR kinases [19]. The phosphorylation of BRCA1 by ATM in response to IR leads to the formation of nuclear foci [188,189]. Except for the three identified domains, RING, BRCT and the SQ/TQ cluster, no other functional sites such as kinase, ligase, nuclease, etc., have been identified in the *BRCA1* sequence [190]. The BRCA1 protein is localized both in the nucleus and cytoplasm and acts as a scaffold protein for a multitude of ATM phosphorylation substrates [188,189]. Homozygous mutations of *BRCA1* are not viable in humans. Heterozygous mutations of *BRCA1* lead to inherited breast cancer syndromes but are also seen in about 18% of ovarian cancers and represent a significant factor of risk for other cancers such as prostate cancers [191–194]. Mutations in the C-terminal BRCT domains of the BRCA1 protein result in cytoplasmic mislocalization [195–197].

BRCA2 has a molecular weight of 384 kDa and is a protein larger than BRCA1. BRCA2 contains BRC domains different from the BRCT domains observed in the *BRCA1* sequence. Similar to BRCA1, the BRCA2 protein serves as a scaffold and has many protein partners, including the ATM kinase [191]. Similar to *BRCA1*, homozygous mutations of *BRCA2* do not exist in humans since they cause lethality at the embryonic state. Heterozygous mutations of *BRCA2* are the cause of inherited ovarian cancers and male breast cancers [110,190,198].

The BRCA1 and BRCA2 proteins are essential for the action of RAD51 and RAD52 in active HR in the G2/M phase [189]. Interactions between BRCA1 and MRE11 have also been described, reinforcing the hypothesis that BRCA1 may participate in both HR and NHR processes [199,200]. Most *BRCA1* and *BRCA2* mutations confer a moderate radiosensitivity in G1 comparable to that observed in the case of *MRE11* mutations [201]. Some mutations of *BRCA1* and *BRCA2* are also associated with high chemosensitivities, particularly to alkylating agents such as cis-platinum [201,202]. However, some studies about the RI cascade of phosphorylations of ATM substrates show that BRCA1 and BRCA2 should be considered more as cell cycle checkpoint proteins than as DNA repair proteins since the kinetics of RI phosphorylation of BRCA1/2 proteins are slower than the molecular events involved in DNA damage recognition and repair [15].

The Fanconi anemia (FA) complementation group (FANC) gathers 14 FANC proteins that are involved in post-replication repair and in cell cycle checkpoint control [203,204]. Most of them interact with BRCA1/2 proteins and ATM (FANCD2 and BRCA2 are the same protein) [110,205]. Furthermore, such as the BRCA1/2 proteins, the FANC proteins have no active domain for ensuring a specific enzymatic function. Mutations of the FANC proteins cause Fanconi anemia (FA) syndrome that was first described by the Swiss pediatrician Guido Fanconi in 1927 [206–208]. FA is one of the major hereditary syndromes of spinal cord failure. It is often associated with congenital malformations (including microcephaly), growth defects (small size), skin disorders (café-au-lait spots) and generally progresses to aplasia or leukemia. The predisposition to FA-related cancer is not limited to lymphocytes, but also extends to breast cancer. Rather characterized by their chemosensitivity, cells from FA patients show low but significant radiosensitivity [206,209–211]. Although the FANC proteins hold numerous SQ/TQ domains, the phosphorylation of FANC by ATM has been described only for FANCD2/BRCA2 [191,209]. In addition, since nearly all the FANC proteins show cytoplasmic forms, whether mutated or not, mutations of the *FANC* gene may lead to a sequestration of ATM by FANC proteins. However, further experiments are needed to confirm this hypothesis.

##### 5.5. Mutations of the RB1 and P53 Genes

The pRB protein, a product of the *RB1* gene, acts as a negative regulator of the cell cycle, notably by blocking cells in G1 phase through its non-phosphorylated form. In proliferating cells, the cyclin-dependent kinase complexes phosphorylate pRB, which liberates the E2F transcription factor and favors the transition to S phase [212,213]. Heterozygous germline

*RB1* mutations cause retinoblastoma syndrome (RB), a rare pediatric disease associated with tumors in retina cells [214–217]. The pRB protein is also a phosphorylation substrate of the ATM kinase, and we have shown that skin fibroblasts from RB patients elicit moderate but significant radiosensitivity associated with delayed RANS caused by the cytoplasmic overexpression of some mutated pRB proteins [24].

The p53 protein is the most documented of the human transcription factors and is involved in the cell cycle checkpoint and in some specific cellular death pathways [218–220]. Again, from studies about the R cascade of phosphorylations of ATM substrates, p53 cannot be considered as a DNA damage repair protein since its activation appears later than the DNA damage recognition and repair step [15]. Similar to the pRB and BRCA1/2 proteins, p53 is phosphorylated by the ATM kinase in response to IR [15]. While homozygous mutations of the *p53* gene are lethal in the embryonic state, heterozygous mutations of *p53* cause Li-Fraumeni syndrome (LFS), associated with predisposition to rhabdomyosarcoma, but also to multiple cancers such as in muscles, breast, bones, and blood cancers [221,222]. Similarly to pRB, we have shown that skin fibroblasts from LFS patients elicit moderate but significant radiosensitivity associated with delayed RANS caused by the cytoplasmic overexpression of some mutated p53 proteins [222].

## 6. Cancer Syndromes and the R ATM Nucleoshuttling Model

Some cancer syndromes may be caused by mutations of genes whose protein products are directly involved either in DNA repair and signaling or in cell cycle checkpoint control. Such diseases therefore raise the question of the molecular mechanisms of carcinogenesis. Let us review the molecular and clinical features of the major ones.

### 6.1. Mutations of the *NF1*, *NF2*, *TSC1* and *TSC2* Genes

The *NF1* gene encodes for the neurofibromin 1 protein, a GTPase-activating protein involved in neural development. Furthermore, neurofibromin was reported to modulate the *Ras*-dependent oncogenic pathways, which may favor abnormal proliferation [223]. However, considering individual specificities, the *NF1* gene cannot be considered as directly involved in cell cycle checkpoint control such as *CHK1* or *CHK2*. The heterozygous mutations of neurofibromin cause neurofibromatosis type 1 (NF1) syndrome associated with *benign* tumors along the peripheral and optic nerves and malignant tumors such as neurofibrosarcomas, astrocytomas, and rhabdomyosarcomas [224–228]. A study has shown that the neurofibromin 1 protein was a substrate of ATM kinase and that cells from NF1 patients elicit a moderate but significant radiosensitivity associated with delayed RANS caused by the cytoplasmic overexpression of the mutated neurofibromin [13].

The *NF2* gene encodes for the neurofibromin 2 protein (also called schwannomin or moesin–ezrin–radixin (merlin) protein), which is a cytoskeletal protein. Neurofibromin 2 is considered as a scaffold protein linking transmembrane receptors, factors of cell adhesion, small GTPases, mTOR- and PI3K/AKT-dependent pathways proteins [223,229]. Loss of function mutations or deletions in *NF2* genes cause neurofibromatosis type 2 (NF2) syndrome associated with a multiple-tumor-forming disease of the nervous system and notably schwannomas, meningiomas and ependymomas [229,230]. Even if the clinical consequences of the mutations of *NF2* gene strongly suggest that it is a tumor suppressor gene, the biological role of the merlin is not documented enough to consider it as directly involved in DNA damage repair and signaling and/or in the cell cycle checkpoint control. Preliminary experiments in our lab reveal that fibroblasts from NF2 patients show a moderate but significant radiosensitivity (N.F., personal communication). Although the merlin protein holds one TQ domain, no ATM phosphorylation of the merlin protein has been described yet. Conversely, the merlin protein was shown to be cytoplasmic in G0/G1 and mitosis but nuclear in S phase, through the mediation of its phosphorylation by AKT1 in serine 518, hence describing a cell-cycle-dependent nucleoshuttling [231]. Further experiments are needed to examine whether ATM and merlin proteins interact in cytoplasm in cells from NF2 patients.

The *TSC1* and *TSC2* genes encode for the hamartin [232,233] and the tuberlin [232,234] proteins, respectively, that interact with a very large multiprotein complex called the tuberous sclerosis complex (TSC). Both proteins are involved in the regulation of cell growth control and the activity of the target of rapamycin (TOR) complex 1 (TORC1). However, their direct role in cell proliferation remains to be more documented [235–239]. Heterozygous mutations of either of the two *TSC1* and *TSC2* genes cause the TSC syndrome [240,241]. TSC is associated with high incidence of angiofibroma, astrocytoma, renal angiomyolipoma and lymphangiomyomatosis [232,242]. Recently, it was reported that fibroblasts from TSC patients show a moderate but significant radiosensitivity and that TSC and ATM dynamically interact in response to IR. In cells from TSC patients, hamartin was found overexpressed in cytoplasm and complexed with ATM, therefore causing a delayed RIANS [12].

### 6.2. Requirement of Both Impaired DNA Damage and Cell Cycle Checkpoints

Literature data and this review suggest that carcinogenesis and cell transformation require both misrepaired DNA damage that generates DNA sequence errors and impaired cell cycle checkpoint control that facilitates cell proliferation and therefore errors propagation. These two steps are consistent with the hypothesis of initiation and promotion steps proposed by several oncologists [111]. As evoked above, the cancer and radiosensitivity syndromes described in this review may be therefore classified into three categories (Figure 2):

Category 1: the cancer syndromes caused by mutations of genes directly involved in DNA damage recognition, repair and signaling pathway. Considering the importance of DNA damage recognition and repair in cell viability, these syndromes are generally very rare (prevalence of about 1/100,000), recessive and caused by hypomorphic mutations leading to a partial loss of the function of the gene. However, two subcategories can be considered according to the importance of the mutated gene and the associated radiosensitivity quantified by the cell survival at 2 Gy (SF2). Radiosensitivity can be either extreme ( $10\% < SF2 < 30\%$ ) such as *LIG4* syndrome or moderate ( $30\% < SF2 < 60\%$ ) such as Artemis syndrome [4,5]. All these gene products are substrates of ATM and may localize in cytoplasm when mutated. The gene mutations may explain misrepaired DNA damage. However, how can the resulting sequence errors be propagated through impaired cell cycle checkpoints?

Category 2: the cancer syndromes caused by mutations of the genes directly involved in the cell cycle checkpoint control. These syndromes are more frequent than the first category (prevalence is higher than 1/40,000), are generally dominant and are caused by heterozygous mutations. One of the most representative examples of such syndromes is Li-Fraumeni syndrome (heterozygous *p53* mutations). Their associated radiosensitivity is moderate but significant ( $30\% < SF2 < 60\%$ ) [4,5]. Again, all these gene products are substrates of ATM and may localize in the cytoplasm when mutated. The gene mutations may explain the impairment of the cell cycle checkpoints that lead to the propagation of errors. However, how can the misrepaired DNA damage be generated with such gene mutations?

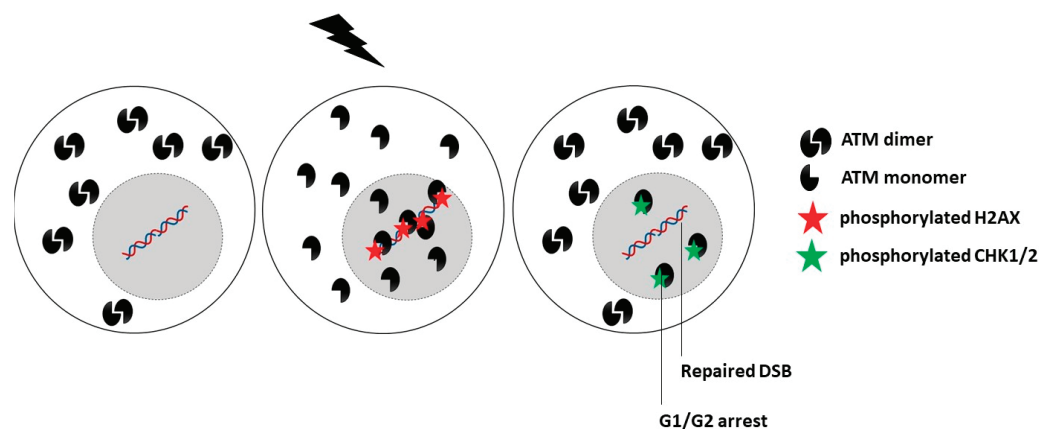
Category 3: the cancer syndromes caused by mutations of genes that are directly involved either in DNA damage recognition, repair and signaling pathway or in the cell cycle checkpoint control. The gene mutations that cause these syndromes may be homozygous, heterozygous or de novo, which explains why their prevalence can be lower than the syndromes from Category 2. One of the most representative examples of such syndromes are the PROS syndromes. Their associated radiosensitivity is moderate but significant ( $30\% < SF2 < 60\%$ ) [4,5]. Again, all these gene products are substrates of ATM and may localize in the cytoplasm when mutated [12,13]. How can the misrepaired DNA damage be generated and propagated with such gene mutations?

Altogether, these categories raise the question of gene mutations that would lead to two concomitant but distinct molecular and cellular consequences, one in DNA damage

recognition and repair and the other in cell cycle checkpoint control. Throughout the RI ATM nucleoshuttling (RIANS) model that is now very documented [20], let us propose a mechanistic model to integrate these three categories of syndromes in a unique explanation.

### 6.3. The ATM Nucleoshuttling Model: A Possible Explanation for Carcinogenesis?

While the upstream action of the ATM protein in the predominant DNA damage repair and signaling pathways, notably in NHEJ, suggests a nuclear sublocalization, some authors have reported that ATM is also a cytoplasmic protein [22,243–245]. By analyzing hundreds of fibroblast cell lines derived from cancer patients eliciting a large spectrum of post-radiotherapy radiosensitivity, it appears that IR triggers a drastic change in the subcellular localization of ATM. As evoked above, in quiescent cells, after exposure to IR, the cytoplasmic ATM dimers dissociate as ATM monomers and diffuse in the nucleus. Once in the nucleus, ATM monomers phosphorylate H2AX histone protein ( $\gamma$ H2AX), which triggers the activation of NHEJ [20–22]. However, in the nucleus, ATM monomers also phosphorylate some other ATM substrates such as MRE11 (which limits the nuclease activity of the RAD50–MRE11–NBS1 complex evoked above) and CHK1 and CHK2 proteins (which trigger cell cycle arrest in G2/M and G1, respectively) [15,20]. Nevertheless, in cells that show moderate but significant radiosensitivity, RIANS is delayed by the overexpression of cytoplasmic substrates of ATM, which sequester the RI ATM monomers in the cytoplasm. Such a model was confirmed by both immunoblots and proximity ligation assays [20,21,246]. These ATM substrates, called X-proteins, are generally the proteins mutated specifically in the syndrome considered [5,8,18,20,21] (Figure 3). Hence, the RIANS model integrates the hypothesis that two distinct biological functions may be impaired as discussed in Section 1.3. A mutation of an X-protein may lead to: (1) the impairment of its intrinsic biological function as a single protein, and (2) the impairment of some biological functions caused by the X-protein as a cytoplasmic ATM substrate.

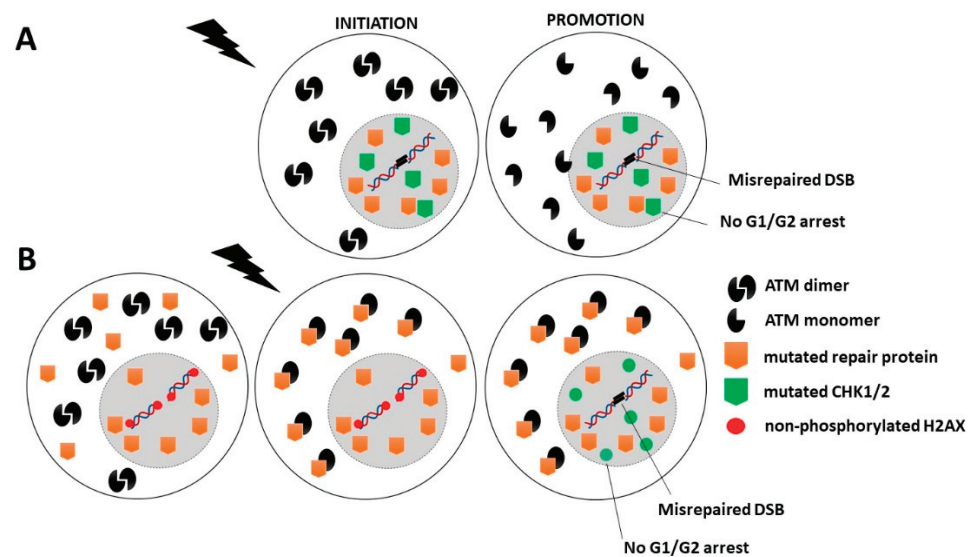


**Figure 3.** Schematic representation of the RIANS model in radioresistant cells. A rapid RIANS leads to the ATM-dependent recognition of all the DSB induced by IR via the NHEJ pathway, their complete repair, and phosphorylation of the CHK proteins that induce G1/G2 arrest.

Hence, the RIANS model permits to revisit the three categories of cancer syndromes defined above by providing a relevant unified model.

Category 1: Two subcategories can be considered. In the first one, mutations of crucial genes directly involved in the DNA damage recognition, repair and signaling that do not result in an embryonic state (such as *ATM* and *LIG4* mutations) produce a level of misrepaired DNA breaks and genomic instability that is so high that it also produces mutations in some other genes involved in the cell cycle checkpoint control. The spontaneous (p14; q11) chromosome exchanges currently observed in *ATM*-mutated cells are a representative example of cytogenetic events that may concern more than one gene [32,33,247]. In other terms, in this category of cancer syndromes, the initiation and

promotion steps may occur concomitantly [4,18]. This is notably the case of *ATM*- and *LIG4*-mutations (Figure 4A and Table 1). In the second subcategory, the mutations of less crucial DNA damage recognition and repair genes may result in high cytoplasmic expression of the gene products (as X-proteins). Such expression of X-proteins may lead to delayed RIANS, which limits DSB recognition through incomplete  $\gamma$ H2AX phosphorylation and G2/M and G1 arrests through incomplete CHK1 and CHK2 phosphorylation. Hence, in this subcategory, the mutated protein, as an impaired contributor of DNA damage recognition and repair, favors errors formation, while the mutated protein, as an X-protein, delays the RIANS, which favors their propagation via impaired phosphorylation of cell cycle checkpoint control proteins. This is notably the case of some *XPD* mutations (Figure 4B, Table 1).



**Figure 4.** Schematic representation of the RIANS model in cells from Category 1 cancer syndromes. (A) First subcategory: Mutated genes are crucial for DNA damage recognition and repair. In this case, the genomic instability is so high that some spontaneous mutations may also affect cell cycle checkpoint control. (B) Second subcategory: Mutated genes are involved in DNA damage recognition and repair but are not crucial. The encoded proteins are X-proteins. The RIANS is delayed by the cytoplasmic overexpression of X-proteins, and few ATM monomers enter in the nucleus. Consequently, CHK proteins are not phosphorylated, and therefore G1/G2 arrests are impaired.

**Table 1.** Molecular and cellular features of the major syndromes associated with both cancer and individual radiosensitivity.

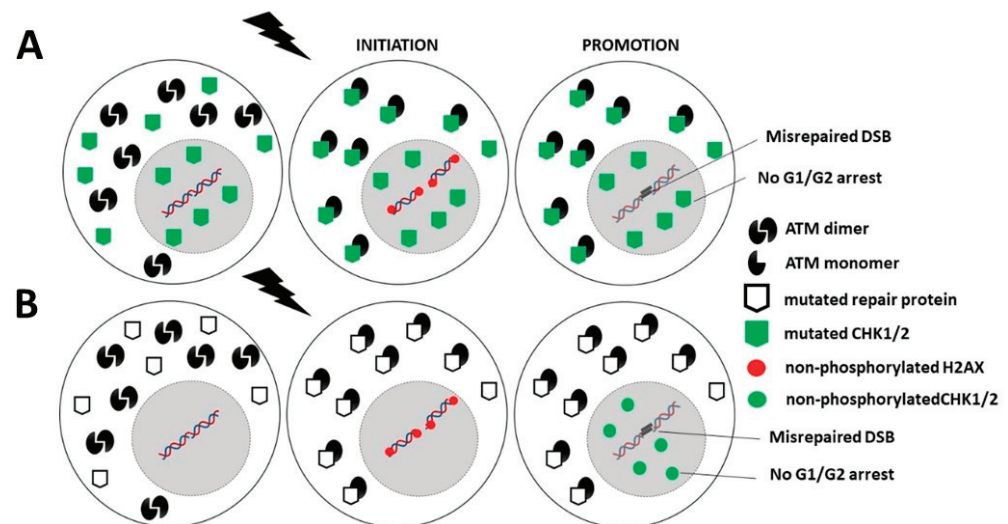
Cancer Syndrome Category	Gene	Protein	Involvement in DNA Repair	Involvement in Cell Cycle Checkpoint	Syndrome	Type of Cancer	SF2 (%)
Category 1	<i>ATM</i>	ATM	X	-	Ataxia Telangiectasia	Leukemia/Lymphoma	1–5
	<i>ATR</i>	ATR	X	-	Seckel Syndrome	Leukemia	40–50
	<i>LIG4</i>	DNA Ligase 4	X	-	LIG4 syndrome	Lymphoma	2–6
	<i>XRCC4</i>	XRCC4	X	-	Microcephalic Primordial Dwarfism	-	nd
	<i>Art/DCLRE1C</i>	Artemis	X	-	Artemis Syndrome	Lymphoma	30–50
	<i>XLFI/Cernunnos</i>	XLFI/Cernunnos	X	-	Cernunnos Syndrome	Lymphoma	30–50
	<i>RAG1</i> and <i>RAG2</i>	RAG1 and RAG2	X	-	Omenn Syndrome	Hepatocarcinoma	30–50
	<i>NBS</i>	NBS1	X	-	Nijmegen Syndrome	Lymphoma	5–9
	<i>MRE11</i>	MRE11	X	-	Ataxia–Telangiectasia-Like Disorder	Diverse	15–30
	<i>RAD50</i>	RAD50	X	-	Nijmegen Breakage Syndrome-Like Disorder	Lymphoma	15
	<i>XPA</i> to <i>XPG</i>	XP-A to XP-G	X	-	Xeroderma Pigmentosum	Brain and/or skin	15–30
	<i>BLM/RECQL2</i>	BLM	X	-	Bloom Syndrome	Sarcoma	15–40
	<i>WRN/RECQL3</i>	WRN	X	-	Werner Syndrome	Sarcoma	20–55
	<i>RTS/RECQL4</i>	RTS	X	-	Rothmund-Thompson	Sarcoma	30–50
	<i>MMR</i> ( <i>hMLH1</i> , <i>hMSH2</i> , <i>hMSH6</i> , <i>hPMS2</i> )	MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)	X	-	Human Non-Polyposis Hereditary Colon Cancers Syndrome or Lynch Syndrome	Colon, endometrial, ovarian, stomach, small intestine, liver, upper urinary tract, brain, and skin cancers	30–50
	<i>hMSH2</i>	MSH2	X	-	Turcot Syndrome	Brain and colon	21–30
	<i>APC</i>	APC	X	-	Gardner Syndrome and Turcot Syndrome	Diverse for Gardner and CNS tumors for Turcot	18–30

Table 1. Cont.

Cancer Syndrome Category	Gene	Protein	Involvement in DNA Repair	Involvement in Cell Cycle Checkpoint	Syndrome	Type of Cancer	SF2 (%)
Category 2	<i>PI3KCA</i>	PI3K	-	X	PROS Syndromes	Skin, vasculature, bones, brain	35–40
	<i>AKT1</i>	AKT	-	X	Proteus Syndrome	Diverse	nd
	<i>PTEN</i>	PTEN	-	X	Cowden Disease	Breast cancer	nd
	<i>CHK2</i>	CHK2	-	X	-	Prostate, colon, lung, thyroid, and breast cancer	nd
	<i>BRCA1</i>	BRCA1	-	X	Inherited Breast Cancer, Ovarian Cancer	Inherited breast cancer, ovarian cancer	30–50
	<i>BRCA2</i>	BRCA2	-	X	Inherited Ovarian Cancer and Male Breast Cancer	Inherited ovarian cancer and male breast cancer	20–40
	<i>FANC</i>	FANC	-	X	Fanconi Anemia	Leukemia and breast cancer	15–40
	<i>RB1</i>	pRB	-	X	Retinoblastoma Syndrome	Retina cancer	25–35
Category 3	<i>p53</i>	p53	-	X	Li-Fraumeni	Diverse	20–50
	<i>NF1</i>	NF1 (neurofibromin 1)	-	-	Neurofibromatosis type 1 Syndrome	Benign optic nerve tumor and neurofibrosarcomas, astrocytoma and rhabdomyosarcoma	15–35
	<i>NF2</i>	NF2 (schwannomin or merlin protein)	-	-	Neurofibromatosis type 2 Syndrome	Nervous system and schwannomas, meningiomas and ependymomas	12–30
	<i>TSC1</i>	Hamartin protein	-	-	TSC Syndrome	Angiofibromas, astrocytomas, renal angiomyolipomas and pulmonary lymphangioleiomyomatosis	15–30
	<i>TSC2</i>	Tuberin	-	-	TSC Syndrome	Angiofibromas, astrocytomas, renal angiomyolipomas and pulmonary lymphangioleiomyomatosis	nd

Nd: not determined.

Category 2: Mutations of genes directly involved in the cell cycle checkpoint control are generally heterozygous mutations and are associated with a high expression of cytoplasmic forms of the protein. This is notably the case of PI3KCa [161], p53 [201,222], or pRB proteins [24]. These abundant cytoplasmic X-proteins contribute to sequester the ATM monomers and therefore lead to a decrease in the flux of ATM monomers entering in the nucleus. Consequently, less DSB are recognized by NHEJ, and the number of misrepaired DSB increases. Hence, in this category, the mutated protein, as an X-protein, delays the RIANS, which favors error formation, while the mutated protein, as an impaired contributor to cell cycle checkpoint control, favors their propagation (Figure 5A and Table 1).



**Figure 5.** Schematic representation of the RIANS model in cells from Category 2 and 3 cancer syndromes. (A). Category 2: Mutated genes are involved in cell cycle checkpoint control. The encoded proteins are X-proteins. The RIANS is delayed by the high cytoplasmic expression of X-proteins, and few ATM monomers enter into the nucleus. Consequently, few DSB are recognized by NHEJ and therefore may be misrepaired. (B). Category 3: Mutated genes are directly involved either in DNA damage recognition and repair or in the cell cycle checkpoint control. The encoded proteins are X-proteins. The RIANS is therefore delayed by the cytoplasmic overexpression of X-proteins, and few ATM monomers may enter into the nucleus. Consequently, few DSB are recognized by NHEJ and therefore may be misrepaired. Furthermore, CHK proteins are not phosphorylated, and therefore, G1/G2 arrests are impaired.

Category 3: Mutated genes that are directly involved either in DNA damage recognition and repair or in the cell cycle checkpoint control may also be associated with high cancer proneness if they are X-proteins. Their heterozygous mutations are responsible for their high expression in the cytoplasm. Thus, as described above, the resulting sequestration of RI ATM monomers contributes to reducing the flux of ATM monomers in the nucleus, to decreasing the DSB recognition by NHEJ and to increasing the number of misrepaired DSB. In addition, a delayed RIANS may also decrease the phosphorylation of CHK1 and CHK2 by ATM in the nucleus, which may impair the G2 and G1 arrests, respectively (Figure 5B, Table 1).

#### 6.4. What Are the Limits of the Validity of the RIANS Model?

All the genes whose mutations that cause cancer and radiosensitivity syndromes show SQ/TQ domains: they have been identified or considered as phosphorylation ATM substrates and may present cytoplasmic forms, at least, when mutated, suggesting that the RIANS model may unify the three categories of syndromes defined above. However, the validity of our model should be discussed in three specific conditions of irradiation, at



least: the influence of cell cycle, the effect of linear energy transfer (LET) and the influence of low dose, which all may act in cancer proneness and radiosensitivity.

In the frame of the RIANs model, all the DNA damage is supposed to be induced in the G0/G1 phase. In this specific cell cycle phase, the NHEJ repair pathway is predominant. In these conditions, the propagation of errors is mostly conditioned to the impairment of G1/S arrest to reach the G2/M phase. By contrast, the RIANs model is not relevant for the G2/M cells since ATM nucleoshuttling does not exist in this phase. Hence, the model proposed here may be completed with mechanisms describing the fate of the DNA damage when induced during the G2/M phase. In this phase, the HR repair pathway is predominant. More specifically, the role of HR to manage the DNA breaks generated by IR in the G2/M phase should be integrated into the RIANs model together with the HR/NHEJ balance that may be dependent on ATM but also on ATM substrates such as MRE11 or BRCA1 [49].

LET is an important factor influencing both cancer induction and radiosensitivity. The RIANs model has been shown to be relevant whatever the LET value. Particularly, the spatial and density distribution of the energy depositions that occur after irradiation is specific to each particle or rays. Notably, the spatial and density distribution of the energy deposition conditions the level of oxidative stress that causes RI ATM monomerization in the cytoplasm and RI DNA breaks in the nucleus. Hence, the ratio between the number of ATM monomers and that of RI DSB directly depends on the LET value and therefore on the corresponding clinical consequences [248]. However, further experiments are needed to verify whether RI cancer risk and radiosensitivity observed clinically may be predicted by *in vitro* experiments performed with RIANs biomarkers.

The fact that low doses of IR (namely lower than 0.5 Gy) may cause cancer is an important question that has been debated for several decades [249]. The RIANs model has been validated at low doses and provides a biological explanation for hormesis and hypersensitivity to low doses phenomena [250,251]. Furthermore, the RIANs biomarkers have already been validated with two scenarios of CT exams [252,253]. The ratio between the number of ATM monomers and that of RI DSB evoked above with the LET is also an important feature to predict the risk of low doses. For example, while the number of RI DSB is directly proportional to the dose, the number of ATM monomers depends on the amount of X-proteins present in the cytoplasm and therefore on the individual factor. Again, the model of cancer proneness and radiosensitivity proposed in this review must be verified and documented in different irradiation conditions involving low doses to better evaluate the risk of RI cancer and toxicity for each of the genetic syndromes reviewed here.

## 7. Conclusions

This review aimed to survey the major cancer and radiosensitivity syndromes. One of the first conclusions is that the proteins whose mutations are responsible for these syndromes are all phosphorylation substrates of ATM and may present cytoplasmic forms when mutated. The ATM kinase therefore appears at the crossroads of the molecular and cellular bases of cancer proneness and radiosensitivity.

The impairment of the ATM-dependent DNA damage recognition, signaling and repair may cause misrepaired DNA damage that may be either endogenous (e.g., spontaneous DNA breaks) or exogenous (e.g., from the environment). Their formation can be considered as an initiation step in carcinogenesis.

The impairment of the ATM-dependent cell cycle checkpoint control: impaired G2/M and/or G1 arrests may contribute to the propagation of the errors described above. This step can be considered as a promotion step in carcinogenesis.

While these two requirements involve two different functions that should be both impaired, our review shows that the major cancer and radiosensitivity syndromes are caused by one mutation in a single gene. In the frame of the RIANs model, a given protein may ensure its own intrinsic function but may also play additional biological role(s) as a cytoplasmic ATM substrate (called X-protein). Hence, whether spontaneously or after

oxidative stress (such as exposure to IR), the flux of ATM monomers from the cytoplasm to the nucleus may be delayed by X-proteins, which may cause impairments of both recognition and repair of DSB via NHEJ and in cell cycle checkpoint control via a limited phosphorylation of CHK1 and/or CHK2 proteins. Such a model appears relevant for the three categories of the major cancer and radiosensitivity syndromes. However, further experiments are needed to better document and consolidate such hypotheses, especially in specific conditions of irradiation.

**Author Contributions:** The authors of this manuscript have contributed in the following manners: Conceptualization, N.F. and M.B.; data acquisition and methodology, L.E.N., E.B., M.L.F., E.L.R., J.A.-C.; J.R.-V., A.G., L.S., data analysis writing and original draft preparation, L.E.N., E.B., M.L.F. and N.F.; writing and editing, L.E.N., J.A.-C., M.B. and N.F.; project administration and funding acquisition, N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir—INDIRA project), and the National Space Agency (CNES) (ICARE project).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Deschavanne, P.J.; Fertil, B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *34*, 251–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arlett, C.F.; Harcourt, S.A. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 926–932. [[PubMed](#)]
- Weichselbaum, R.R.; Nove, J.; Little, J.B. X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 920–925.
- Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. Rev.* **2016**, *770*, 369–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.; Leblond, P.; Combemale, P.; et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7158. [[CrossRef](#)]
- National Institutes of Health; National Cancer Institute. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0*; US Department of Health and Human Sciences: Washington, DC, USA, 2010.
- Cox, J.D.; Stetz, J.; Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1995**, *31*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
- Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.; Forcheron, F.; Viau, M.; et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 450–460. [[CrossRef](#)]
- Averbeck, D.; Candeias, S.; Chandna, S.; Foray, N.; Friedl, A.A.; Haghdoost, S.; Jeggo, P.A.; Lumniczky, K.; Paris, F.; Quintens, R.; et al. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96*, 297–323. [[CrossRef](#)]
- Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **1991**, *13*, 641–648.
- Cornforth, M.N.; Bedford, J.S. High-resolution measurement of breaks in prematurely condensed chromosomes by differential staining. *Chromosoma* **1983**, *88*, 315–318. [[CrossRef](#)]
- Ferlazzo, M.L.; Bach-Tobdji, M.K.E.; Djerad, A.; Sonzogni, L.; Burlet, S.F.; Devic, C.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Djefal-Kerrar, A.; Foray, N. Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *55*, 4973–4983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Combemale, P.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Bencokova, Z.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Burlet, S.F.; Pinson, S.; Amini-Adle, M.; Al-Choboq, J.; et al. Individual Response to Radiation of Individuals with Neurofibromatosis Type I: Role of the ATM Protein and Influence of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *59*, 556–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goodhead, D.T.; Thacker, J.; Cox, R. Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: Molecular mechanisms of damage and repair. *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, *63*, 543–556. [[CrossRef](#)]
- Foray, N.; Marot, D.; Gabriel, A.; Randrianarison, V.; Carr, A.M.; Perricaudet, M.; Ashworth, A.; Jeggo, P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2860–2871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Berthel, E.; Ferlazzo, M.L.; Devic, C.; Bourguignon, M.; Foray, N. What does the History of Research on the Repair of DNA Double-Strand Breaks Tell Us?—A Comprehensive Review of Human Radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steel, G. *Basic Clinical Radiobiology*, 3rd ed.; Arnold Publishers: London, UK, 1993; p. 262.

18. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kim, S.T.; Lim, D.S.; Canman, C.E.; Kastan, M.B. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37538–37543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 7. [[CrossRef](#)]
21. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)]
22. Paull, T.T. Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 711–738. [[CrossRef](#)]
23. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Moulay Lakhdar, I.; Ferlazzo, M.L.; Al Choboq, J.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Thariat, J.; Foray, N. Fibroblasts from Retinoblastoma Patients Show Radiosensitivity Linked to Abnormal Localization of the ATM Protein. *Curr. Eye Res.* **2020**, *46*, 546–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Okkenhaug, K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 675–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lobrich, M.; Jeggo, P.A. The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2005**, *76*, 112–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Williams, R.M.; Zhang, X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2021**, *163*, 109–119. [[CrossRef](#)]
28. Taylor, A.M.; Hamden, D.G.; Arlett, C.F.; Harcourt, S.A.; Lehmann, A.R.; Stevens, S.; Bridges, B.A. Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* **1975**, *258*, 427–429. [[CrossRef](#)]
29. Savitsky, K.; Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L.; Tagle, D.A.; Smith, S.; Uziel, T.; Sfez, S.; et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **1995**, *268*, 1749–1753. [[CrossRef](#)]
30. Syllaba, L.; Hennen, K. Contribution à l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev. Neurol.* **1926**, *5*, 541–562.
31. Louis-Bar, M. Sur un syndrome progressif comprenant des telangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confin. Neurol.* **1941**, *4*, 32–43.
32. McKinnon, P.J. Ataxia-telangiectasia: An inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man. Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect. *Hum. Genet.* **1987**, *75*, 197–208. [[CrossRef](#)]
33. Bunday, S. Clinical and genetic features of ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *66*, S23–S29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Li, X.L.; Wang, Y.L. Ataxia-telangiectasia complicated with Hodgkin's lymphoma: A case report. *World J. Clin. Cases* **2020**, *8*, 2387–2391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aurias, A. Ataxia-telangiectasie: Aspects cliniques épidémiologiques et génétiques. *Med. Sci.* **1994**, *10*, 957–961.
36. Jorgensen, T.J.; Shiloh, Y. The ATM gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **1996**, *69*, 527–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Taylor, A.M.; Byrd, P.J.; McConville, C.M.; Thacker, S. Genetic and cellular features of ataxia telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65*, 65–70. [[CrossRef](#)]
38. Painter, R.B.; Young, B.R. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 7315–7317. [[CrossRef](#)]
39. Houldsworth, J.; Lavin, M.F. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 3709–3720. [[CrossRef](#)]
40. Rothblum-Oviatt, C.; Wright, J.; Lefton-Greif, M.A.; McGrath-Morrow, S.A.; Crawford, T.O.; Lederman, H.M. Ataxia telangiectasia: A review. *Orphanet J. Rare Dis.* **2016**, *11*, 159. [[CrossRef](#)]
41. Savitsky, K.; Sfez, S.; Tagle, D.A.; Ziv, Y.; Sartiell, A.; Collins, F.S.; Shiloh, Y.; Rotman, G. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 2025–2032. [[CrossRef](#)]
42. Gilad, S.; Khosravi, R.; Shkedy, D.; Uziel, T.; Ziv, Y.; Savitsky, K.; Rotman, G.; Smith, S.; Chessa, L.; Jorgensen, T.J.; et al. Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 433–439. [[CrossRef](#)]
43. Taylor, A.M.; Metcalfe, J.A.; Thick, J.; Mak, Y.F. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* **1996**, *87*, 423–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. McConville, C.M.; Stankovic, T.; Byrd, P.J.; McGuire, G.M.; Yao, Q.Y.; Lennox, G.G.; Taylor, M.R. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *59*, 320–330. [[PubMed](#)]
45. Swift, M.; Morrell, D.; Massey, R.B.; Chase, C.L. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 1831–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Vorechovsky, I.; Rasio, D.; Luo, L.; Monaco, C.; Hammarstrom, L.; Webster, A.D.; Zaloudik, J.; Barbanti-Brodani, G.; James, M.; Russo, G.; et al. The ATM gene and susceptibility to breast cancer: Analysis of 38 breast tumors reveals no evidence for mutation. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2726–2732. [[PubMed](#)]
47. Jerzak, K.J.; Mancuso, T.; Eisen, A. Ataxia-telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: A narrative review. *Curr. Oncol.* **2018**, *25*, e176–e180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Thompson, D.; Duedal, S.; Kirner, J.; McGuffog, L.; Last, J.; Reiman, A.; Byrd, P.; Taylor, M.; Easton, D.F. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 813–822. [[CrossRef](#)]
49. Joubert, A.; Zimmerman, K.M.; Bencokova, Z.; Gastaldo, J.; Rénier, W.; Chavaudra, N.; Favaudon, V.; Arlett, C.; Foray, N. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 107–125. [[CrossRef](#)]
50. Dahlberg, W.K.; Little, J.B. Response of dermal fibroblast cultures from patients with unusually severe responses to radiotherapy and from ataxia telangiectasia heterozygotes to fractionated radiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1995**, *1*, 785–790.
51. Kato, T.A.; Nagasawa, H.; Weil, M.M.; Little, J.B.; Bedford, J.S. Levels of gamma-H2AX foci after low-dose-rate irradiation reveal a DNA DSB rejoining defect in cells from human ATM heterozygotes in two at families and in another apparently normal individual. *Radiat. Res.* **2006**, *166*, 443–453. [[CrossRef](#)]
52. Tchirkov, A.; Bay, J.O.; Pernin, D.; Bignon, Y.J.; Rio, P.; Grancho, M.; Kwiatkowski, F.; Giollant, M.; Malet, P.; Verrelle, P. Detection of heterozygous carriers of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene by G2 phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes. *Hum. Genet.* **1997**, *101*, 312–316. [[CrossRef](#)]
53. Traven, A.; Heierhorst, J. SQ/TQ cluster domains: Concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **2005**, *27*, 397–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. O’Driscoll, M.; Gennery, A.R.; Seidel, J.; Concannon, P.; Jeggo, P.A. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1227–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. O’Driscoll, M.; Jeggo, P.A. Clinical impact of ATR checkpoint signalling failure in humans. *Cell Cycle* **2003**, *2*, 194–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. O’Driscoll, M.; Ruiz-Perez, V.L.; Woods, C.G.; Jeggo, P.A.; Goodship, J.A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 497–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Griffith, E.; Walker, S.; Martin, C.A.; Vagnarelli, P.; Stiff, T.; Vernay, B.; Al Sanna, N.; Saggari, A.; Hamel, B.; Earnshaw, W.C.; et al. Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 232–236. [[CrossRef](#)]
58. Collis, S.J.; DeWeese, T.L.; Jeggo, P.A.; Parker, A.R. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **2005**, *24*, 949–961. [[CrossRef](#)]
59. Jackson, S.P.; Jeggo, P.A. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: Involvement of DNA-PK. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 412–415. [[CrossRef](#)]
60. Pastwa, E.; Blasiak, J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*, 891–908. [[CrossRef](#)]
61. Rothkamm, K.; Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)]
62. Rogakou, E.P.; Pilch, D.R.; Orr, A.H.; Ivanova, V.S.; Bonner, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5858–5868. [[CrossRef](#)]
63. Kemp, L.M.; Sedgwick, S.G.; Jeggo, P.A. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat. Res.* **1984**, *132*, 189–196. [[CrossRef](#)]
64. Allalunis-Turner, M.J.; Barron, G.M.; Day, R.S., 3rd; Dobler, K.D.; Mirzayans, R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiat. Res.* **1993**, *134*, 349–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lees-Miller, S.P.; Godbout, R.; Chan, D.W.; Weinfeld, M.; Day, R.S., 3rd; Barron, G.M.; Allalunis-Turner, J. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* **1995**, *267*, 1183–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Van der Burg, M.; Ijspeert, H.; Verkaik, N.S.; Turul, T.; Wiegant, W.W.; Morotomi-Yano, K.; Mari, P.O.; Tezcan, I.; Chen, D.J.; Zdzienicka, M.Z.; et al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 91–98. [[CrossRef](#)]
67. Van der Burg, M.; van Dongen, J.J.; van Gent, D.C. DNA-PKcs deficiency in human: Long predicted, finally found. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *9*, 503–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Takeda, Y.; Dynan, W.S. Autoantibodies against DNA double-strand break repair proteins. *Front. Biosci.* **2001**, *6*, D1412–D1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Badie, C.; Iliakis, G.; Foray, N.; Alsbeih, G.; Pantellias, G.E.; Okayasu, R.; Cheong, N.; Russell, N.S.; Begg, A.C.; Arlett, C.F.; et al. Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1232–1234.
70. O’Driscoll, M.; Cerosaletti, K.M.; Girard, P.M.; Dai, Y.; Stumm, M.; Kysela, B.; Hirsch, B.; Gennery, A.; Palmer, S.E.; Seidel, J.; et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1175–1185. [[CrossRef](#)]

71. Huang, M.; Dong, G.; Lu, X.; Xiao, F.; Zhou, Q.; Zhang, S. DNA ligase IV deficiency with elevated serum IgG levels suspected to have myelodysplastic syndrome: A case report. *BMC Pediatr.* **2022**, *22*, 588. [[CrossRef](#)]
72. Gerasimou, P.; Koumas, L.; Miltiadous, A.; Kyprianou, I.; Chi, J.; Gavrielidou, R.; Socratous, E.; Loizou, L.; Papachristodoulou, E.; Karaoli, E.; et al. The rare DNA ligase IV syndrome: A case report. *Hum. Pathol. Case Rep.* **2020**, *22*, 200442. [[CrossRef](#)]
73. Fredette, M.E.; Lombardi, K.C.; Duker, A.L.; Buck, C.O.; Phornphutkul, C.; Bober, M.B.; Quintos, J.B. Novel Xrcc4 Mutations in an Infant with Microcephalic Primordial Dwarfism, Dilated Cardiomyopathy, Subclinical Hypothyroidism, and Early Death: Expanding the Phenotype of Xrcc4 Mutations. *AACE Clin. Case Rep.* **2020**, *6*, e1–e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bee, L.; Nasca, A.; Zanolini, A.; Cendron, F.; d’Adamo, P.; Costa, R.; Lamperti, C.; Celotti, L.; Ghezzi, D.; Zeviani, M. A nonsense mutation of human XRCC4 is associated with adult-onset progressive encephalocardiomyopathy. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 918–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Shaheen, R.; Faqih, E.; Ansari, S.; Abdel-Salam, G.; Al-Hassnan, Z.N.; Al-Shidi, T.; Alomar, R.; Sogaty, S.; Alkuraya, F.S. Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res.* **2014**, *24*, 291–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Luteijn, R.D.; Drexler, I.; Smith, G.L.; Lebbink, R.J.; Wiertz, E. Mutagenic repair of double-stranded DNA breaks in vaccinia virus genomes requires cellular DNA ligase IV activity in the cytosol. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 790–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Francis, D.B.; Kozlov, M.; Chavez, J.; Chu, J.; Malu, S.; Hanna, M.; Cortes, P. DNA Ligase IV regulates XRCC4 nuclear localization. *DNA Repair* **2014**, *21*, 36–42. [[CrossRef](#)]
78. Fukuchi, M.; Wanotayan, R.; Liu, S.; Imamichi, S.; Sharma, M.K.; Matsumoto, Y. Lysine 271 but not lysine 210 of XRCC4 is required for the nuclear localization of XRCC4 and DNA ligase IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *461*, 687–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Gu, J.; Li, S.; Zhang, X.; Wang, L.C.; Niewolik, D.; Schwarz, K.; Legerski, R.J.; Zandi, E.; Lieber, M.R. DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *DNA Repair* **2010**, *9*, 429–437. [[CrossRef](#)]
80. Goodarzi, A.A.; Yu, Y.; Riballo, E.; Douglas, P.; Walker, S.A.; Ye, R.; Harer, C.; Marchetti, C.; Morrice, N.; Jeggo, P.A.; et al. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* **2006**, *25*, 3880–3889. [[CrossRef](#)]
81. Moshous, D.; Callebaut, I.; de Chasseval, R.; Corneo, B.; Cavazzana-Calvo, M.; Le Deist, F.; Tezcan, I.; Sanal, O.; Bertrand, Y.; Philippe, N.; et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **2001**, *105*, 177–186. [[CrossRef](#)]
82. Riballo, E.; Kuhne, M.; Rief, N.; Doherty, A.; Smith, G.C.; Recio, M.J.; Reis, C.; Dahm, K.; Fricke, A.; Krempler, A.; et al. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 715–724. [[CrossRef](#)]
83. Wang, J.; Pluth, J.M.; Cooper, P.K.; Cowan, M.J.; Chen, D.J.; Yannone, S.M. Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair* **2005**, *4*, 556–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Beucher, A.; Birraux, J.; Tchouandong, L.; Barton, O.; Shibata, A.; Conrad, S.; Goodarzi, A.A.; Krempler, A.; Jeggo, P.A.; Lobrich, M. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* **2009**, *28*, 3413–3427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Volk, T.; Pannicke, U.; Reisli, I.; Bulashevskaya, A.; Ritter, J.; Bjorkman, A.; Schaffer, A.A.; Fliegauf, M.; Sayar, E.H.; Salzer, U.; et al. DCLRE1C (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 7361–7372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Geng, L.; Zhang, X.; Zheng, S.; Legerski, R.J. Artemis links ATM to G2/M checkpoint recovery via regulation of Cdk1-cyclin B. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 2625–2635. [[CrossRef](#)]
87. Ahnesorg, P.; Smith, P.; Jackson, S.P. XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell* **2006**, *124*, 301–313. [[CrossRef](#)]
88. Li, Y.; Chirgadze, D.Y.; Bolanos-Garcia, V.M.; Sibanda, B.L.; Davies, O.R.; Ahnesorg, P.; Jackson, S.P.; Blundell, T.L. Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *EMBO J.* **2008**, *27*, 290–300. [[CrossRef](#)]
89. Riballo, E.; Woodbine, L.; Stiff, T.; Walker, S.A.; Goodarzi, A.A.; Jeggo, P.A. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 482–492. [[CrossRef](#)]
90. Menon, V.; Povirk, L.F. XLF/Cernunnos: An important but puzzling participant in the nonhomologous end joining DNA repair pathway. *DNA Repair* **2017**, *58*, 29–37. [[CrossRef](#)]
91. Yu, Y.; Mahaney, B.L.; Yano, K.; Ye, R.; Fang, S.; Douglas, P.; Chen, D.J.; Lees-Miller, S.P. DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA Repair* **2008**, *7*, 1680–1692. [[CrossRef](#)]
92. Liu, P.; Gan, W.; Guo, C.; Xie, A.; Gao, D.; Guo, J.; Zhang, J.; Willis, N.; Su, A.; Asara, J.M.; et al. Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 648–661. [[CrossRef](#)]
93. Stewart, G.S. Solving the RIDDLE of 53BP1 recruitment to sites of damage. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1532–1538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Stewart, G.S.; Stankovic, T.; Byrd, P.J.; Wechsler, T.; Miller, E.S.; Huissoon, A.; Drayson, M.T.; West, S.C.; Elledge, S.J.; Taylor, A.M. RIDDLE immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53BP1-mediated DNA damage signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16910–16915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. FitzGerald, J.E.; Grenon, M.; Lowndes, N.F. 53BP1: Function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 897–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Santagata, S.; Villa, A.; Sobacchi, C.; Cortes, P.; Vezzoni, P. The genetic and biochemical basis of Omenn syndrome. *Immunol. Rev.* **2000**, *178*, 64–74. [[CrossRef](#)]
97. Villa, A.; Santagata, S.; Bozzi, F.; Imberti, L.; Notarangelo, L.D. Omenn syndrome: A disorder of Rag1 and Rag2 genes. *J. Clin. Immunol.* **1999**, *19*, 87–97. [[CrossRef](#)]
98. De Villartay, J.P. V(D)J recombination deficiencies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *650*, 46–58.
99. Sobacchi, C.; Marrella, V.; Rucci, F.; Vezzoni, P.; Villa, A. RAG-dependent primary immunodeficiencies. *Hum. Mutat.* **2006**, *27*, 1174–1184. [[CrossRef](#)]
100. Gapud, E.J.; Lee, B.S.; Mahowald, G.K.; Bassing, C.H.; Sleckman, B.P. Repair of chromosomal RAG-mediated DNA breaks by mutant RAG proteins lacking phosphatidylinositol 3-like kinase consensus phosphorylation sites. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 1826–1834. [[CrossRef](#)]
101. Dudas, A.; Chovanec, M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat. Res.* **2004**, *566*, 131–167. [[CrossRef](#)]
102. Stary, A. La recombinaison illégitime dans les cellules de mammifères. *Med. Sci.* **1994**, *10*, 986–994.
103. Duesberg, P.H.; Zhou, R.P.; Goodrich, D. Cancer genes by illegitimate recombination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, *567*, 259–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ehrlich, S.D.; Bierne, H.; d’Alençon, E.; Vilette, D.; Petranovic, M.; Noirot, P.; Michel, B. Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* **1993**, *135*, 161–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Lin, Z.; Kong, H.; Nei, M.; Ma, H. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10328–10333. [[CrossRef](#)]
106. Symington, L.S.; Holloman, W.K. Resolving resolvases: The final act? *Mol. Cell* **2008**, *32*, 603–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Dardalhon, M.; Nohturfft, A.; Meniel, V.; Averbek, D. Repair of DNA double-strand breaks induced in *Saccharomyces cerevisiae* using different gamma-ray dose-rates: A pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65*, 307–314. [[CrossRef](#)]
108. Yamagata, K.; Kato, J.; Shimamoto, A.; Goto, M.; Furuichi, Y.; Ikeda, H. Bloom’s and Werner’s syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast sgs1 mutant: Implication for genomic instability in human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8733–8738. [[CrossRef](#)]
109. Cousineau, I.; Belmaaza, A. BRCA1 haploinsufficiency, but not heterozygosity for a BRCA1-truncating mutation, deregulates homologous recombination. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 962–971. [[CrossRef](#)]
110. Howlett, N.G.; Taniguchi, T.; Olson, S.; Cox, B.; Waisfisz, Q.; de Die-Smulders, C.; Persky, N.; Grompe, M.; Joenje, H.; Pals, G.; et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **2002**, *297*, 606–609. [[CrossRef](#)]
111. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
112. Dong, Z.; Zhong, Q.; Chen, P.L. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19513–19516. [[CrossRef](#)]
113. Trujillo, K.M.; Yuan, S.S.; Lee, E.Y.; Sung, P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21447–21450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Maser, R.S.; Monsen, K.J.; Nelms, B.E.; Petrini, J.H. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6087–6096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Weemaes, C.M.; Hustinx, T.W.; Scheres, J.M.; van Munster, P.J.; Bakkeren, J.A.; Taalman, R.D. A new chromosomal instability disorder: The Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr. Scand.* **1981**, *70*, 557–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Taalman, R.D.; Hustinx, T.W.; Weemaes, C.M.; Seemanova, E.; Schmidt, A.; Passarge, E.; Scheres, J.M. Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1989**, *32*, 425–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Taalman, R.D.; Jaspers, N.G.; Scheres, J.M.; de Wit, J.; Hustinx, T.W. Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat. Res.* **1983**, *112*, 23–32. [[CrossRef](#)]
118. Antoccia, A.; Ricordy, R.; Maraschio, P.; Prudente, S.; Tanzarella, C. Chromosomal sensitivity to clastogenic agents and cell cycle perturbations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *71*, 41–49. [[CrossRef](#)]
119. Jaspers, N.G.; Gatti, R.A.; Baan, C.; Linssen, P.C.; Bootsma, D. Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: A survey of 50 patients. *Cytogenet. Genome Res.* **1988**, *49*, 259–263. [[CrossRef](#)]
120. Wegner, R.D.; Metzger, M.; Hanefeld, F.; Jaspers, N.G.; Baan, C.; Magdorf, K.; Kunze, J.; Sperling, K. A new chromosomal instability disorder confirmed by complementation studies. *Clin. Genet.* **1988**, *33*, 20–32. [[CrossRef](#)]
121. Stumm, M.; Gatti, R.A.; Reis, A.; Udar, N.; Chrzanowska, K.; Seemanova, E.; Sperling, K.; Wegner, R.D. The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *57*, 960–962.
122. Komatsu, K.; Matsuura, S.; Tauchi, H.; Endo, S.; Kodama, S.; Smeets, D.; Weemaes, C.; Oshimura, M. The gene for Nijmegen breakage syndrome (V2) is not located on chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *58*, 885–888.
123. Matsuura, S.; Royba, E.; Akutsu, S.N.; Yanagihara, H.; Ochiai, H.; Kudo, Y.; Tashiro, S.; Miyamoto, T. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. *Ann. ICRP* **2016**, *45*, S290–S296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Warren, C.; Pavletich, N.P. Structure of the human ATM kinase and mechanism of Nbs1 binding. *Elife* **2022**, *11*, e74218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Desai-Mehta, A.; Cerosaletti, K.M.; Concannon, P. Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 2184–2191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

126. Stewart, G.S.; Maser, R.S.; Stankovic, T.; Bressan, D.A.; Kaplan, M.I.; Jaspers, N.G.; Raams, A.; Byrd, P.J.; Petrini, J.H.; Taylor, A.M. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **1999**, *99*, 577–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Alsbeih, G.; Al-Hadyan, K.; Al-Harbi, N. Assessment of carriers' frequency of a novel MRE11 mutation responsible for the rare ataxia telangiectasia-like disorder. *Genet. Test.* **2008**, *12*, 387–389. [[CrossRef](#)]
128. Fernet, M.; Gribaa, M.; Salih, M.A.; Seidahmed, M.Z.; Hall, J.; Koenig, M. Identification and functional consequences of a novel MRE11 mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 307–318. [[CrossRef](#)]
129. Delia, D.; Piane, M.; Buscemi, G.; Savio, C.; Palmeri, S.; Lulli, P.; Carlessi, L.; Fontanella, E.; Chessa, L. MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 2155–2163. [[CrossRef](#)]
130. Waltes, R.; Kalb, R.; Gatei, M.; Kijas, A.W.; Stumm, M.; Sobock, A.; Wieland, B.; Varon, R.; Lerenthal, Y.; Lavin, M.F.; et al. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *84*, 605–616. [[CrossRef](#)]
131. Gatei, M.; Jakob, B.; Chen, P.; Kijas, A.W.; Becherel, O.J.; Gueven, N.; Birrell, G.; Lee, J.H.; Paull, T.T.; Lerenthal, Y.; et al. ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein regulates DNA repair and cell cycle control. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31542–31556. [[CrossRef](#)]
132. Gatei, M.; Young, D.; Cerosaletti, K.M.; Desai-Mehta, A.; Spring, K.; Kozlov, S.; Lavin, M.F.; Gatti, R.A.; Concannon, P.; Khanna, K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 115–119. [[CrossRef](#)]
133. Frankenberg-Schwager, M.; Becker, M.; Garg, I.; Pralle, E.; Wolf, H.; Frankenberg, D. The role of nonhomologous DNA end joining, conservative homologous recombination, and single-strand annealing in the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by H(2)O(2) in mammalian cells. *Radiat. Res.* **2008**, *170*, 784–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Luo, Z.; Wang, S.; Jiao, B.; Yuan, D.; Dai, D.; Wang, L.; Xu, K.; Wang, X. Gene cloning and seamless site-directed mutagenesis using single-strand annealing (SSA). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 10119–10126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Maynard, S.; Schurman, S.H.; Harboe, C.; de Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V.A. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 2–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Wilson, D.M., 3rd; Bohr, V.A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair* **2007**, *6*, 544–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Tew, W.P.; Lacchetti, C.; Kohn, E.C. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in the Management of Ovarian Cancer: ASCO Guideline Rapid Recommendation Update. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 3878–3881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Petit, C.; Sancar, A. Nucleotide excision repair: From E. coli to man. *Biochimie* **1999**, *81*, 15–25. [[CrossRef](#)]
139. Lambert, W.C.; Gagna, C.E.; Lambert, M.W. Xeroderma pigmentosum: Its overlap with trichothiodystrophy, Cockayne syndrome and other progeroid syndromes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *637*, 128–137.
140. Lehmann, A.R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **2003**, *85*, 1101–1111. [[CrossRef](#)]
141. Kraemer, K.H.; Patronas, N.J.; Schiffmann, R.; Brooks, B.P.; Tamura, D.; DiGiovanna, J.J. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: A complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* **2007**, *145*, 1388–1396. [[CrossRef](#)]
142. Lehmann, A.R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: One gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 15–23. [[CrossRef](#)]
143. Chu, W.K.; Hickson, I.D. RecQ helicases: Multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 644–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Ouyang, K.J.; Woo, L.L.; Ellis, N.A. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: Cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech. Ageing Dev.* **2008**, *129*, 425–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Muftuoglu, M.; Oshima, J.; von Kobbe, C.; Cheng, W.H.; Leistriz, D.F.; Bohr, V.A. The clinical characteristics of Werner syndrome: Molecular and biochemical diagnosis. *Hum. Genet.* **2008**, *124*, 369–377. [[CrossRef](#)]
146. Amor-Gueret, M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: The SOS-like hypothesis. *Cancer Lett.* **2006**, *236*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Ozgenc, A.; Loeb, L.A. Werner Syndrome, aging and cancer. *Genome Dyn.* **2006**, *1*, 206–217.
148. Pichierri, P.; Rosselli, F.; Franchitto, A. Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* **2003**, *22*, 1491–1500. [[CrossRef](#)]
149. Ababou, M.; Dutertre, S.; Lecluse, Y.; Onclercq, R.; Chatton, B.; Amor-Gueret, M. ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **2000**, *19*, 5955–5963. [[CrossRef](#)]
150. Matsumoto, T.; Shimamoto, A.; Goto, M.; Furuichi, Y. Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 335–336. [[CrossRef](#)]
151. Kaneko, H.; Orii, K.O.; Matsui, E.; Shimozawa, N.; Fukao, T.; Matsumoto, T.; Shimamoto, A.; Furuichi, Y.; Hayakawa, S.; Kasahara, K.; et al. BLM (the causative gene of Bloom syndrome) protein translocation into the nucleus by a nuclear localization signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 348–353. [[CrossRef](#)]
152. Bellizzi, A.M.; Frankel, W.L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: A review. *Adv. Anat. Pathol.* **2009**, *16*, 405–417. [[CrossRef](#)]

153. Lynch, P.M. The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Surg. Oncol. Clin.* **2009**, *18*, 611–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Foulkes, W.D. A tale of four syndromes: Familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM* **1995**, *88*, 853–863. [[PubMed](#)]
155. Zhang, Y.; Rohde, L.H.; Wu, H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair. *Curr. Genom.* **2009**, *10*, 250–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Li, G.M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **2008**, *18*, 85–98. [[CrossRef](#)]
157. Biller, L.H.; Syngal, S.; Yurgelun, M.B. Recent advances in Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **2019**, *18*, 211–219. [[CrossRef](#)]
158. Lebrun, C.; Olschwang, S.; Jeannin, S.; Vandenbos, F.; Sobol, H.; Frenay, M. Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur. J. Neurol.* **2007**, *14*, 470–472. [[CrossRef](#)]
159. Neufeld, K.L. Nuclear APC. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *656*, 13–29.
160. Yan, S.; Sorrell, M.; Berman, Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 3951–3967. [[CrossRef](#)]
161. Bachelet, J.T.; Granzotto, A.; Ferlazzo, M.; Sonzogni, L.; Berthel, E.; Devic, D.; Foray, N. First Radiobiological Characterization of Skin and Bone Cells from A Patient Suffering from the PI3KCA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) Syndrome. *Arch. Med. Clin. Case Rep.* **2020**, *4*, 1052–1066. [[CrossRef](#)]
162. Keppler-Noreuil, K.M.; Rios, J.J.; Parker, V.E.; Semple, R.K.; Lindhurst, M.J.; Sapp, J.C.; Alomari, A.; Ezaki, M.; Dobyns, W.; Biesecker, L.G. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am. J. Med. Genet. A* **2015**, *167*, 287–295. [[CrossRef](#)]
163. Martinez-Lopez, A.; Blasco-Morente, G.; Perez-Lopez, I.; Herrera-Garcia, J.D.; Luque-Valenzuela, M.; Sanchez-Cano, D.; Lopez-Gutierrez, J.C.; Ruiz-Villaverde, R.; Tercedor-Sanchez, J. CLOVES syndrome: Review of a PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Clin. Genet.* **2017**, *91*, 14–21. [[CrossRef](#)]
164. Venot, Q.; Canaud, G. PIK3CA-related overgrowth syndrome (PROS). *Nephrol. Ther.* **2017**, *13* (Suppl. 1), S155–S156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Weinstein, B.; Henderson-Jackson, E.; Cruse, C.W.; Brohl, A.S. PIK3CA-Related Overgrowth Syndrome (PROS) and Angiosarcoma: A Case Report. *Eplasty* **2020**, *20*, ic6.
166. Toulamy, M.; Rodemann, H.P. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, 180–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Irrarrazabal, C.E.; Burg, M.B.; Ward, S.G.; Ferraris, J.D. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates activation of ATM by high NaCl and by ionizing radiation: Role in osmoprotective transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8882–8887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Keppler-Noreuil, K.M.; Parker, V.E.; Darling, T.N.; Martinez-Agosto, J.A. Somatic overgrowth disorders of the PI3K/AKT/mTOR pathway & therapeutic strategies. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **2016**, *172*, 402–421. [[PubMed](#)]
169. Halaby, M.J.; Hibma, J.C.; He, J.; Yang, D.Q. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1555–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Ersahin, T.; Tuncbag, N.; Cetin-Atalay, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1946–1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Biesecker, L.G.; Happle, R.; Mulliken, J.B.; Weksberg, R.; Graham, J.M., Jr.; Viljoen, D.L.; Cohen, M.M., Jr. Proteus syndrome: Diagnostic criteria, differential diagnosis, and patient evaluation. *Am. J. Med. Genet.* **1999**, *84*, 389–395. [[CrossRef](#)]
172. Cohen, M.M., Jr. Proteus syndrome review: Molecular, clinical, and pathologic features. *Clin. Genet.* **2014**, *85*, 111–119. [[CrossRef](#)]
173. Eng, C.; Thiele, H.; Zhou, X.P.; Gorlin, R.J.; Hennekam, R.C.; Winter, R.M. PTEN mutations and proteus syndrome. *Lancet* **2001**, *358*, 2079–2080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Ram, S.P.; Noor, A.R. Neonatal proteus syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1993**, *47*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Sapp, J.C.; Buser, A.; Burton-Akright, J.; Keppler-Noreuil, K.M.; Biesecker, L.G. A dyadic genotype-phenotype approach to diagnostic criteria for Proteus syndrome. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **2019**, *181*, 565–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Magana, M.; Landeta-Sa, A.P.; Lopez-Flores, Y. Cowden Disease: A Review. *Am. J. Dermatopathol.* **2022**, *44*, 705–717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Hanna, C.; Dunne, V.L.; Walker, S.M.; Butterworth, K.T.; McCabe, N.; Waugh, D.J.J.; Kennedy, R.D.; Prise, K.M. ATM Kinase Inhibition Preferentially Sensitises PTEN-Deficient Prostate Tumour Cells to Ionising Radiation. *Cancers* **2020**, *13*, 79. [[CrossRef](#)]
178. Chen, J.H.; Zhang, P.; Chen, W.D.; Li, D.D.; Wu, X.Q.; Deng, R.; Jiao, L.; Li, X.; Ji, J.; Feng, G.K.; et al. ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells. *Autophagy* **2015**, *11*, 239–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Mustofa, M.K.; Tanoue, Y.; Tateishi, C.; Vaziri, C.; Tateishi, S. Roles of Chk2/CHEK2 in guarding against environmentally induced DNA damage and replication-stress. *Environ. Mol. Mutagen.* **2020**, *61*, 730–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Gillespie, D.A. When more is less: Heritable gain-of-function chk1 mutations impair human fertility. *FEBS J.* **2022**. [[CrossRef](#)]
181. Kleiblova, P.; Stolarova, L.; Krizova, K.; Lhota, F.; Hojny, J.; Zemankova, P.; Havranek, O.; Vocka, M.; Cerna, M.; Lhotova, K.; et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 1782–1797. [[CrossRef](#)]



182. Cai, Z.; Chehab, N.H.; Pavletich, N.P. Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 818–829. [[CrossRef](#)]
183. Staalesen, V.; Falck, J.; Geisler, S.; Bartkova, J.; Borresen-Dale, A.L.; Lukas, J.; Lillehaug, J.R.; Bartek, J.; Lonning, P.E. Alternative splicing and mutation status of CHEK2 in stage III breast cancer. *Oncogene* **2004**, *23*, 8535–8544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Guo, X.E.; Ngo, B.; Modrek, A.S.; Lee, W.H. Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 2–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Rodriguez, M.C.; Songyang, Z. BRCT domains: Phosphopeptide binding and signaling modules. *Front Biosci.* **2008**, *13*, 5905–5915. [[CrossRef](#)]
186. Silver, D.P.; Livingston, D.M. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 679–684. [[CrossRef](#)]
187. Koonin, E.V.; Altschul, S.F.; Bork, P. BRCA1 protein products . . . Functional motifs. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 266–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Scully, R.; Chen, J.; Ochs, R.L.; Keegan, K.; Hoekstra, M.; Feunteun, J.; Livingston, D.M. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* **1997**, *90*, 425–435. [[CrossRef](#)]
189. Scully, R.; Chen, J.; Plug, A.; Xiao, Y.; Weaver, D.; Feunteun, J.; Ashley, T.; Livingston, D.M. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **1997**, *88*, 265–275. [[CrossRef](#)]
190. Clark, S.L.; Rodriguez, A.M.; Snyder, R.R.; Hankins, G.D.; Boehning, D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, *1*, e201204005. [[CrossRef](#)]
191. Scully, R.; Puget, N. BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer. *Biochimie* **2002**, *84*, 95–102. [[CrossRef](#)]
192. Wang, F.; Fang, Q.; Ge, Z.; Yu, N.; Xu, S.; Fan, X. Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: A meta-analysis from systematic review. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 2109–2118. [[CrossRef](#)]
193. Cavanagh, H.; Rogers, K.M. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **2015**, *13*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Feunteun, J. A paradox and three enigmas about the role of BRCA1 in breast and ovarian cancers. *J. Soc. Biol.* **2004**, *198*, 123–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Rodriguez, J.A.; Au, W.W.; Henderson, B.R. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp. Cell Res.* **2004**, *293*, 14–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Drikos, I.; Boutou, E.; Kastiris, P.L.; Vorgias, C.E. BRCA1-BRCT Mutations Alter the Subcellular Localization of BRCA1 In Vitro. *Anticancer Res.* **2021**, *41*, 2953–2962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Vincent, A.; Berthel, E.; Dacheux, E.; Magnard, C.; Venezia, N.L. BRCA1 affects protein phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 949–960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Ramus, S.J.; Gayther, S.A. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol. Oncol.* **2009**, *3*, 138–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Zhong, Q.; Chen, C.F.; Li, S.; Chen, Y.; Wang, C.C.; Xiao, J.; Chen, P.L.; Sharp, Z.D.; Lee, W.H. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **1999**, *285*, 747–750. [[CrossRef](#)]
200. Mohiuddin, M.; Rahman, M.M.; Sale, J.E.; Pearson, C.E. CtIP-BRCA1 complex and MRE11 maintain replication forks in the presence of chain terminating nucleoside analogs. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 2966–2980. [[CrossRef](#)]
201. Foray, N.; Randrianarison, V.; Marot, D.; Perricaudet, M.; Lenoir, G.; Feunteun, J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* **1999**, *18*, 7334–7342. [[CrossRef](#)]
202. Van Haaften, C.; van Eendenburg, J.; Boot, A.; Corver, W.E.; Haans, L.; van Wezel, T.; Trimbos, J.B. Chemosensitivity of BRCA1-Mutated Ovarian Cancer Cells and Established Cytotoxic Agents. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2017**, *27*, 1571–1578. [[CrossRef](#)]
203. Grompe, M.; D’Andrea, A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2253–2259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Dong, H.; Nebert, D.W.; Bruford, E.A.; Thompson, D.C.; Joenje, H.; Vasilidou, V. Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum. Genom.* **2015**, *9*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Wang, X.; Andreassen, P.R.; D’Andrea, A.D. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5850–5862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Alter, B.P. Radiosensitivity in Fanconi’s anemia patients. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2002**, *62*, 345–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Buchwald, M.; Moustacchi, E. Is Fanconi anemia caused by a defect in the processing of DNA damage? *Mutat. Res.* **1998**, *408*, 75–90. [[CrossRef](#)]
208. Lobitz, S.; Velleuer, E. Guido Fanconi (1892–1979): A jack of all trades. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 893–898. [[CrossRef](#)]
209. Papadopoulou, D.; Moustacchi, E. Fanconi anemia: Genes and function(s) revisited. *Med. Sci.* **2005**, *21*, 730–736.
210. Haddy, N.; Andriamboavonjy, T.; Paoletti, C.; Dondon, M.G.; Mousannif, A.; Shamsaldin, A.; Doyon, F.; Labbe, M.; Robert, C.; Avril, M.F.; et al. Thyroid adenomas and carcinomas following radiotherapy for a hemangioma during infancy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2009**, *93*, 377–382. [[CrossRef](#)]
211. Fang, C.B.; Wu, H.T.; Zhang, M.L.; Liu, J.; Zhang, G.J. Fanconi Anemia Pathway: Mechanisms of Breast Cancer Predisposition Development and Potential Therapeutic Targets. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 160. [[CrossRef](#)]
212. Pickering, M.T.; Kowalik, T.F. Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene* **2006**, *25*, 746–755. [[CrossRef](#)]

213. Yen, A.; Coder, D.; Varvayanis, S. Concentration of RB protein in nucleus vs. cytoplasm is stable as phosphorylation of RB changes during the cell cycle and differentiation. *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, *72*, 159–165.
214. Chaussade, A.; Millot, G.; Wells, C.; Brisse, H.; Lae, M.; Savignoni, A.; Desjardins, L.; Dendale, R.; Doz, F.; Aerts, I.; et al. Correlation between RB1 germline mutations and second primary malignancies in hereditary retinoblastoma patients treated with external beam radiotherapy. *Eur. J. Med. Genet.* **2019**, *62*, 217–223. [[CrossRef](#)]
215. Lin, W.; Cao, J.; Liu, J.; Beshiri, M.L.; Fujiwara, Y.; Francis, J.; Cherniack, A.D.; Geisen, C.; Blair, L.P.; Zou, M.R.; et al. Loss of the retinoblastoma binding protein 2 (RBP2) histone demethylase suppresses tumorigenesis in mice lacking Rb1 or Men1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13379–13386. [[CrossRef](#)]
216. Yun, J.; Li, Y.; Xu, C.T.; Pan, B.R. Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma. *Int. J. Ophthalmol.* **2011**, *4*, 103–109.
217. Zhang, L.; Jia, R.; Zhao, J.; Fan, J.; Zhou, Y.; Han, B.; Song, X.; Wu, L.; Zhang, H.; Song, H.; et al. Novel mutations in the RB1 gene from Chinese families with a history of retinoblastoma. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 2409–2420. [[CrossRef](#)]
218. Vousden, K.H.; Lane, D.P. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 275–283. [[CrossRef](#)]
219. Huang, L.C.; Clarkin, K.C.; Wahl, G.M. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4827–4832. [[CrossRef](#)]
220. Kabacik, S.; Ortega-Molina, A.; Efeyan, A.; Finnon, P.; Bouffler, S.; Serrano, M.; Badie, C. A minimally invasive assay for individual assessment of the ATM/CHEK2/p53 pathway activity. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1152–1161. [[CrossRef](#)]
221. Le, A.N.; Harton, J.; Desai, H.; Powers, J.; Zelle, K.; Bradbury, A.R.; Nathanson, K.L.; Shah, P.D.; Doucette, A.; Freedman, G.M.; et al. Frequency of radiation-induced malignancies post-adjuvant radiotherapy for breast cancer in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Breast Cancer Res. Treat.* **2020**, *181*, 181–188. [[CrossRef](#)]
222. Thariat, J.; Chevalier, F.; Orbach, D.; Ollivier, L.; Marcy, P.Y.; Corradini, N.; Beddok, A.; Foray, N.; Bougeard, G. Avoidance or adaptation of radiotherapy in patients with cancer with Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, e562–e574. [[CrossRef](#)]
223. Yohay, K.H. The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. *Semin. Pediatr. Neurol.* **2006**, *13*, 21–26. [[CrossRef](#)]
224. Ferner, R.E. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: A twenty first century perspective. *Lancet Neurol.* **2007**, *6*, 340–351. [[CrossRef](#)]
225. Zhu, Y.; Parada, L.F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 616–626. [[CrossRef](#)]
226. Easton, D.F.; Ponder, M.A.; Huson, S.M.; Ponder, B.A. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): Evidence for modifying genes. *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, *53*, 305–313.
227. Sabbagh, A.; Pasmant, E.; Laurendeau, I.; Parfait, B.; Barbarot, S.; Guillot, B.; Combemale, P.; Ferkal, S.; Vidaud, M.; Aubourg, P.; et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 2768–2778. [[CrossRef](#)]
228. Campian, J.; Gutmann, D.H. CNS Tumors in Neurofibromatosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 2378–2385. [[CrossRef](#)]
229. Petrilli, A.M.; Fernandez-Valle, C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* **2016**, *35*, 537–548. [[CrossRef](#)]
230. Bachir, S.; Shah, S.; Shapiro, S.; Koehler, A.; Mahammed, A.; Samy, R.N.; Zuccarello, M.; Schorry, E.; Sengupta, S. Neurofibromatosis Type 2 (NF2) and the Implications for Vestibular Schwannoma and Meningioma Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 690. [[CrossRef](#)]
231. Lu, J.; Zou, J.; Wu, H.; Cai, L. Compensative shuttling of merlin to phosphorylation on serine 518 in vestibular schwannoma. *Laryngoscope* **2008**, *118*, 169–174. [[CrossRef](#)]
232. Napolioni, V.; Curatolo, P. Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex. *Curr. Genom.* **2008**, *9*, 475–487. [[CrossRef](#)]
233. Van Slegtenhorst, M.; de Hoogt, R.; Hermans, C.; Nellist, M.; Janssen, B.; Verhoef, S.; Lindhout, D.; van den Ouweland, A.; Halley, D.; Young, J.; et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* **1997**, *277*, 805–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* **1993**, *75*, 1305–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Hoogeveen-Westerveld, M.; Ekong, R.; Povey, S.; Karbassi, I.; Batish, S.D.; den Dunnen, J.T.; van Eeghen, A.; Thiele, E.; Mayer, K.; Dies, K.; et al. Functional assessment of TSC1 missense variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. *Hum. Mutat.* **2012**, *33*, 476–479. [[CrossRef](#)]
236. Hoogeveen-Westerveld, M.; Ekong, R.; Povey, S.; Mayer, K.; Lannoy, N.; Elmslie, F.; Bebin, M.; Dies, K.; Thompson, C.; Sparagana, S.P.; et al. Functional assessment of TSC2 variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 167–175. [[CrossRef](#)]
237. Hoogeveen-Westerveld, M.; Wentink, M.; van den Heuvel, D.; Mozaffari, M.; Ekong, R.; Povey, S.; den Dunnen, J.T.; Metcalfe, K.; Vallee, S.; Krueger, S.; et al. Functional assessment of variants in the TSC1 and TSC2 genes identified in individuals with Tuberous Sclerosis Complex. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 424–435. [[CrossRef](#)]
238. Qin, J.; Wang, Z.; Hoogeveen-Westerveld, M.; Shen, G.; Gong, W.; Nellist, M.; Xu, W. Structural Basis of the Interaction between Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7). *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 8591–8601. [[CrossRef](#)]

239. Overwater, I.E.; Swenker, R.; van der Ende, E.L.; Hanemaayer, K.B.; Hoogeveen-Westerveld, M.; van Eeghen, A.M.; Lequin, M.H.; van den Ouweland, A.M.; Moll, H.A.; Nellist, M.; et al. Genotype and brain pathology phenotype in children with tuberous sclerosis complex. *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24*, 1688–1695. [[CrossRef](#)]
240. Baskin, H.J., Jr. The pathogenesis and imaging of the tuberous sclerosis complex. *Pediatr. Radiol.* **2008**, *38*, 936–952. [[CrossRef](#)]
241. Sahin, M.; Henske, E.P.; Manning, B.D.; Ess, K.C.; Bissler, J.J.; Klann, E.; Kwiatkowski, D.J.; Roberds, S.L.; Silva, A.J.; Hillaire-Clarke, C.S.; et al. Advances and Future Directions for Tuberous Sclerosis Complex Research: Recommendations From the 2015 Strategic Planning Conference. *Pediatr. Neurol.* **2016**, *60*, 1–12. [[CrossRef](#)]
242. Henske, E.P.; Jozwiak, S.; Kingswood, J.C.; Sampson, J.R.; Thiele, E.A. Tuberous sclerosis complex. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16035. [[CrossRef](#)]
243. Oka, A.; Takashima, S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neurosci. Lett.* **1998**, *252*, 195–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Lim, D.S.; Kirsch, D.G.; Canman, C.E.; Ahn, J.H.; Ziv, Y.; Newman, L.S.; Darnell, R.B.; Shiloh, Y.; Kastan, M.B. ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10146–10151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Guo, Z.; Kozlov, S.; Lavin, M.F.; Person, M.D.; Paull, T.T. ATM activation by oxidative stress. *Science* **2010**, *330*, 517–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Al-Choboq, J.; Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; El-Nachef, L.; Maalouf, M.; Berthel, E.; Foray, N. Usher Syndrome Belongs to the Genetic Diseases Associated with Radiosensitivity: Influence of the ATM Protein Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1570. [[CrossRef](#)]
247. Meyn, M.S. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* **1993**, *260*, 1327–1330. [[CrossRef](#)]
248. Maalouf, M.; Granzotto, A.; Devic, C.; Bodgi, L.; Ferlazzo, M.; Peaucelle, C.; Bajard, M.; Giraud, J.Y.; Balosso, J.; Herault, J.; et al. Influence of Linear Energy Transfer on the Nucleo-shuttling of the ATM Protein: A Novel Biological Interpretation Relevant for Particles and Radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2019**, *103*, 709–718. [[CrossRef](#)]
249. Brenner, D.J.; Doll, R.; Goodhead, D.T.; Hall, E.J.; Land, C.E.; Little, J.B.; Lubin, J.H.; Preston, D.L.; Preston, R.J.; Puskin, J.S.; et al. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13761–13766. [[CrossRef](#)]
250. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose-Response A Publ. Int. Hormesis Soc.* **2020**, *18*, 1559325820913784. [[CrossRef](#)]
251. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-Response A Publ. Int. Hormesis Soc.* **2018**, *16*, 1559325818789836. [[CrossRef](#)]
252. Devic, C.; Bodgi, L.; Sonzogni, L.; Pilleul, F.; Ribot, H.; Charry, C.; Le Moigne, F.; Paul, D.; Carbillet, F.; Munier, M.; et al. Influence of cellular models and individual factor in the biological response to chest CT scan exams. *Eur. Radiol. Exp.* **2022**, *6*, 14. [[CrossRef](#)]
253. Devic, C.; Bodgi, L.; Sonzogni, L.; Pilleul, F.; Ribot, H.; de Charry, C.; Le Moigne, F.; Paul, D.; Carbillet, F.; Munier, M.; et al. Influence of cellular models and individual factor in the biological response to head CT scan exams. *Eur. Radiol. Exp.* **2022**, *6*, 17. [[CrossRef](#)]

1 Review

# 2 The strategies of anti-tumor radiotherapy and their 3 corresponding radiobiological outcomes: some questions of 4 time, energy, and space.

5 Eymeric Le Reun<sup>1‡</sup>, Larry Bodgi<sup>2‡</sup>, Michel Bourguignon<sup>1,3</sup>, and Nicolas Foray<sup>1\*</sup>

6 <sup>1</sup>Inserm, U1296, « Radiation: Defense, Health and Environment », Centre Léon-Bérard, 28,  
7 rue Laennec, 69008 Lyon, France;

8 <sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, American University of Beirut Medical Center, Riad El-  
9 Solh, Beirut 1107-2020, Lebanon;

10 <sup>3</sup>Université Paris Saclay, 78180, Saint Quentin en Yvelines, France.

11  
12 <sup>‡</sup>These two authors have contributed equally to this work.

13 <sup>\*</sup>Correspondence: Nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33 4 78 78 28 28

14 **Simple Summary:** We reviewed the influence of time, energy and space factors in-  
15 volved in any anti-cancer radiotherapy approach with regard to the recent advances  
16 in radiobiology.

17 **Abstract:** Since the first documented attempt of an anti-cancer radiotherapy (RT)  
18 performed by Victor Despeignes in 1896, the time, energy, space and dose appeared  
19 to be crucial factors to design the most efficient treatment to kill tumor while sparing  
20 healthy tissues. Indeed, *time* (through dose hypo/hyper-fractionation, dose repetition  
21 and dose-rate effects), *energy* (to reach deep tumors with particles and deliver the  
22 maximal dose in tumor) and *space* (through a more precise tumor targeting and by  
23 avoiding abscopal and bystander effects) are still contributing together to develop  
24 new RT modalities and personalized treatment. However, these major factors have  
25 not been investigated, understood and introduced in the RT planning with the same  
26 success all along the history of radiation oncology and biology. Here, we reviewed  
27 the impact of time, energy and space factors on the radiobiological events, associated  
28 with the current RT modalities by considering the most recent features of the  
29 individual response to ionizing radiation.

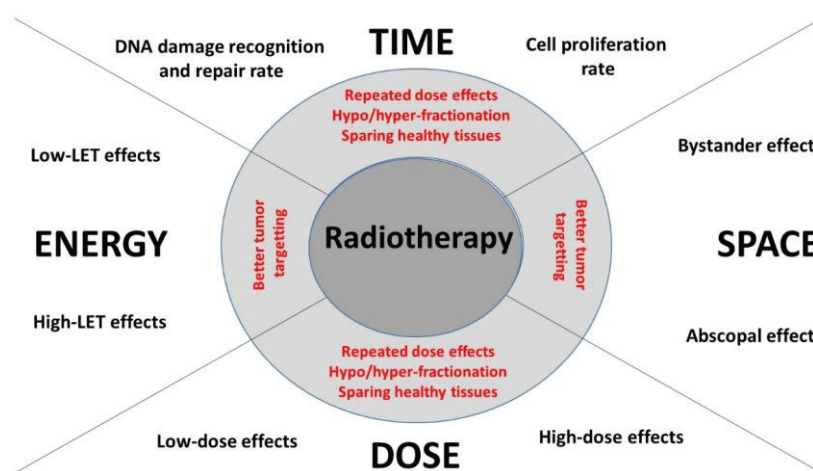
30 **Keywords:** radiotherapy; time factor; energy factor; space factor; ionizing radiation;  
31 radiation

## 32 1. Introduction

33 Less than 6 months after the discovery of X-rays by Roentgen [1], Victor Despeignes  
34 described the first documented radiotherapy (RT) attempt against the tumor of his neighbor

[2,3] : between the 4<sup>th</sup> and the 22<sup>nd</sup> of July, 1896, he applied a daily bi-fractionated exposure of X-rays, by placing the Crookes tube some centimeters above the tumor [2-6]. The physical features of this historical RT were necessarily limited by the technical constraints at that time. As an example, the X-rays were soft and their energy was lower than 40 kV [7,8]. Furthermore, the design of the treatment obeyed more practical considerations and intuition than scientific reasoning. As an example, the daily bi-fractionated treatment, applied early in the morning and late in the evening was probably chosen because it permitted Despeignes to visit his other patients during the day, like he usually did. In addition, this treatment schedule may also have been inspired from a protocol applied in March 1896 on animals suffering tuberculosis at the University of Lyon, France, by the former Despeignes's colleagues [2,9].

Whatever the justification of the design of this first RT attempt, one can reasonably consider that *time* (through hypo- or hyper-fractionation of the dose), *energy* (to reach deep tumors) and *space* (for a more precise tumor targeting), are, with the radiation *dose*, the major factors characterizing any RT. However, despite more than one century of technological advances, these major factors have not been investigated, understood and introduced in the RT planning with the same success all along the history of radiation oncology and biology [10] : time, energy and space factors still raise a number of biological and clinical questions [11] (Fig. 1).



**Figure 1:** Schematic illustration of the role of time, energy, space and dose factors in RT.

56 In parallel with the technological advances in radiation oncology, some new notions  
57 have emerged in radiation biology. In 2016, from one of the largest collection of cells from  
58 patients suffering from a wide spectrum of radiosensitivity [12], we have proposed a  
59 unified mechanistic model of individual response to radiation, relevant for both healthy  
60 tissue and tumor cells. [13]. Particularly, this model is based on the radiation-induced (RI)  
61 of nucleoshuttling of the ATM protein (RIANS), and integrates dose, time, energy and space  
62 factors through the following steps : 1) the oxidative stress due to ionizing radiation (IR)  
63 triggers the monomerization of the ATM dimers, mostly localized in cytoplasm and the  
64 induction of DNA damage, notably DNA double-strand breaks (DSB) , both in a linearly  
65 dose-dependent manner; 2) the ATM monomers diffuse in nucleus, phosphorylate the  
66 H2AX histone variant ( $\gamma$ H2AX) which triggers recognition and repair of the RI DSB [13].  
67 Any delay in the RIANS may cause radiosensitivity (RI adverse tissue reactions),  
68 radiosusceptibility (RI cancers) and/or radiodegeneration (RI accelerated aging) [14,15]. The  
69 RIANS model is one of the rare mechanistic models of radiobiology that provides relevant  
70 biological interpretation of the linear-quadratic (LQ) model that, since the 1970s,  
71 empirically links dose to clonogenic cell survival [16]. Furthermore, the RIANS model has  
72 permitted to better explain some effects specific to low-dose, like the hypersensitivity to  
73 low dose [16], the adaptive response [17] and the hormesis [18] phenomena and the  
74 relationships between linear energy transfer (LET) and relative biological efficiency (RBE)  
75 [19]. More recently, we investigated the mechanisms of bystander effect, that gathers the  
76 radiobiological effects occurring on non-targeted cells situated at the close vicinity of  
77 irradiated cells: the role played by RIANS in the bystander effect was highlighted [20].

78 Here, throughout an historical approach, we reviewed the impact of time, energy and  
79 space factors on the radiobiological events, associated with the current RT modalities and  
80 their roles in the bases of the RIANS model.

## 2. The time factor in radiobiology and in RT

### 2.1. Time factor in radiobiology: focus on DNA damage repair and cell proliferation rates

There are two major areas in radiobiology in which the time factor may impact significantly on tumor killing (Fig. 2):

- *DNA damage recognition and repair rate*: the individual response to IR is strongly dependent on the RI DNA damage recognition and repair [21-23]. A period of time post-irradiation permits cells to recover from the RI injuries, whatever healthy tissues or tumors. One of the major aims of anti-cancer RT strategy is therefore to favour DNA damage repair in healthy tissues while preventing it in tumors. However, the differences between the RI DNA damage recognition and repair rates in healthy tissues and in tumors are not necessarily large, which may explain some failures of some RT approaches [14](Fig. 2).
- *Proliferation rate*: Post-irradiation time also permits cells to proliferate. Still to date, some authors cite the Bergonié and Tribondeau's law to justify the whole strategy of RT. Published in 1906, the Bergonié and Tribondeau's law has long suggested that the most proliferative tissues were the most radiosensitive. However, a considerable number of data have shown that tumors are not necessarily more radiosensitive than healthy tissues and that the proliferation rate is not correlated to radiosensitivity [24,25]. Furthermore, let's recall that, for a given individual, there is no correlation between the radiosensitivity of healthy tissues and that of his tumor [14]. In parallel, to increase the dose to the tumor may ensure a durable cell cycle arrest, which may limit the metastatic process. However, again, high doses may affect healthy tissues and lead to severe tissue reactions post-RT (see next paragraphs) (Fig. 2).
- *Tissue reactions and immunoresponses* : once cell cycle arrest and cellular death pathways are triggered, the first cell debris may be observed at the tissue scale. At this step may begin the immunological response to radiation with pro- and anti- inflammatory cytokines. This step is notably particularly important in the frame of the acute radiation syndrome [26,27] (Fig. 2).

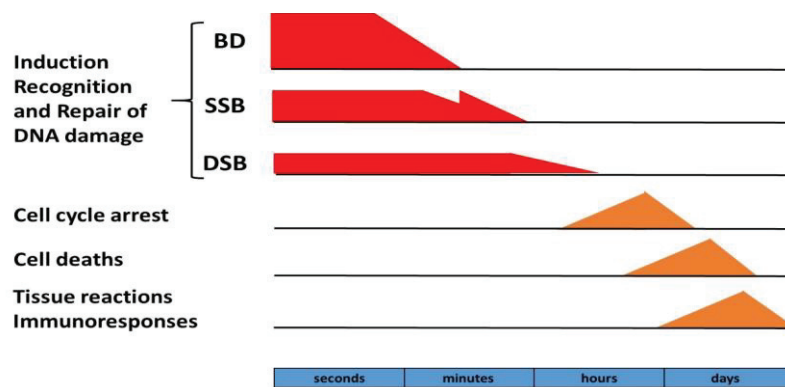


Figure 2: Schematic illustration of the time factor in radiobiology

### 2.1.1 Time and DNA damage

IR induce a large spectrum of biochemically different DNA damage that are characterized by specific induction, recognition and repair rates. A dose of 1 Gy of high energy X- or  $\gamma$ -rays simultaneously produces about 10,000 base damage (BD), 1000 DNA single-strand breaks (SSB) and 40 DSB per cell. About 50% BD, SSB and DSB are repaired in 5-10 min, 10-20 min and 50-60 min, respectively. The simultaneous production of such various DNA damage by radiation leads to specific events in a complex choreography (Fig. 2):

- BD are not repaired as such but "excised", i.e. transformed into SSB [28,29]. Normally, this process takes about a few minutes to a few tens of minutes, according to the genetic status of irradiated cells. The analysis of the formation of RI SSB reveals 2 waves of SSB production: the formation of SSB induced immediately post-irradiation and the formation of SSB resulting from the excision of BD that occurs few minutes post-irradiation after the direct RI production of SSB [30] (Fig. 2).

- When SSB, whether resulting from the excision-resynthesis process or from a direct ionisation, are too numerous on DNA, some DSB can be created indirectly. Theoretically, one DSB can be produced if two SSB are present on each strand at a distance lower than 50 bp. However, this scenario occurs only in two situations : after doses of the order of MGy (i.e. in non-realistic conditions) [31] or when an *hyper-recombination process* occurs. The hyper-recombination process reflects a lack of control of SSB and DSB repair. It can produce large numbers of SSB and DSB during a very rapid time interval (some minutes). Hyper-recombination has been systematically



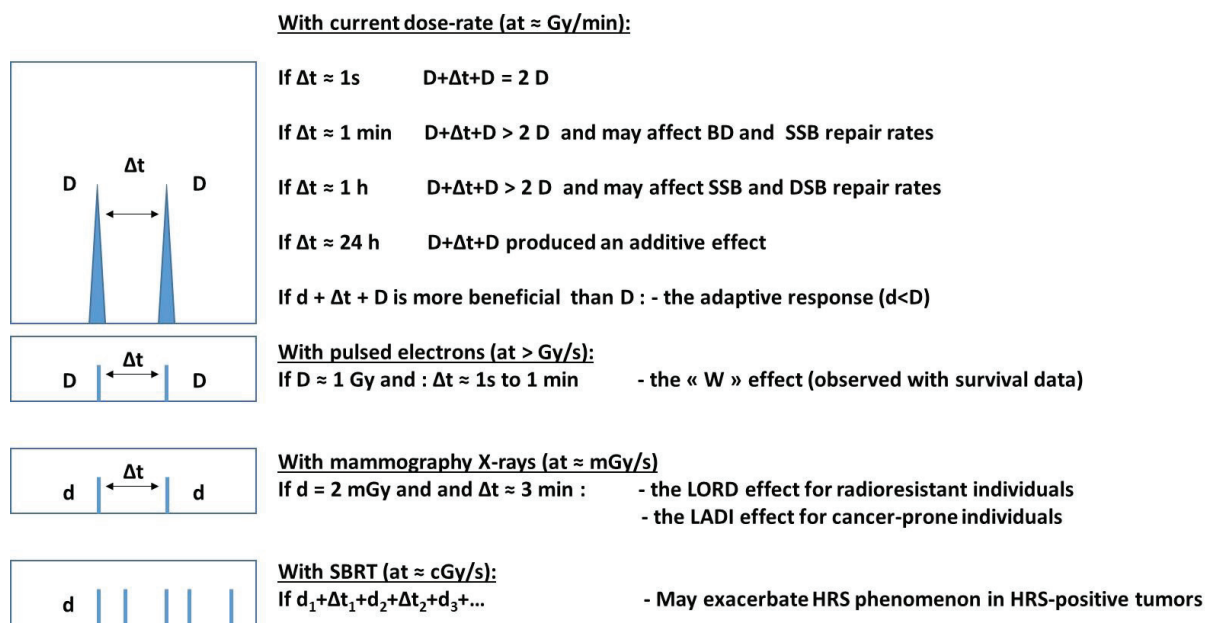
135 observed in the cells from patients showing genomic instability and strong predisposition to  
136 cancer such as familial predispositions to breast cancer, Fanconi anemia or Bloom syndrome  
137 [15,32,33]. The hyper-recombination may be stimulated by irradiation [14]. Interestingly, by us-  
138 ing an alkaline elution technique, some authors have described multiphasic kinetics of DNA  
139 damage repair with the production of direct SSB, the indirect SSB and thereafter the direct and  
140 indirect DSB [30].

141 Another consequence of the production SSB is the chromatin decondensation since the presence  
142 of strand breaks can perturb the scaffold organization of DNA. It is noteworthy that such con-  
143 tribution to the biological dose does not appear in the measurement of the physical dose. The  
144 extent of the chromatin decondensation is proportional to the number of SSB, and therefore to  
145 the dose. [14,34]. The two waves of SSB induction trigger two successive decondensations post-  
146 irradiation. Consequently, when SSB repair is not complete or chromatin is still decondensed, a  
147 second dose of radiation may produce more DNA damage than the first one because of an en-  
148 hanced accessibility of radiation to chromatin [34] (Fig. 3):

- 149 - If  $\Delta t$  is lower than one second: no significant repair of any type of RI DNA damage can  
150 occur during  $\Delta t$ : the dose repetition effect is negligible and the biological effect is equivalent  
151 to a single dose corresponding to the sum of the two doses [34].
- 152 - If  $\Delta t$  is of the order of second, the functionality of BD repair is crucial and a supra-additive  
153 dose repetition effect may occur in cells from patients deficient in the excision-resynthesis  
154 pathway (i.e. photosensitive or sensitive to chemotherapy drugs inducing BD (eg: inhibi-  
155 tors of PARP)) [34].
- 156 - If  $\Delta t$  is of order of minute, the functionality of the repair of SSB is crucial and a supra-  
157 additive specific dose repetition effect may occur in cells from patients showing hyper-re-  
158 combination, (i.e. predisposed to cancer or sensitive to chemotherapeutic drugs inducing  
159 SSB (eg: bleomycin, cisplatin)) [34].

- 160 - If  $\Delta t$  is of the order of hour, the functionality of the repair of DSB is crucial and a supra-  
161 additive specific dose repetition effect may occur in cells from patients associated with de-  
162 fects in repair of the DSB (i.e. suffering from moderate to strong radiosensitivity or sensitive  
163 to chemotherapy drugs inducing DSB (eg: doxorubicin)) [34].
- 164 - If  $\Delta t$  is higher than 24 h, all the types of repairable RI DNA damage are repaired: the dose  
165 repetition effect is generally additive, according to the individual radiosensitivity. Interest-  
166 ingly, current RT sessions are generally separated by 24 h or more, for obvious practical  
167 reasons whether the anti-tumor treatment is hypo- or hyperfractionated (Fig. 3). Such su-  
168 pra-additivity is valid whatever the cell cycle phase [35]. For example, cells pre-irradiated  
169 in G2 were shown to elicit an excess of DSB after a second dose [36]. This explanation, how-  
170 ever, remains closely related to the SSB repair rate and can become very complex because  
171 of its dependence vis-à-vis the dose and the genetic status [37,38]. Applying a second dose  
172 during or between these two decondensations can therefore produce different effects. In  
173 patients whose cells are defective in certain steps of the BD excision-resynthesis repair path-  
174 ways, the chromatin remains decondensed longer, thus worsening the severity of the RI  
175 DNA damage induced by the second dose. It should be noted that the genetic statuses cor-  
176 responding to a dysfunction of excision-resynthesis are generally associated with photo- or  
177 chemosensitivity but generally not with strong radiosensitivity [14,39].
- 178 - With regard to DSB, as said above, about 50% of the RI DSB are generally repaired in about  
179 1h post-irradiation in radioresistant cells with a completed repair expected at 24 h post-  
180 irradiation. By contrast, in radiosensitive cells, whether normal or tumor ones, the repair  
181 half-life of DSB can reach 4-8 h [35,40]. Reports about repeated doses separated by 24 h  
182 showed a linearly-dose-dependent accumulation of unrepaired DSB in radioresistant cells  
183 while the effect, strongly dependent on individual radiosensitivity, may be supra-additive  
184 if the interval is lower than 4 h [39].

185 Hence, by considering  $\Delta t$ , the time interval between two doses [39], the major potential dose  
186 repetition effects are summarized in Fig 3.



**Figure 3:** Schematic illustration of the major dose repetition effects. “D” indicates doses higher than 1 Gy and “d” indicates lower doses.

There are several examples of supra-additive effects observed when  $\Delta t$  is lower than 24 h. Particularly, the “W” effect observed during a pulsed radiotherapy and, even if they belong to the radiodiagnosis area, it was important to cite the dose repetition effects observed during mammography screening conditions :

- Using a linear electron accelerator capable of delivering pulsed irradiation, the Favaudon's group demonstrated in 1996 a tetraphasic effect (the “W” effect) resulting from the succession of 2 doses of the order of Gy spaced with time intervals of the order of a second to a minute. The intensity of the effect strongly depends on the cell line. In addition, the status of PARP and the organization of chromatin may condition the existence or intensity of the W effect, in accordance with our conclusions mentioned above [41,42];
- The most current mammographic screening views are based on the repetition of two face/profile views separated by few minutes. These conditions (namely 2 mGy + 3 min + 2 mGy) applied to human mammary epithelial cells resulted in two phenomena [43] :
  - Low and repeated dose (LORD) effect: if  $\Delta t$  is insufficient to allow DNA damage repair between the two doses, RI DNA breaks induced by the first dose cause chromatin decondensation and the second dose produces more DNA breaks: consequently, 2 mGy

207 + 3 min + 2 mGy produces more SSB and DSB than a single dose of 4 mGy. The LORD  
208 effect concerns all the cells whatever their radiosensitivity.

- 209 • Low-dose-induced additional breaks (LADI) effect: in cells providing from patients  
210 predisposed to cancer, hyper-recombination process is stimulated by the first and the  
211 second dose and leads to the production of additional DNA strand breaks. As a result,  
212 combined to the LORD effect, cells from patients predisposed to cancer 2 mGy + 3 min  
213 + 2 mGy produces much more SSB and DSB than a single dose of 4 mGy than in cells  
214 from patients at low risk.

### 216 2.1.2 Time and cell proliferation

217 Unlike a current belief and misinterpretation about proliferation rate, it must be stressed  
218 that cells do not stop their cell cycle to repair RI DNA damage: as specified above, the time  
219 scales of the RI DNA damage induction and repair processes range between minutes and some  
220 hours while that of cell cycle arrests range between some hours and some days [14]. In fact, the  
221 duration of the cell cycle arrests (notably in G2/M) are generally proportional to the dose and/or  
222 to the yield of unrepaired DNA damage. About 1 h after irradiation, all the BD and SSB and the  
223 majority of DSB are repaired already while the proteins that trigger the cell cycle are not yet  
224 activated [14]. Indeed, flow cytometry experiments do not show significant arrests in G1 or G2  
225 after a few minutes post-irradiation [14]. The phosphorylation of proteins involved in cycle  
226 arrest and then cell death is in fact conditioned by the phosphorylation of the proteins involved  
227 in the DNA damage recognition and repair steps [44] For example, the phosphorylation of the  
228 proteins CHK1, CHK2 or p53 that triggers the arrests in G2 and G1, respectively, is observed a  
229 few hours after the phosphorylation of H2AX [33,44].

## 231 2.2. The time factor in RT: focus on the hypo-fractionated and FLASH RT

### 232 2.2.1 Differences between hypo- and hyper-fractionation

233 To spare healthy tissues by a fractionation of the total dose is one of the funding ideas of  
234 RT [2]. This idea was notably shared by the pioneer of radiation, Leopold Freund, from Wien,  
235 Austria [45]. During the first decade of the 20th century, numerous anti-cancer RT modalities  
236 were applied to various tumors but the World War I delayed any consensus approach. From

the 1920s to the 1930s, some other pioneers, in particular the “French school” at Institut Curie (Paris, France) led by Regaud, Coutard and Del Regato, showed that hypofractionation might lead to severe tissue reactions: they promoted hyperfractionated treatment delivering the dose for a longer period of time. They were opposed to the “German school” led by Holzknecht and Wintz that preferred to apply high doses in a short period of time [7]. Particularly, Coutard suggested that high doses per fraction should be avoided because they cause severe injuries to the connective tissues [46]. In other terms, clinicians should protract the treatment duration to spare healthy tissues while increasing the dose per fraction to kill tumor. Progressively, the early and late post-radiotherapy tissue reactions were more and more documented and standard or, at least, current hyper-fractionated treatments were progressively defined for all the types of tumors. In 1967, Ellis proposed a formula defining the nominal standard dose (NSD) [47,48]:

$$NSD = \frac{D}{N^{0.24}T^{0.11}} \quad (1)$$

in which N is the number of fractions, T is the time in days between the first and the last session and D is the total absorbed dose delivered. Many variants derived from this formula[49]. Unfortunately, while the NSD formula have had a significant influence on clinical practice and was successful in prediction of isoeffective regimens for early RI tissue reactions, it dramatically failed in the prediction of severe RI late tissue reactions after large dose per fraction. Progressively, the use of the  $\alpha$  and  $\beta$  parameters of the linear quadratic (LQ) model (Equation (2)) permitted a better approach to guide clinicians in their choice of the dose fractionation regimen [50] :

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (2)$$

in which S is cell survival, D the dose and  $\alpha$  and  $\beta$ , some adjustable parameters. Generally,  $\alpha$  and  $\beta$  values for human tumors range from 0.1 to 1.5 Gy<sup>-1</sup> and from 0.001 to 0.25 Gy<sup>-2</sup>, respectively. The highest  $\alpha$ -values correspond to the highest radiosensitivity. The highest  $\beta$ -values correspond to the most shouldered survival curves and a moderate radiosensitivity [16]. The  $\alpha/\beta$  ratio is the dose at which the linear  $\alpha D$  and the quadratic  $\beta D^2$  components cause the same amount of cell killing. Hence, the extended LQ theory said that the higher the  $\alpha/\beta$  ratio is,

the more linear the cell survival curve. Tumors with high  $\alpha/\beta$  ratio ( $>10$  Gy) are considered as early responding and are particularly radiosensitive: anti-tumor radiotherapy can be efficient with 1.8-2 Gy per fraction but hyper-fractionation should help in sparing healthy tissues. In the case of tumors with  $\alpha/\beta$  ratio of around 3-5 Gy that are considered as late responding, the dose per fraction should be increased since they are more radioresistant. This is the case of melanoma, sarcoma and prostate cancer.

To elaborate new anti-cancer strategies to treat tumors of low  $\alpha/\beta$  ratio has relaunched the debate about dose hypofractionation with stereotactic technologies that permit to target tumor more precisely. Particularly, stereotactic body radiation therapy (SBRT) is based on a robotic system delivering many independent and non-coplanar beams (usually a hundred beams) converging to the tumor with sub-millimetric accuracy, under continuous X-ray image guidance [51,52]. During one SBRT session, the targeted tumor is generally exposed to a hyper-fractionation of low doses of the order of cGy. Since some minibeam may overlap the same regions of the targeted tumor, a SBRT session may finally result in some repeated low doses separated by some seconds to some minutes (Fig. 3). Interestingly, the hypersensitivity to low dose (HRS) phenomenon can occur in these conditions of irradiation. Let's remind that the HRS phenomenon may result in enhancing the effect of low dose to an effect equivalent to a dose 5 to 10 times larger [16,53,54]. In a study submitted recently, we have shown that SBRT is particularly more efficient with HRS-positive tumors (Pêtre et al. submitted). In this particular case, the dose and time factors may converge to a very specific over-kill dose repetition effect (Fig. 3).

### 2.2.2 The FLASH RT

Another way to exploit the time factor in RT is to vary the dose-rate of the treatment. Low-dose rates (lower than some Gy/min) permit concomitant induction and repair of DNA damage and therefore a reduction of the DNA cell killing. The great majority of RT approaches have been performed at dose-rates of about some Gy /min. In parallel with the development of hypofractionated RT, the time factor has been also exploited by the use of ultrahigh dose-rate

( $>40$  Gy/s) RT called FLASH RT. Initially observed with electron accelerators, FLASH RT is now developed with protons, which raised the question about the energy factor discussed below [55]. However, while the radiobiological mechanisms of FLASH RT are not fully understood, it has provided encouraging results “from bench to bedside”. In 1950s-60s, some studies reported that cells irradiated at ultra-high dose-rate exhibited a better survival compared with conventional dose-rate, with both X-rays [56,57] and electrons [58]. Extrapolated from non-tumor cells, these data suggested a potential benefit in anti-tumor RT. However, the FLASH effect was not explored in malignant tissues and fell into oblivion for almost 50 years.

In 2014, Favaudon et al significantly documented the FLASH effect by irradiating mice lung tumor and normal cells with electrons. The *in vitro* results showed that FLASH RT could reach the same anti-tumor efficiency as conventional RT ( $\leq 0.03$  Gy/s), while decreasing inflammation and apoptosis in healthy tissues [59]. Later, the FLASH effect was confirmed *in vivo*, by protecting neurocognitive functions in mice [60] and by ensuring tumor control in 6 cats with locally advanced T2/T3N0M0 squamous cell carcinoma of the nasal planum [61]. Finally, in 2019, Bourhis et al performed the first FLASH RT in a human patient against a T-cell cutaneous lymphoma. A total dose of 15 Gy delivered in 90 ms led to transient grade 1 local toxicity, with complete tumor response after 5 months follow-up [62]. Interestingly, proton irradiation showed similar tumor control in two murine sarcoma models both with ultrahigh or standard dose rate, and also fewer severe toxicities leading to death or requiring euthanasia in mice, thus suggesting that FLASH effect may be independent of the particle used [55]. It is also noteworthy that FLASH RT should not exceed a certain total dose (around 30 Gy), or a minimal field size (8 x 8 cm for instance), in order not to expose the patient to fibrosis and skin necrosis [61].

### 2.3 The time factor in the RIANs model

#### 2.3.1. The flux of ATM monomers

The time factor is a basic feature of the RIANs model since it is introduced for both DSB recognition and repair times but overall for the time during which the ATM monomers reach and diffuse in the nucleus [13,16]. In a case of an exposure to a single dose, the presence of

321 specific ATM substrates overexpressed in cytoplasm (called X-proteins) may delay the RIANs  
322 and favour radiosensitivity, radiosusceptibility and/or radiodegeneration phenotypes [13,16].  
323 In radioresistant cells (group I; fast RIANs), the RIANs generally takes 10 min after 2 Gy to  
324 recognize all the RI DSB while cells showing moderate radiosensitivity (group II; delayed  
325 RIANs) may elicit an average delay of RIANs up to 1 h for a complete recognition. Hence, in  
326 the case of a dose repetition, if the  $\Delta t$  time interval between two doses is lower than several  
327 minutes, the RI effect can be considered as equivalent to that induced by a single dose equal to  
328 the sum of the two repeated doses, as already expected (see above; Fig. 3,4). Conversely, if the  
329 time interval between the two doses is longer than the half-life of the ATM protein (considered  
330 to be about 24h), the ATM monomers induced by the first dose that have diffused in the nucleus  
331 will not be active to participate to the recognition and repair of the DNA damage induced by  
332 the second one: the repeated dose effect becomes additive, again, in agreement with the above  
333 statements (Fig. 3, 4). In all the intermediate scenarios, with  $\Delta t$  higher than 1 s but lower than 24  
334 h, the ATM monomers induced by the first dose may participate differentially to the ATM-  
335 dependent recognition and repair of the RI DNA damage. One of the most representative  
336 examples of the influence of RIANs on the final response after a dose repetition is the adaptive  
337 response phenomenon [17,63]. Indeed, in a  $d + \Delta t + D$  irradiation scenario, we have shown that,  
338 in certain conditions, the ATM monomers induced by  $d$  may help in recognizing the DSB  
339 induced by  $D$ , then producing a biological effect less deleterious than a single exposure to  $D$  [17]  
340 (Fig. 4). Similarly, we recently provided clues that, the succession of minibeam on an HRS-  
341 positive tumor may reproduce several HRS phenomena and therefore drastically enhance the  
342 final response to SBRT (Pêtre et al., submitted).

343

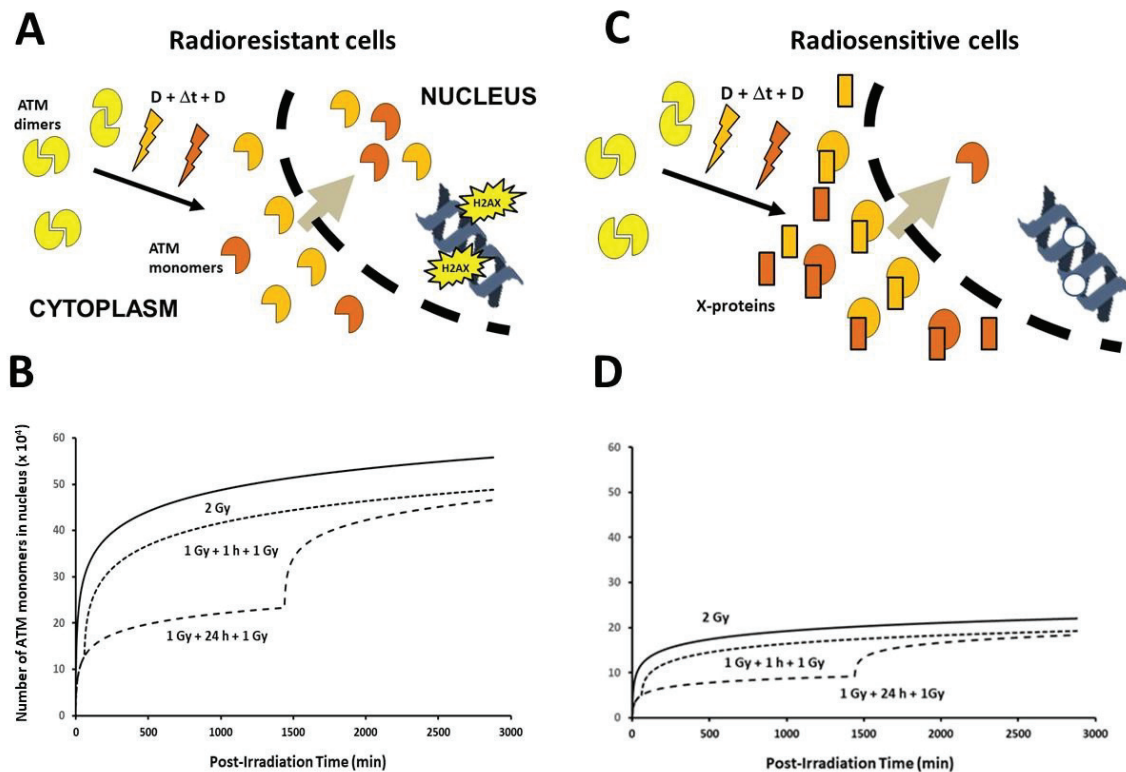
344

345

346

347





**Figure 4:** Schematic illustration of a dose repetition effect in radioresistant (group I; fast RIANs, panel A) and radiosensitive (group II; delayed RIANs, panel B) cells. Each dose  $D$  contributes to produce ATM monomers (through monomerization of cytoplasmic ATM dimers and DNA damage. In the case of group II, some ATM-X-protein complexes may be formed, which reduces the final number of ATM monomers in the nucleus. Theoretical numbers of nuclear ATM monomers has been calculated for the indicated dose repetition scenarios for both radioresistant (panel C) and radiosensitive (panel D) cells from formulas developed in [16].

### 2.3.2 The RIANs model and the cell cycle checkpoints

As shown in previous works, the ATM kinase phosphorylates, in a hierarchical order, a number of proteins ATM substrates required for normal DNA damage recognition, repair, cell cycle control and cellular death signalling. The RIANs may condition the extent of recognition, repair and proliferation steps, strengthening the fact that the activation of the ATM kinase is a *primus movens* of the individual response to radiation [33,44]. Particularly, the cell cycle arrests observed at G1 and G2 have been shown to depend on the activity of the ATM kinase to phosphorylate CHK2 and CHK1 substrates that are mostly situated in cytoplasm. In other terms, the extent and the kinetic of the G1 and G2 cell cycle arrests after irradiation directly depend on the amount of the active ATM monomers, and therefore to the RIANs [33].

### 2.3.3 The RIANS model, the $\alpha/\beta$ ratio and the dose hypo/hyperfractionation effects

Finally, considering the importance of the  $\alpha/\beta$  ratio in the dose hypo/hyperfractionation effects, it was necessary to examine whether and how the RIANS model is linked to the LQ model. Interestingly, the RIANS model has provided a biological interpretation of the LQ model [16] : two types of lethal DSB are considered:

- The  $\alpha$ -type DSB, that are recognized by the ATM monomers in nucleus (presence of  $\gamma$ H2AX foci; DSB managed by NHEJ) but that remain unreparable (persistent  $\gamma$ H2AX foci). The number of  $\alpha$ -type DSB  $N_\alpha$  was demonstrated to be proportional to the dose  $D$  with  $\alpha$ , the proportionality coefficient:  $N_\alpha = \alpha D$  [16].
- The  $\beta$ -type DSB, that are not recognized by the ATM monomers in nucleus because of a delay or an absence of the RIANS (absence of  $\gamma$ H2AX foci; DSB non-managed by NHEJ). The number of  $\beta$ -type DSB  $N_\beta$  was demonstrated to be proportional to the square of the IR dose  $D$  with  $\beta$ , the proportionality coefficient :  $N_\beta = \beta D^2$  [16].

The sum  $N(D) = N_\alpha(D) + N_\beta(D)$  represents therefore the number of lethal DSB as a function of the dose whatever the origin of the lethality of the unrepaired DSB. In the frame of a Poisson probability, the expression of the clonogenic cell survival  $S$  fully corresponds to the formula of the LQ model (formula (2)). As a consequence,  $\alpha/\beta D$  corresponds to the ratio between number of the DSB recognized by the ATM monomers (i.e. managed by NHEJ) and those non-recognized by the ATM monomers. In other terms, at  $D = \alpha/\beta$ , the numbers of DSB recognized by ATM and non-recognized are equal. Hence, the  $\alpha/\beta$  ratio reflects the capacity of cells of recognizing DSB by the ATM monomers at a given dose  $D$  [16].

### 2.3.4 The RIANS model and the first hypotheses about the FLASH RT

Since the RIANS model, and notably the flux of ATM monomers obeys dose- and time functions, the RIANS model is naturally regulated by the dose-rate. With regard to the ultra-high dose-rate (FLASH RT), it is noteworthy that the RIANS model predicts a complete lack of DNA damage recognition and repair at high dose. In fact, if the dose is very high, the concentration of RI ATM monomers in the cytoplasm is so high that the probability of their

diffusion in the nucleus is lower than the probability of their re-association as ATM dimers [16]. Hence, no recognition and therefore no repair of DSB are possible in areas targeted by the ultra high dose rate. However, such effect should be limited in dose and surface by “space” effects like bystander and abscopal if additional DNA damage cover surrounding healthy tissues. Further investigations with FLASH radiotherapy are needed to confirm this hypothesis.

### 3. The energy factor in radiobiology and in RT

#### 3.1 *The energy factor in radiobiology*

At the molecular scale, each type of rays and particles induces a specific spectrum of energy micro-depositions in matter [31,64-67]. The major paradigm of the energy factor in radiobiology is that the denser the energy micro-deposition, the less repairable the resulting DNA damage. However, in the particular case of an irradiation with particles, the irradiation is not necessarily homogenous. Hence, some “hot” spots of ionization can occur, in which a considerable amount of energy yields different type of RI damage while some non-targeted areas may elicit very few, if any, RI DNA damage (Fig. 5A,B). Considering such spatial heterogeneity of the impacts, the specific question raised by an exposure to particles is the relevance of the average number of RI DNA damage per Gy per cell to predict the actual biological response to radiation.

As said above, rays and particles produce three major types of DNA damage, BD, SSB and DSB. However, each type of RI DNA damage requires a minimal energy microdeposition to occur. Hence, 1, 10, and 100 eV/nm<sup>3</sup> can cause one BD, one SSB and one DSB, respectively. Consequently, the relative proportion of BD, SSB, and DSB strongly depends on the total energy deposited and therefore on each type of radiation. For example, 1 Gy  $\gamma$ -rays simultaneously produces about 10000 BD, 1000 SSB and 40 DSB per human diploid cells whereas the same dose of alpha-particles produces less BD and more DSB because of a higher relative proportion of high-density microdepositions [67-70]. The relative proportion of BD, SSB, and DSB may impact on the DNA damage reparability. Indeed, one DSB surrounded by several SSB that decondense chromatin may increase its severity. By contrast, low SSB/DSB ratio is associated with fastly

422 repaired DSB [67,69-71]. The precise determination of the induction rate of each type of RI DNA  
423 damage is therefore required to better evaluate the dose response to a given type of radiation.

424 At the cellular scale, to better quantify the importance of the energy factor, radiobiologists  
425 have used two important parameters: the linear energy transfer (LET) defined as the energy  
426 deposited on the track of a given particle and the relative biological efficiency (RBE) defined as  
427 the ratio of the radiobiological effect due to the given particle by comparison to an effect  
428 produced by X-rays [68,72]. The relationship between RBE and LET generally describes a  
429 pseudo-sigmoidal curve with 1) a plateau indicating no energy effect for the low-LET radiation  
430 up to 1 keV/ $\mu\text{m}$ , 2) an increasing part in which RBE increases linearly with LET, 3) a peak  
431 generally reached at around 100 keV/ $\mu\text{m}$ , and 4) a rapid decrease for higher LET values  
432 suggesting an “overkill” effect [68]. However, it has been shown that such RBE-LET relationship  
433 is obtained with radioresistant cells and that the shape of the RBE-LET curve may drastically  
434 vary with radiosensitivity but also with the molecular (e.g. number of unrepaired DSB) or  
435 cellular (e.g. cell survival at 2 Gy) endpoint chosen to calculate RBE [19].  
436

### 437 3.2 *The energy factor in RT*

438 To date, protons and carbon ions are the high-LET particles the most extensively used in  
439 RT. Energy lost by charged particles is inversely proportional to the square of their velocity.  
440 Hence, the energy of high-LET particles is generally deposited in the matter with the following  
441 sequence. First, high-LET ions enter tissues so fast that few ionizations are produced. Then, after  
442 a certain distance traveled in the matter, the particles lose all their energy and speed, producing  
443 high density of ionizations known as the Bragg peak. After the Bragg peak, the high-LET ions  
444 beam energy drastically falls down, leading to almost no interactions with the matter, and sparing  
445 the tissues located behind the target [73].

446 Proton and hadron therapy modalities exploit the Bragg peak properties to treat tumors  
447 located very close to critical organs, and/or requiring high curative dose [74]. The current indi-  
448 cations for proton therapy concern the ocular, orbital and paraorbital tumors [75], meningiomas  
449 [76,77], tumors of the base of skull [78], paraspinal tumors [79], and sarcomas [80,81]. Other indi-  
450 cations are also developing like breast [82] and lung cancers [83-85]. Compared to photons RT,

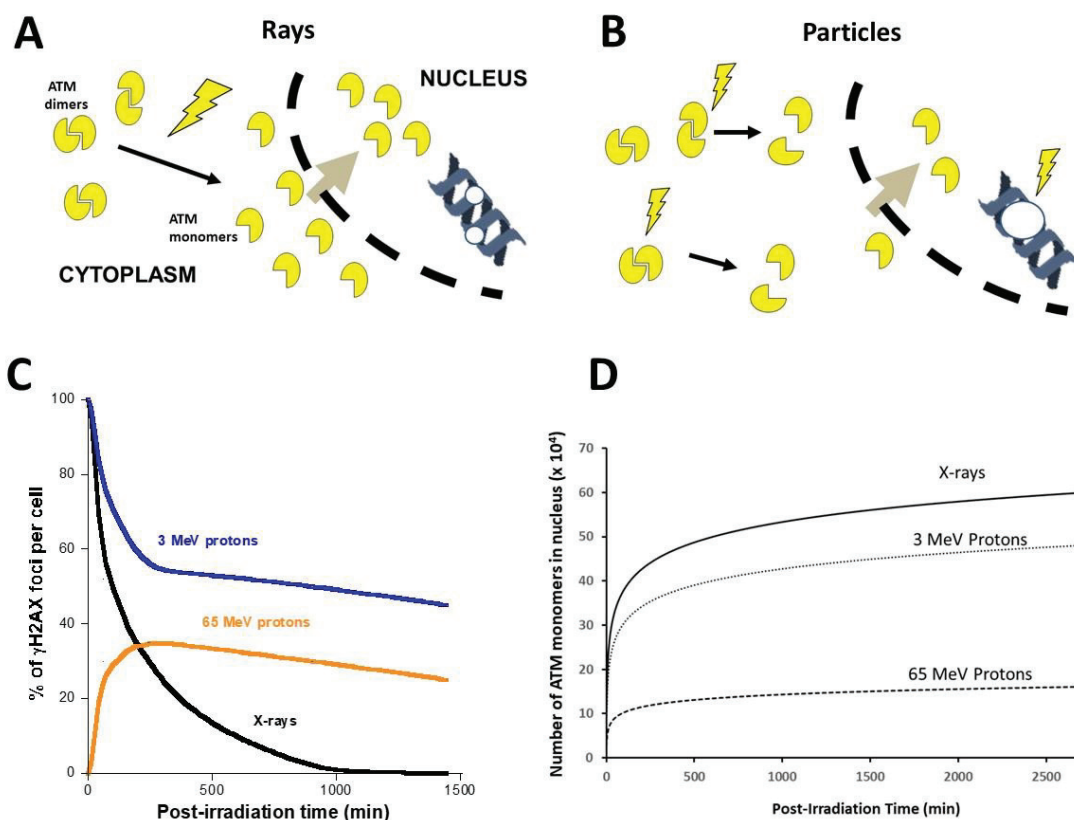
451 hadron therapy aims to reduce the diffused low dose around the tumor, hence representing a  
452 relevant alternative in pediatric patients with a high risk to develop a RI tumor [86,87]. It is  
453 noteworthy that proton therapy is also eligible to new external beam radiation therapy (EBRT  
454 techniques such as intensity-modulated RT [88,89], and possibly FLASH-RT [90]. Implemented  
455 in more than a hundred of centers worldwide, hadron therapy is now flourishing with about  
456 thirty facilities under construction and as many in project, according to the Particle Therapy Co-  
457 Operative Group (<https://www.ptcog.site/>).

### 458 459 *3.3 The energy factor and the RIANS model*

460 While exposure to X- or gamma-rays result in a very homogenous spatial distribution of  
461 energy microdepositions, exposure to high-energy particles may lead to an heterogeneous  
462 dispersion of energy microdepositions as high energy-density spots and unexposed areas  
463 [31,65,67] (Fig. 5A,B). Since the monomerization of cytoplasmic ATM dimers and the formation  
464 of DSB require a minimal amount of ionizations via water radiolysis, the induction rates of RI  
465 ATM monomers and RI DSB strongly depend on LET. However, the total amount of energy  
466 deposited may be sufficient in nucleus to induce DSB but not in cytoplasm to trigger ATM  
467 monomerization. Hence, the exposure of cells to high-LET particles raises two independent  
468 challenges: to mobilize a sufficient amount of ATM monomers to recognize all the RI DSB and  
469 to have DSB sufficiently repairable to avoid deleterious effects.

470 In a paper published in 2019, we have exposed human cell lines from different RIANS status  
471 to 6 MV photons and 3 and 64 MeV protons [19]. In the case of low-energy (3 MeV) protons  
472 (LET= 7 keV/ $\mu\text{m}$ ), the great majority of energy is deposited in surface (Fig. 5C, D). Hence, for  
473 fibroblasts in monolayers, the energy microdepositions distribution was found quantitatively  
474 and qualitatively sufficient to produce a minimal flux of ATM monomers to recognize all the  
475 DSB produced in the nucleus. Conversely, the energy microdepositions were so dense that the  
476 induced DSB were unreparable. The  $\alpha$ -type DSB contribution were therefore predominant for  
477 3 MeV protons. Hence, exposure to 3 MeV protons results in very severe DSB but these DSB are  
478 fully recognized by ATM (Fig. 5C,D). In the case of high-energy (65 MeV) protons (LET=10

479 keV/ $\mu\text{m}$ ), the energy microdepositions are so dispersed that the production of ATM monomers  
 480 was not sufficiently high to recognize all the induced DSB. However, their energy density at the  
 481 impact was sufficient to produce unreparable DSB like with 3 MeV protons. The  $\beta$ -type DSB  
 482 contribution were therefore predominant for 65 MeV protons. Hence, exposure to 65 MeV  
 483 protons results in very severe DSB but poorly recognized by ATM (Fig. 5C,D). In the case 6 MV  
 484 photons, the LET (about 1 keV/ $\mu\text{m}$ ) is low and the energy microdepositions are distributed more  
 485 homogeneously in cells. Consequently, the flux of ATM monomers is higher than with high-  
 486 LET particles and all the DSB are recognized. The  $\alpha$ -type DSB contribution are therefore  
 487 predominant for high-energy photons. In addition, since the energy microdepositions are less  
 488 dense than with particles, their reparability is high (Fig. 5C,D).



489 **Figure 5:** Schematic illustration of an irradiation with rays (A) or particles (B) with a homogeneous or  
 490 heterogeneous production of ATM monomers, respectively. (C) Kinetics of  $\gamma\text{H2AX}$  foci in radioresistant  
 491 fibroblasts irradiated at 2 Gy 6 MV photons, 3 MeV and 65 MeV protons as shown in [19]. (D) Theoretical  
 492 numbers of nuclear ATM monomers calculated for 2 Gy 6 MV photons, 3 and 65 MeV protons from the  
 493 formulas developed in [16].  
 494  
 495

## 4. The space factor in radiobiology and in RT

### 4.1 The space factor in radiobiology: focus on the abscopal and bystander effects

A very intuitive data interpretation in radiobiology consists in considering that RI effects are produced in irradiated cells only. However, even at the stone age of radiation applications, some pioneers made the hypothesis that RI effects may be extended outside the targeted area. The abscopal (AE) and the bystander (BE) effects are representative examples of such hypothesis. While AE is a radiobiological effect occurring at the tissue/organ scale, bystander effect (BE) is a non-targeted cells effect occurring at the subcellular scale.

#### 4.1.1 The abscopal effect

From the latin expression *ab scopum* meaning “at distance from the target”, AE is said to occur if there is a significant clinical response in a tissue that is physically separated from the region of the body exposed to radiation, (e.g., the regression of a distant metastasis after RT of the primary tumor). First evidence of the existence of AE was reported by Mole (1953) [91] and new cases were continuously reported : 46 cases were reported between 1969 and 2014 in a systematic review published elsewhere [92]. However, the understanding of the mechanisms of AE in relation to RT is of paramount interest.

For decades, radiation oncologists have explored the role of the immune system in the development of tumors with the hope to possibly activate the immune system to kill residual cancer cells. In the context of RT, some light came from the observations of the importance of an intact immune system (T cell competence) for controlling tumor growth [93]. Although the role of cytotoxic CD8+ T lymphocytes is clear in AE the induction of AE by RT remains unpredictable and dependent on the use of additional immunotherapy drugs such as antibodies. Among such antibodies, Ipilimumab for the treatment of melanomas [94,95]. Large clinical studies associating RT and Ipilimumab have demonstrated that AE is observed in about 30% of patients [96]. Thus, the control of the immune checkpoints appears to be required for the AE occurrence.

523 Different RT dose and fractionation schemes have been studied and an optimal amount of  
524 DSB seems necessary to initiate an antitumor immune response [97]. Although dose  
525 hypofractionation seems to initiate AE, the same total dose on the primary tumor does not.  
526 Furthermore, RT induces some immunosuppressive effect related to the dose, which may play  
527 a negative role in AE induction [98]. In addition, inter-individual variation in the  
528 immunosuppressive effect of RT is observed. This makes it challenging to predict optimal  
529 fractionation schemes that will induce an antitumor response [99]. So far there is no common  
530 radiation dose, fractionation scheme or immunotherapeutic strategy established for inducing  
531 AE. Further investigations are therefore needed to document and propose univocal definition  
532 of AE.

#### 534 4.1.2 The bystander effect

535 A plethora of data suggests the existence of biological effects in non-targeted cells situated  
536 in close vicinity of irradiated ones, described as radiation-induced bystander effect (BE) [100-  
537 105]. BE has been documented with various endpoints and protocols like cytoplasmic  
538 irradiations [106,107], exposures to particles [105,107-110] and irradiated culture medium  
539 transfers [111,112]. BE was historically observed with alpha-particles [102-105]. Injuries in gap-  
540 junctions were proposed to cause BE. However, gap-junctions inhibitors were found inefficient  
541 in medium transfer experiments [112-114]. Lastly, since media rich in phosphates inhibit BE, BE  
542 has been shown to be strongly dependent on calcium, particularly, through the  $\text{Ca}^{2+}$  ions release  
543 observed after irradiation of a certain number of cells [20]. Hence, while the chemical, molecular  
544 and cellular features of BE remain to be better documented, a number of reports converge to the  
545 existence of a radiobiological phenomenon that would concern several millimeters far from the  
546 irradiated targets whose equivalence of dose is about 10% of the dose delivered in the target  
547 [20]. A better knowledge of BE is notably required for the optimization of microbeam therapy  
548 (MRT) [115].



#### 4.2 *The space factor in radiotherapy: focus on the tumor contouring*

A precise tumor targeting that permits to decrease the risk of adverse reactions on healthy tissue also permits to avoid any AE and BE phenomena. Until the middle of the 20th century, the radiation fields were oriented towards the tumor on the basis of clinical or even radiographic markers (in 2 dimensions (2D)). The beams were rudimentarily shaped using fixed shields (of high atomic number material, often lead) and placed between the radiation source and the patient. Despite encouraging results, this so-called 2D-RT suffered from: 1) irradiating identical volumes in patients with tumors of variable sizes and shapes, with the impossibility to make concave irradiations 2) delivering an homogeneous dose to tissues of heterogeneous densities, 3) inducing critical choices regarding the exposure of the organs at risk; 4) being limited to 2 or 4 beams [116] (Fig. 6).

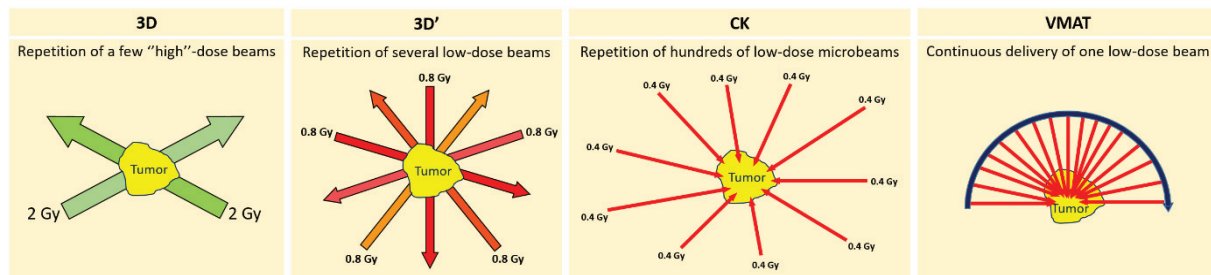
In 1972, the British engineer Godfrey Hounsfield developed the first medical computed tomography scanner (CT-scan), offering the possibility of precisely determining the shape of the tumor in 3 dimensions (3D), and of calculating the density of the tissues crossed by the rays. Concomitantly, other technical advances such as the multileaf collimator (MLC) and the filters placed in the head of the irradiator made possible to conform the geometry of the beam to the shape of the tumor. Now, thanks to three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT), the organs at risk are more spared than in 2D-RT [117], thus allowing an increase in the dose delivered to the tumor [118] (Fig. 6).

If the geometric conformation of the beam represented a major advance in RT, the computer revolution of the 1990s continued to improve treatments efficiency and safety. Indeed, dosimetry computers or treatment planning system (TPS) now determine the ballistics of the beams based on constraints imposed by the radiation oncologist (maximal coverage of the target, average and minimal doses to the organs at risk. This is therefore called "inverse" planning, as opposed to direct planning where the dosimetry could only be observed after manual simulation of the beams. In addition, the dynamic control of the MLC makes it possible to vary the shape of the beam during irradiation. This intensity-modulated radiation therapy (IMRT)

579 technique allowed to considerably reduce the RI side effects without jeopardizing local control  
580 and overall survival in some situations [119]. Finally, IMRT can be delivered statically or  
581 dynamically. In static IMRT, the dose is delivered discontinuously in several beams; each beam  
582 has an intensity that is either constant ("step and shoot") or modulated ("sliding window")  
583 during irradiation. Dynamic IMRT, continuously delivers the dose in a rotating beam: either in  
584 a plane arc (volumetric modulated arc therapy, VMAT), or helicoidal with concomitant of  
585 treatment table translation (TomoTherapy®) [120] (Fig. 6).

586 In 1967, the Swedish neurosurgeon Lars Leksell developed the Gamma Knife® (Elekta  
587 AB, Stockholm, Sweden), a stereotactic radiosurgery (SRS) device using a radioactive isotope,  
588 Cobalt 60, with sub-millimeter tracking of the intracranial lesion thanks to a stereotactic frame.  
589 The principle of the Gamma Knife lies in the radio-ablation of a small cephalic lesion volume  
590 by a high dose of gamma rays [121]. Although the term "stereotactic" originates from the metal  
591 framework used in neurosurgery, the technique today refers more to high dose irradiation per  
592 fraction. Linear accelerators (linacs) now have the ability to deliver high doses with high  
593 geometric precision. Linacs can also treat both intracranial (SRS as with Gamma Knife) and  
594 extra-cranial (SBRT) lesions. Specially designed for stereotactic radiotherapy, the CyberKnife®  
595 (Accuray Inc., Sunnyvale, CA, USA) corresponds to a Linac mounted on a robotic head,  
596 allowing movements in all spatial planes around the patient [122] (Fig. 6)

597 Finally, before each irradiation, the repositioning of the patient on treatment table can be  
598 checked by X-ray, scanner, or even MRI; this is called image-guided radiation therapy (IGRT)  
599 [123,124]. However, every technological advance does not automatically translate into a benefit  
600 for the patient. Indeed, better dose conformation may not reduce radiotoxicity, as in the case of  
601 adjuvant breast therapy [125], exclusive radiotherapy of the prostate [126], or else a lung SBRT  
602 [127]. Moreover, the use of the CyberKnife to irradiate a large volume, such as a breast for  
603 example, would considerably lengthen the time spent by the patient on treatment table,  
604 compared to VMAT. Hence, the EBRT technique is carefully chosen according to the therapeutic  
605 indication and the clinical characteristics of the patient. Each EBRT specific spatial beam dose  
606 delivery is shown in Figure 6.



**Figure 6.** Spatial beam dose delivery according to the EBRT techniques. EBRT = external beam radiation therapy. 3D-CRT = 3-dimensional conformal radiotherapy. CK = CyberKnife. VMAT = volumetric modulated arc therapy.

#### 4.3 The space factor and the RIANs model

In a previous study, the BE cells specifically showed activated MRE11 nuclease. In the frame of the RIANs model, the ATM kinase diffuses rapidly in the nucleus in response to radiation [13]. Once in the nucleus, the ATM kinase can also phosphorylate the MRE11 protein, which inhibit its nuclease activity [15]. In radiosensitive cells showing, a delayed RIANs may facilitate the activation of the MRE11 nuclease [15]. Hence, as BE cells, the radiosensitive cells with a delayed RIANs may elicit more DNA breaks and produce a more deleterious response. Similarly, with regard to the  $\text{Ca}^{2+}$  stress response, the radiosensitive and RIANs-delayed cells appear to be more responsive with higher levels of remaining DSB, suggesting again that BE response may be strongly dependent on RIANs. Further investigations are needed to document such dependence and quantify it.

Lastly, it is noteworthy that the domain of validity of RIANs model has been limited to the cellular scale and therefore, no biological interpretation is still proposed for the AE with RIANs markers.

## 5. Conclusions

Over the past few decades, RT has been the subject of numerous technological advances which have made it possible to deliver the dose to the tumor more efficiently, to be more precise in tumor targeting and to better spare healthy tissues. All these advances have concerned the time, energy and space factors which today appear, along with the dose, as pillars of RT. However, the radiobiological effects of dose repetition, dose rate, influence of the LET and proximity effects such as the bystander and abscopal effects are still unknown and their clinical applications require further investigations. To date, the RANS model makes it possible to better describe the individual response to radiation and to provide biological interpretations of the various radiobiological effects mentioned through a unified mechanism. This model could help improve RT modalities by better integrating time, energy and space factors to propose more anti-cancer treatments.

**Author Contributions:** The authors of this manuscript have contributed in the following manners: **Conceptualization**, N.F. and M.B.; **data acquisition and methodology**, E.L.R, L.B.; **data analysis writing and original draft preparation, writing and editing**, All the authors; **project administration and funding acquisition**, N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir—INDIRA project), and the National Space Agency (CNES) (ICARE project).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- 657 1. Roentgen, W. Über eine neue Art von Strahlen. Vorläufige Mitteilung. . *Aus den Sitzungsberichten der Würzburger*  
658 *Physik.-medic. Gesellschaft Würzburg* **1895**, S 137–147.
- 659 2. Foray , N. Victor Despeignes, the forgotten pioneer of radiation oncology. *International Journal of Radiation*  
660 *Oncology Biology and Physics* **2016**, *96*, 717-721.
- 661 3. Foray, N. [Victor Despeignes (1866-1937): How a hygienist became the first radiation oncologist]. *Cancer*  
662 *Radiotherapie* **2013**, *17*, 244-254.
- 663 4. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons Roentgen. *Lyon Medical*  
664 **1896**, *82*, 428-430.
- 665 5. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l'estomac traité par les rayons Roentgen. *Lyon Médical*  
666 **1896**, *82*, 503-506.
- 667 6. Despeignes, V. Nouvelle observation de cancer traité par les rayons de Roentgen. *Lyon Médical* **1896**, *83*, 550-551.
- 668 7. Mould, R.F. *A century of X-rays and radioactivity in medicine*; Institute of Physics Publishing - CRC Press: London,  
669 UK, 1993.
- 670 8. Belot, J. *Traité de Radiothérapie*; G. Steinheil, Editeur: Paris, 1905.
- 671 9. Lortet, L.; Genoud, P. Tuberculose expérimentale atténuée par les rayons de Roentgen. *Comptes-Rendus de*  
672 *l'Académie des Sciences* **1896**, *122*, 1511.
- 673 10. Lasak, J.M.; Gorecki, J.P. The history of stereotactic radiosurgery and radiotherapy. *Otolaryngol Clin North Am*  
674 **2009**, *42*, 593-599, doi:10.1016/j.otc.2009.04.003.
- 675 11. Foray, N.; Balosso, J. Advances in radiotherapy : new principles. In *Radiation Chemistry*, Spothem-Maurizot, M.,  
676 Ed. EDP Sciences: Les Ulis, France, 2008; pp. 291-301.
- 677 12. Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.;  
678 Forcheron, F.; Viau, M., et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to  
679 Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *International journal of radiation*  
680 *oncology, biology, physics* **2016**, *94*, 450-460, doi:10.1016/j.ijrobp.2015.11.013.
- 681 13. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the  
682 Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11070905.
- 683 14. Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research Review*  
684 **2016**, *770*, 369-386.
- 685 15. El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.;  
686 Leblond, P.; Combemale, P., et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences?  
687 *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*, 7158.
- 688 16. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response:  
689 resolution of the linear-quadratic model. *International journal of radiation biology* **2016**, *92*, 117-131.
- 690 17. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response  
691 Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-response : a*  
692 *publication of International Hormesis Society* **2018**, *16*, 1-11, doi:10.1177/1559325818789836.
- 693 18. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis  
694 Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose-response : a*  
695 *publication of International Hormesis Society* **2020**, *18*, 1559325820913784, doi:10.1177/1559325820913784.
- 696 19. Maalouf, M.; Granzotto, A.; Devic, C.; Bodgi, L.; Ferlazzo, M.; Peaucelle, C.; Bajard, M.; Giraud, J.Y.; Balosso, J.;  
697 Herault, J., et al. Influence of Linear Energy Transfer on the Nucleo-shuttling of the ATM Protein: A Novel

- 698 Biological Interpretation Relevant for Particles and Radiation. *International journal of radiation oncology, biology,*  
699 *physics* **2019**, *103*, 709-718, doi:10.1016/j.ijrobp.2018.10.011.
- 700 20. Restier-Verlet, J.; Joubert, A.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Al-Choboq, J.; El Nache, L.; Le Reun, E.;  
701 Bourguignon, M.; Foray, N. X-rays-Induced Bystander Effect Consists in the Formation of DNA Breaks in a  
702 Calcium-Dependent Manner: Influence of the Experimental Procedure and the Individual Factor. *Biomolecules*  
703 **2023**, *13*, 542.
- 704 21. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nache, L.; Restier-Verlet, J.;  
705 Berthel, E.; Devic, C., et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM  
706 protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *International journal of*  
707 *molecular sciences* **2022**, *23*.
- 708 22. Frankenberg-Schwager, M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by  
709 ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*  
710 **1989**, *14*, 307-320.
- 711 23. Iliakis, G. Radiation-induced potentially lethal damage: DNA lesions susceptible to fixation. *Int J Radiat Biol Relat*  
712 *Stud Phys Chem Med* **1988**, *53*, 541-584.
- 713 24. Bergonié, J.; Tribondeau, L. Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une  
714 technique rationnelle. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences* **1906**, *143*, 983-984.
- 715 25. Vogin, G.; Foray, N. The law of Bergonie and Tribondeau: A nice formula for a first approximation. *International*  
716 *journal of radiation biology* **2013**, *89*, 2-8.
- 717 26. Zhang, J.M.; An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* **2007**, *45*, 27-37,  
718 doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- 719 27. Macia, I.G.M.; Lucas Caldach, A.; Lopez, E.C. Radiobiology of the acute radiation syndrome. *Rep Pract Oncol*  
720 *Radiother* **2011**, *16*, 123-130, doi:10.1016/j.rpor.2011.06.001.
- 721 28. Petit, C.; Sancar, A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. *Biochimie* **1999**, *81*, 15-25.
- 722 29. Zhang, Y.; Rohde, L.H.; Wu, H. Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double  
723 strand break repair. *Current genomics* **2009**, *10*, 250-258.
- 724 30. Schneeweiss, F.H.; Tisljar-Lentulis, G.; Haustein, K.; Feinendegen, L.E. 'Periodical' pattern of kinetics of DNA  
725 strand break repair following gamma-irradiation of human T1-cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*  
726 **1987**, *52*, 491-493.
- 727 31. Goodhead, D.T. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International journal of radiation*  
728 *biology* **1989**, *56*, 623-634.
- 729 32. Traverso, G.; Bettegowda, C.; Kraus, J.; Speicher, M.R.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Lengauer, C. Hyper-  
730 recombination and genetic instability in BLM-deficient epithelial cells. *Cancer research* **2003**, *63*, 8578-8581.
- 731 33. El Nache, L.; Berthel, E.; Ferlazzo, M.L.; Le Reun, E.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.;  
732 Bourguignon, M.; Foray, N. Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity  
733 the Primum Movens? *Cancers* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14246141.
- 734 34. Roti Roti, J.L.; Wright, W.D. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage  
735 repair. *Cytometry* **1987**, *8*, 461-467.
- 736 35. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells.  
737 *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **1991**, *13*, 641-648.

- 738 36. Yu, Y.Q.; Giocanti, N.; Averbek, D.; Megnin-Chanet, F.; Favaudon, V. Radiation-induced arrest of cells in G2  
739 phase elicits hypersensitivity to DNA double-strand break inducers and an altered pattern of DNA cleavage  
740 upon re-irradiation. *International journal of radiation biology* **2000**, *76*, 901-912.
- 741 37. Lavelle, C.; Foray, N. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to  
742 radiobiology. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2014**, *49*, 84-97, doi:10.1016/j.biocel.2014.01.012.
- 743 38. Chavaudra, N.; Bourhis, J.; Foray, N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair  
744 defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiotherapy and  
745 oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **2004**, *73*, 373-382.
- 746 39. Viau, M.; Perez, A.F.; Bodgi, L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Ferlazzo, M.L.; Bourguignon, M.; Puisieux, A.;  
747 Lacornerie, T.; Lartigau, E., et al. [Repeated radiation dose effect and DNA repair: Importance of the individual  
748 factor and the time interval between the doses]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie  
749 oncologique* **2016**, *20*, 217-225.
- 750 40. Bodgi, L.; Granzotto, A.; Devic, C.; Vogin, G.; Lesne, A.; Bottollier-Depois, J.F.; Victor, J.M.; Maalouf, M.; Fares,  
751 G.; Foray, N. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical  
752 definition of individual radiosensitivity. *Journal of theoretical biology* **2013**, *333*, 135-145.
- 753 41. Ponette, V.; Giocanti, N.; Tourbez, H.; Balosso, J.; Hennequin, C.; Favaudon, V. Pulse exposure to ionizing  
754 radiation elicits rapid changes in cellular radiosensitivity. *C R Acad Sci III* **1996**, *319*, 505-509.
- 755 42. Ponette, V.; Le Pechoux, C.; Deniaud-Alexandre, E.; Fernet, M.; Giocanti, N.; Tourbez, H.; Favaudon, V.  
756 Hyperfast, early cell response to ionizing radiation. *International journal of radiation biology* **2000**, *76*, 1233-1243.
- 757 43. Colin, C.; Granzotto, A.; Devic, C.; Viau, M.; Maalouf, M.; Vogin, G.; Joubert, A.; Thomas, C.; Foray, N. MRE11  
758 and H2AX biomarkers in the response to low-dose exposure: Balance between individual susceptibility to  
759 radiosensitivity and to genomic instability. *Internation Journal of Low Radiation* **2011**, *8*, 96-106.
- 760 44. Foray, N.; Marot, D.; Gabriel, A.; Randrianarison, V.; Carr, A.M.; Perricaudet, M.; Ashworth, A.; Jeggo, P. A  
761 subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO journal*  
762 **2003**, *22*, 2860-2871.
- 763 45. Kogelnik, H.D. The history and evolution of radiotherapy and radiation oncology in Austria. *International journal  
764 of radiation oncology, biology, physics* **1996**, *35*, 219-226, doi:10.1016/0360-3016(96)00024-7.
- 765 46. Webster, J.H. The Protracted-fractional X-ray Method (Coutard) in the Treatment of Cancer of the Larynx:  
766 (Section of Radiology). *Proc R Soc Med* **1934**, *27*, 901-924.
- 767 47. Moulder, J.E.; Seymour, C. Radiation fractionation: the search for isoeffect relationships and mechanisms.  
768 *International journal of radiation biology* **2018**, *94*, 743-751, doi:10.1080/09553002.2017.1376764.
- 769 48. Ellis, F. Fractionation in radiotherapy. In *Modern trends in radiotherapy*, Wood, D.a., Ed. Butterworth.: London,  
770 UK, 1967; Vol. 1, p. 34.
- 771 49. Dixon, R.L. General equation fro the calculation of the nominal standard dose. *Acta Radiologica: therapy, Physics,  
772 Biology* **1972**, *11*, 305-311.
- 773 50. Van Leeuwen, F.E.; Oei, A.L.; Creeze, J.; Bel, A.; Franken, N.A.P.; Stalpers, L.J.A.; Kok, H.P. The alpha and beta of  
774 tumours : a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies.  
775 *Radiation oncology* **2018**, *13*, 96.
- 776 51. Kilby, W.; Dooley, J.R.; Kuduvalli, G.; Sayeh, S.; Maure, C.R. The CyberKnife® Robotic Radiosurgery System in  
777 2010. *Technological Cancer Research Treatment* **2010**, *9*, 433-452.
- 778 52. Trifiletti, D.M.; Chao, S.T.; Sahgal, A.; Sheehan, J.P. *Stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiation therapy*;  
779 Springer Nature Switzerland AG: Cham, 2019.

- 780 53. Joiner, M.C.; Marples, B.; Lambin, P.; Short, S.C.; Turesson, I. Low-dose hypersensitivity: current status and  
781 possible mechanisms. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2001**, *49*, 379-389.
- 782 54. Marples, B.; Collis, S.J. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *International journal of radiation  
783 oncology, biology, physics* **2008**, *70*, 1310-1318.
- 784 55. Velalopoulou, A.; Karagounis, I.V.; Cramer, G.M.; Kim, M.M.; Skoufos, G.; Goia, D.; Hagan, S.; Verginadis, II;  
785 Shoniyozov, K.; Chiango, J., et al. FLASH Proton Radiotherapy Spares Normal Epithelial and Mesenchymal  
786 Tissues While Preserving Sarcoma Response. *Cancer research* **2021**, *81*, 4808-4821, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-  
787 1500.
- 788 56. Dewey, D.L.; Boag, J.W. Modification of the oxygen effect when bacteria are given large pulses of radiation.  
789 *Nature* **1959**, *183*, 1450-1451, doi:10.1038/1831450a0.
- 790 57. Berry, R.J.; Hall, E.J.; Forster, D.W.; Storr, T.H.; Goodman, M.J. Survival of mammalian cells exposed to x rays at  
791 ultra-high dose-rates. *The British journal of radiology* **1969**, *42*, 102-107, doi:10.1259/0007-1285-42-494-102.
- 792 58. Town, C.D. Radiobiology. Effect of high dose rates on survival of mammalian cells. *Nature* **1967**, *215*, 847-848,  
793 doi:10.1038/215847a0.
- 794 59. Favaudon, V.; Caplier, L.; Monceau, V.; Pouzoulet, F.; Sayarath, M.; Fouillade, C.; Poupon, M.F.; Brito, I.; Hupe,  
795 P.; Bourhis, J., et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal  
796 and tumor tissue in mice. *Science translational medicine* **2014**, *6*, 245ra293, doi:10.1126/scitranslmed.3008973.
- 797 60. Montay-Gruel, P.; Petersson, K.; Jaccard, M.; Boivin, G.; Germond, J.F.; Petit, B.; Doenlen, R.; Favaudon, V.;  
798 Bochud, F.; Bailat, C., et al. Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation  
799 with dose rates above 100Gy/s. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology  
800 and Oncology* **2017**, *124*, 365-369, doi:10.1016/j.radonc.2017.05.003.
- 801 61. Vozenin, M.C.; De Fornel, P.; Petersson, K.; Favaudon, V.; Jaccard, M.; Germond, J.F.; Petit, B.; Burki, M.; Ferrand,  
802 G.; Patin, D., et al. The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients.  
803 *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**, *25*, 35-42,  
804 doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3375.
- 805 62. Bourhis, J.; Sozzi, W.J.; Jorge, P.G.; Gaide, O.; Bailat, C.; Duclos, F.; Patin, D.; Ozsahin, M.; Bochud, F.; Germond,  
806 J.F., et al. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European  
807 Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **2019**, *139*, 18-22, doi:10.1016/j.radonc.2019.06.019.
- 808 63. Devic, C.; Granzotto, A.; Viau, M.; Maalouf, M.; Joubert, A.; Thomas, C.; Foray, N. The adaptive response in  
809 radiobiology: a general review revealing the impact of individual susceptibility and the diversity of protocols.  
810 *International Journal of Low Radiation* **2010**, in press.
- 811 64. Goodhead, D.T. Spatial and temporal distribution of energy. *Health physics* **1988**, *55*, 231-240.
- 812 65. Goodhead, D.T.; Nikjoo, H. Track structure analysis of ultrasoft X-rays compared to high- and low-LET  
813 radiations. *International journal of radiation biology* **1989**, *55*, 513-529.
- 814 66. Ward, J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of  
815 formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **1988**, *35*, 95-125.
- 816 67. Goodhead, D.T.; Thacker, J.; Cox, R. Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular  
817 mechanisms of damage and repair. *International journal of radiation biology* **1993**, *63*, 543-556.
- 818 68. Steel, G. *Basic Clinical Radiobiology*, 3rd ed.; Arnold Publishers: 1993; pp. 262.
- 819 69. Foray, N.; Monroco, C.; Marples, B.; Hendry, J.H.; Fertil, B.; Goodhead, D.T.; Arlett, C.F.; Malaise, E.P. Repair of  
820 radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of  
821 repair probability. *International journal of radiation biology* **1998**, *74*, 551-560.



- 822 70. Foray, N.; Charvet, A.M.; Duchemin, D.; Favaudon, V.; Lavalette, D. The repair rate of radiation-induced DNA  
823 damage: a stochastic interpretation based on the gamma function. *Journal of theoretical biology* **2005**, *236*, 448-458.
- 824 71. Tounekti, O.; Kenani, A.; Foray, N.; Orłowski, S.; Mir, L.M. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and  
825 their absolute values determine cell death pathway. *British journal of cancer* **2001**, *84*, 1272-1279.
- 826 72. ICRP. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR), ICRP  
827 Publication 92. *Annals of the ICRP* **2003**, *33*.
- 828 73. Mazal, A.; Habrand, J.L.; Delacroix, S.; Datchary, J.; Dendale, R.; Desjardins, L.; Ferrand, R.; Malka, V.; Fourquet,  
829 A. [Protontherapy: basis, indications and new technologies]. *Bulletin du cancer* **2010**, *97*, 831-846,  
830 doi:10.1684/bdc.2010.1149.
- 831 74. Doyen, J.; Bondiau, P.Y.; Benezery, K.; Thariat, J.; Vidal, M.; Gerard, A.; Herault, J.; Carrie, C.; Hannoun-Levi, J.M.  
832 [Indications and results for protontherapy in cancer treatments]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise*  
833 *de radiotherapie oncologique* **2016**, *20*, 513-518, doi:10.1016/j.canrad.2016.06.005.
- 834 75. Bekkering, G.E.; Rutjes, A.W.; Vlassov, V.V.; Aebbersold, D.M.; von Bremen, K.; Juni, P.; Kleijnen, J. The  
835 effectiveness and safety of proton radiation therapy for indications of the eye : a systematic review.  
836 *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* **2009**, *185*, 211-221,  
837 doi:10.1007/s00066-009-1900-4.
- 838 76. Weber, D.C.; Bizzocchi, N.; Bolsi, A.; Jenkinson, M.D. Proton Therapy for Intracranial Meningioma for the  
839 Treatment of Primary/Recurrent Disease Including Re-Irradiation. *Frontiers in oncology* **2020**, *10*, 558845,  
840 doi:10.3389/fonc.2020.558845.
- 841 77. Lesueur, P.; Calugaru, V.; Nauraye, C.; Stefan, D.; Cao, K.; Emery, E.; Reznik, Y.; Habrand, J.L.; Tessonnier, T.;  
842 Chaikh, A., et al. Proton therapy for treatment of intracranial benign tumors in adults: A systematic review.  
843 *Cancer Treat Rev* **2019**, *72*, 56-64, doi:10.1016/j.ctrv.2018.11.004.
- 844 78. Noel, G.; Gondi, V. Proton therapy for tumors of the base of the skull. *Chin Clin Oncol* **2016**, *5*, 51,  
845 doi:10.21037/cco.2016.07.05.
- 846 79. McDonald, M.W.; Linton, O.R.; Shah, M.V. Proton therapy for reirradiation of progressive or recurrent  
847 chordoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2013**, *87*, 1107-1114,  
848 doi:10.1016/j.ijrobp.2013.09.038.
- 849 80. Keole, S.; Ashman, J.B.; Daniels, T.B. Proton therapy for sarcomas. *Cancer J* **2014**, *20*, 409-414,  
850 doi:10.1097/PPO.0000000000000084.
- 851 81. Pommier, P.; Sunyach, M.P.; Hu, Y.; Amsalem, E.; Claude, L.; Moncort-Boulch, D.; Toutenu, P.; Balosso, J.  
852 [Radiotherapy for sarcoma: hadrontherapy, for whom and what for?]. *Bulletin du cancer* **2010**, *97*, 657-672,  
853 doi:10.1684/bdc.2010.1125.
- 854 82. Mutter, R.W.; Choi, J.I.; Jimenez, R.B.; Kirova, Y.M.; Fagundes, M.; Haffty, B.G.; Amos, R.A.; Bradley, J.A.; Chen,  
855 P.Y.; Ding, X., et al. Proton Therapy for Breast Cancer: A Consensus Statement From the Particle Therapy  
856 Cooperative Group Breast Cancer Subcommittee. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2021**,  
857 *111*, 337-359, doi:10.1016/j.ijrobp.2021.05.110.
- 858 83. Vyfhuis, M.A.L.; Onyeuku, N.; Diwanji, T.; Mossahebi, S.; Amin, N.P.; Badiyan, S.N.; Mohindra, P.; Simone, C.B.,  
859 2nd. Advances in proton therapy in lung cancer. *Ther Adv Respir Dis* **2018**, *12*, 1753466618783878,  
860 doi:10.1177/1753466618783878.
- 861 84. Mesko, S.; Gomez, D. Proton Therapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **2018**, *19*, 76,  
862 doi:10.1007/s11864-018-0588-z.

- 863 85. Gjyshi, O.; Liao, Z. Proton therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *The British journal of radiology*  
864 **2020**, *93*, 20190378, doi:10.1259/bjr.20190378.
- 865 86. Laprie, A.; Hu, Y.; Alapetite, C.; Carrie, C.; Habrand, J.L.; Bolle, S.; Bondiau, P.Y.; Ducassou, A.; Huchet, A.;  
866 Bertozzi, A.I., et al. Paediatric brain tumours: A review of radiotherapy, state of the art and challenges for the  
867 future regarding protontherapy and carbontherapy. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de*  
868 *radiotherapie oncologique* **2015**, *19*, 775-789, doi:10.1016/j.canrad.2015.05.028.
- 869 87. Thomas, H.; Timmermann, B. Paediatric proton therapy. *The British journal of radiology* **2020**, *93*, 20190601,  
870 doi:10.1259/bjr.20190601.
- 871 88. Mohan, R.; Grosshans, D. Proton therapy - Present and future. *Adv Drug Deliv Rev* **2017**, *109*, 26-44,  
872 doi:10.1016/j.addr.2016.11.006.
- 873 89. Safai, S.; Trofimov, A.; Adams, J.A.; Engelsman, M.; Bortfeld, T. The rationale for intensity-modulated proton  
874 therapy in geometrically challenging cases. *Physics in medicine and biology* **2013**, *58*, 6337-6353, doi:10.1088/0031-  
875 9155/58/18/6337.
- 876 90. Nesteruk, K.P.; Togno, M.; Grossmann, M.; Lomax, A.J.; Weber, D.C.; Schippers, J.M.; Safai, S.; Meer, D.;  
877 Psoroulas, S. Commissioning of a clinical pencil beam scanning proton therapy unit for ultra-high dose rates  
878 (FLASH). *Medical physics* **2021**, *48*, 4017-4026, doi:10.1002/mp.14933.
- 879 91. Mole, R.H. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *The British journal of radiology* **1953**, *26*, 234-241,  
880 doi:10.1259/0007-1285-26-305-234.
- 881 92. Abuodeh, Y.; Venkat, P.; Kim, S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr Probl Cancer* **2016**,  
882 *40*, 25-37, doi:10.1016/j.currproblcancer.2015.10.001.
- 883 93. Stone, H.B.; Peters, L.J.; Milas, L. Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent  
884 transplantability of a murine fibrosarcoma. *J Natl Cancer Inst* **1979**, *63*, 1229-1235.
- 885 94. Golden, E.B.; Demaria, S.; Schiff, P.B.; Chachoua, A.; Formenti, S.C. An abscopal response to radiation and  
886 ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* **2013**, *1*, 365-372,  
887 doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0115.
- 888 95. Ngwa, W.; Irabor, O.C.; Schoenfeld, J.D.; Hesser, J.; Demaria, S.; Formenti, S.C. Using immunotherapy to boost  
889 the abscopal effect. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 313-322, doi:10.1038/nrc.2018.6.
- 890 96. Chicas-Sett, R.; Morales-Orue, I.; Rodriguez-Abreu, D.; Lara-Jimenez, P. Combining radiotherapy and  
891 ipilimumab induces clinically relevant radiation-induced abscopal effects in metastatic melanoma patients: A  
892 systematic review. *Clin Transl Radiat Oncol* **2018**, *9*, 5-11, doi:10.1016/j.ctro.2017.12.004.
- 893 97. Vanpouille-Box, C.; Alard, A.; Aryankalayil, M.J.; Sarfraz, Y.; Diamond, J.M.; Schneider, R.J.; Inghirami, G.;  
894 Coleman, C.N.; Formenti, S.C.; Demaria, S. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour  
895 immunogenicity. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15618, doi:10.1038/ncomms15618.
- 896 98. Bernstein, M.B.; Krishnan, S.; Hodge, J.W.; Chang, J.Y. Immunotherapy and stereotactic ablative radiotherapy  
897 (ISABR): a curative approach? *Nat Rev Clin Oncol* **2016**, *13*, 516-524, doi:10.1038/nrclinonc.2016.30.
- 898 99. Mirjolet, C.; Truc, G. [Abscopal effect: Myth or reality?]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de*  
899 *radiotherapie oncologique* **2021**, *25*, 533-536, doi:10.1016/j.canrad.2021.07.002.
- 900 100. Mothersill, C.; Rusin, A.; Fernandez-Palomo, C.; Seymour, C. History of bystander effects research 1905-present;  
901 what is in a name? *International journal of radiation biology* **2018**, *94*, 696-707, doi:10.1080/09553002.2017.1398436.
- 902 101. Bouchacourt, L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le  
903 même sujet des différents régions du corps. *Comptes-Rendus des Sessions de l'Association Française pour*  
904 *l'Avancement des Sciences*. **1911**, 40ème Congrès - Dijon, 942-947.

- 905 102. Mothersill, C.; Seymour, C.B. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat Rev Cancer* **2004**,  
906 4, 158-164.
- 907 103. Shuryak, I.; Brenner, D.J. Review of Quantitative Mechanistic Models of Radiation-Induced Non-Targeted Effects  
908 (Nte). *Radiation protection dosimetry* **2020**, *192*, 236-252, doi:10.1093/rpd/ncaa207.
- 909 104. Mothersill, C.; Rusin, A.; Seymour, C. Relevance of Non-Targeted Effects for Radiotherapy and Diagnostic  
910 Radiology; A Historical and Conceptual Analysis of Key Players. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11091236.
- 911 105. Nagasawa, H.; Little, J.B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles.  
912 *Cancer research* **1992**, *52*, 6394-6396.
- 913 106. Wu, L.J.; Randers-Pehrson, G.; Xu, A.; Waldren, C.A.; Geard, C.R.; Yu, Z.; Hei, T.K. Targeted cytoplasmic  
914 irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 4959-  
915 4964.
- 916 107. Zhou, H.; Randers-Pehrson, G.; Waldren, C.A.; Vannais, D.; Hall, E.J.; Hei, T.K. Induction of a bystander  
917 mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*  
918 *States of America* **2000**, *97*, 2099-2104.
- 919 108. Deshpande, A.; Goodwin, E.H.; Bailey, S.M.; Marrone, B.L.; Lehnert, B.E. Alpha-particle-induced sister chromatid  
920 exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat Res* **1996**, *145*, 260-267.
- 921 109. Lehnert, B.E.; Goodwin, E.H.; Deshpande, A. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can  
922 cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* **1997**, *57*, 2164-2171.
- 923 110. Zhou, H.; Suzuki, M.; Geard, C.R.; Hei, T.K. Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell  
924 responses. *Mutat Res* **2002**, *499*, 135-141.
- 925 111. Mothersill, C.; Seymour, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the  
926 clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* **1997**, *71*, 421-427.
- 927 112. Sokolov, M.V.; Smilenov, L.B.; Hall, E.J.; Panyutin, I.G.; Bonner, W.M.; Sedelnikova, O.A. Ionizing radiation  
928 induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* **2005**, *24*, 7257-7265.
- 929 113. Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced  
930 bystander effect. *Oncogene* **2003**, *22*, 7050-7057.
- 931 114. Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated  
932 intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to  
933 nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 473-478.
- 934 115. Fukunaga, H.; Butterworth, K.T.; McMahon, S.J.; Prise, K.M. A Brief Overview of the Preclinical and Clinical  
935 Radiobiology of Microbeam Radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **2021**, *33*, 705-712,  
936 doi:10.1016/j.clon.2021.08.011.
- 937 116. Gerard, J.P.; Thariat, J.; Giraud, P.; Cosset, J.M. [Past, present and near future of techniques in radiation  
938 oncology]. *Bulletin du cancer* **2010**, *97*, 743-751, doi:10.1684/bdc.2010.1142.
- 939 117. Koper, P.C.; Stroom, J.C.; van Putten, W.L.; Korevaar, G.A.; Heijmen, B.J.; Wijnmaalen, A.; Jansen, P.P.; Hanssens,  
940 P.E.; Griep, C.; Krol, A.D., et al. Acute morbidity reduction using 3DCRT for prostate carcinoma: a randomized  
941 study. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **1999**, *43*, 727-734, doi:10.1016/s0360-3016(98)00406-  
942 4.
- 943 118. Zelefsky, M.J.; Leibel, S.A.; Gaudin, P.B.; Kutcher, G.J.; Fleshner, N.E.; Venkatramen, E.S.; Reuter, V.E.; Fair, W.R.;  
944 Ling, C.C.; Fuks, Z. Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in  
945 prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **1998**, *41*, 491-500, doi:10.1016/s0360-  
946 3016(98)00091-1.

- 947 119. Marta, G.N.; Silva, V.; de Andrade Carvalho, H.; de Arruda, F.F.; Hanna, S.A.; Gadia, R.; da Silva, J.L.; Correa,  
948 S.F.; Vita Abreu, C.E.; Riera, R. Intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: systematic  
949 review and meta-analysis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and*  
950 *Oncology* **2014**, *110*, 9-15, doi:10.1016/j.radonc.2013.11.010.
- 951 120. Lafond, C.; Jouyau, F.; Bellec, J.; Henry, O.; Perdrieux, M.; Chajon, E.; Le Prise, E.; de Crevoisier, R.; Manens, J.P.  
952 [Which IMRT? From "step and shoot" to VMAT: physicist point of view]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe*  
953 *francaise de radiotherapie oncologique* **2010**, *14*, 539-549, doi:10.1016/j.canrad.2010.06.012.
- 954 121. Goodman, M.L. Gamma knife radiosurgery: current status and review. *South Med J* **1990**, *83*, 551-554,  
955 doi:10.1097/00007611-199005000-00016.
- 956 122. Adler, J.R., Jr.; Chang, S.D.; Murphy, M.J.; Doty, J.; Geis, P.; Hancock, S.L. The Cyberknife: a frameless robotic  
957 system for radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg* **1997**, *69*, 124-128, doi:10.1159/000099863.
- 958 123. de Crevoisier, R.; Chauvet, B.; Barillot, I.; Lafond, C.; Mahe, M.; Delpon, G. [Image-guided radiotherapy]. *Cancer*  
959 *radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* **2016**, *20 Suppl*, S27-35,  
960 doi:10.1016/j.canrad.2016.07.034.
- 961 124. Franzone, P.; Fiorentino, A.; Barra, S.; Cante, D.; Masini, L.; Cazzulo, E.; Todisco, L.; Gabriele, P.; Garibaldi, E.;  
962 Merlotti, A., et al. Image-guided radiation therapy (IGRT): practical recommendations of Italian Association of  
963 Radiation Oncology (AIRO). *Radiol Med* **2016**, *121*, 958-965, doi:10.1007/s11547-016-0674-x.
- 964 125. Thomas, A.; Keller, A.; Menoux, I.; Brahimi, Y.; Vigneron, C.; Le Fevre, C.; Chambrelant, I.; Pietta, G.A.; Guihard,  
965 S.; Clavier, J.B., et al. [Prognostic factors of acute radiodermatitis in breast cancer after adjuvant radiotherapy  
966 treated with RT3D or IMRT]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* **2022**,  
967 10.1016/j.canrad.2021.12.004, doi:10.1016/j.canrad.2021.12.004.
- 968 126. Pozniak-Balicka, R.; Chomiak, B.; Woskowiak, P.; Nowicki, N.; Bojarski, J.; Salagierski, M. Does the radiation  
969 approach affect acute toxicity in prostate cancer patients? A comparison of four radiation techniques. *Cent*  
970 *European J Urol* **2020**, *73*, 295-299, doi:10.5173/cej.2020.0091.
- 971 127. Le Reun, E.; Casutt, A.; Durham, A.; Bouchaab, H.; Romano, E.; Lovis, A.; Krueger, T.; Von Garnier, C.; Ozsahin,  
972 E.M.; Kinj, R. Lung stereotactic radiation therapy: Intercomparison of irradiation devices in terms of outcome and  
973 predictive factors. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* **2023**, *27*, 31-41,  
974 doi:10.1016/j.canrad.2022.05.003.  
975

Review

# Low-Dose Radiation Therapy (LDRT) against Cancer and Inflammatory or Degenerative Diseases: Three Parallel Stories with a Common Molecular Mechanism Involving the Nucleoshuttling of the ATM Protein?

Eymeric Le Reun and Nicolas Foray \* 

Inserm, U1296 Unit, "Radiation: Defense, Health and Environment", Centre Léon-Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France

\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-(0)4-78-78-28-28

**Simple Summary:** We reviewed the medical applications of low-dose radiation therapy (LDRT) in cancer and inflammatory and degenerative diseases by proposing a unified mechanistic model based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM kinase to better understand the interest in low-dose of radiation.

**Abstract:** Very early after their discovery, X-rays were used in multiple medical applications, such as treatments against cancer, inflammation and pain. Because of technological constraints, such applications involved X-ray doses lower than 1 Gy per session. Progressively, notably in oncology, the dose per session increased. However, the approach of delivering less than 1 Gy per session, now called low-dose radiation therapy (LDRT), was preserved and is still applied in very specific cases. More recently, LDRT has also been applied in some trials to protect against lung inflammation after COVID-19 infection or to treat degenerative syndromes such as Alzheimer's disease. LDRT illustrates well the discontinuity of the dose-response curve and the counterintuitive observation that a low dose may produce a biological effect higher than a certain higher dose. Even if further investigations are needed to document and optimize LDRT, the apparent paradox of some radiobiological effects specific to low dose may be explained by the same mechanistic model based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM kinase, a protein involved in various stress response pathways.

**Keywords:** low-dose; radiation therapy; LDRT; radiosensitivity; cancer; inflammation; Alzheimer's disease; HRS; hormesis; adaptive response; ATM protein



**Citation:** Le Reun, E.; Foray, N. Low-Dose Radiation Therapy (LDRT) against Cancer and Inflammatory or Degenerative Diseases: Three Parallel Stories with a Common Molecular Mechanism Involving the Nucleoshuttling of the ATM Protein? *Cancers* **2023**, *15*, 1482. <https://doi.org/10.3390/cancers15051482>

Academic Editor: Franz Rödel

Received: 22 January 2023

Revised: 18 February 2023

Accepted: 23 February 2023

Published: 26 February 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. Historical Features of Low-Dose Radiotherapy

Several months after the discovery of X-rays, radiation pioneers performed the first clinical attempts of radiation therapy (RT) against a plethora of diseases, including tuberculosis [1], cancer [2–4], psoriasis, scleroderma, abscesses, and inflammatory and degenerative disorders [5–7]. However, from 1896 to the 1930s, the medical applications of X-rays were necessarily limited by technological constraints. For example, the notion of dose was not defined yet. The X-ray tubes were fragile and did not deliver high doses of high-energy X-rays but rather low doses (<1 Gy) of soft X-rays (<100 kV). Hence, the first successes in RT were attributed either to spectacular but isolated effects after a single exposure to a low dose (and therefore needed to be more documented) or to hyper-fractionated RT of low doses (raising questions about the biological effects of the fractionation of the dose, on the one hand, and, on the other hand, the existence of radiobiological phenomena specific to low doses). As an example, the reconstitution of the first documented RT against cancer performed by Victor Despeignes in July 1896 revealed that the maximal dose delivered to

the tumor per session was lower than 0.8 Gy, while the volume of the tumor decreased significantly [8,9]. Today, we know that the efficiency of this historical treatment could only be obtained on a very radiosensitive gastric lymphoma eliciting hypersensitivity to low-dose phenomenon [9]. Some years after, Claudius Regaud succeeded in sterilizing ram testes without any acute skin reaction with a repeated low dose of soft X-rays, ensuring the balance between a significant biological effect of low (sublethal) doses without the deleterious consequences of a too-high cumulative dose [10,11]. The notion of sublethal dose led to a large number of applications of X-rays to cure diseases.

After the 1930s, RT based either on a total dose or a dose per session lower than that applied in standard RT to date was progressively applied in the management of numerous cancers and non-malignant diseases [4,7]. However, the molecular and cellular mechanisms supporting the capacity of sublethal doses to cure such pathologies remain to be elucidated, inasmuch as the proposed biological interpretations were indifferently based on immunologic or inflammatory features and were not convincing [4,7].

From the 1940s, the investigations into the Hiroshima survivors documented some radiobiological phenomena specific to low doses and generated controversies about the non-linear threshold (NLT) and the linear non-threshold (LNT) models, suggesting that, in the first case, a range of a low dose should exist in which the risk of radiation-induced cancer is either negligible or not measurable and, in the second case, the risk of cancer is directly proportional to the dose [12]. Particularly, in this period, the hormesis phenomenon describing the beneficial effect of very low doses (lower than 25 mGy) was reviewed, and the role of this phenomenon in radiation protection was debated [13,14]. However, again, the radiobiological interpretation of this phenomenon remained to be elucidated.

In the next decades, notably in the 1980s, two other radiobiological phenomena specific to low doses were pointed out: the adaptive response (AR), consisting of a protective effect caused by a “priming” low dose (typically ranging from 1 mGy to 0.5 Gy) delivered after a period of time (ranging from 2 to 24 h) before a higher “challenging” dose (typically of the order of some Gy) [15,16], and hyper-radiosensitivity to low doses (HRS), consisting of a deleterious effect generally produced between 0.1 to 0.8 Gy at a high dose rate (>1 Gy/min) but equivalent to the effect provided by a dose 5 to 10 times higher [17]. Again, the radiobiological interpretation of these phenomena remained to be elucidated [16,18].

### 1.2. The Molecular Features of Hormesis, AR, and HRS Phenomena Explained by A Unified Model

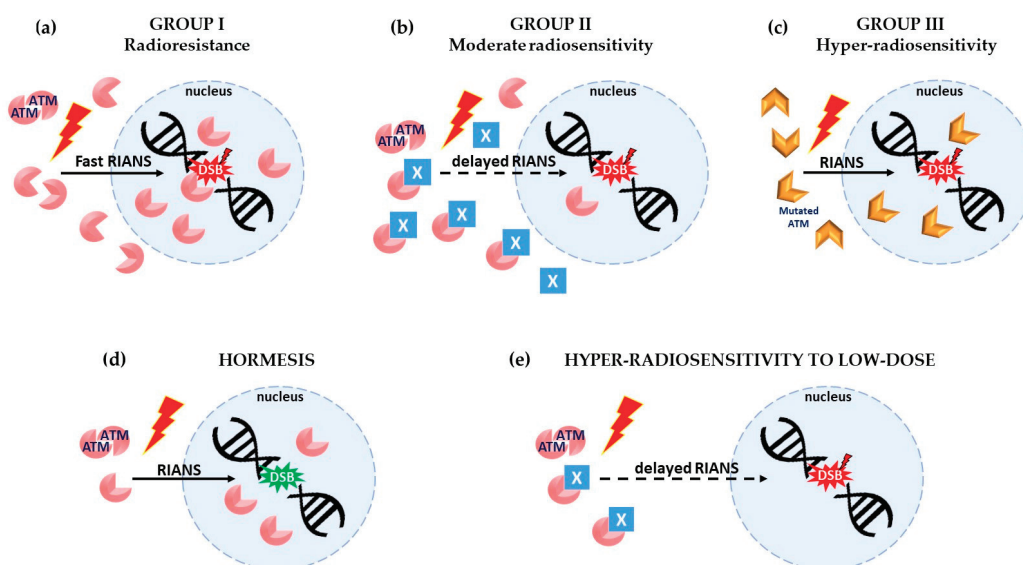
The hormesis, AR, and HRS phenomena are likely to be involved in the molecular and cellular response to RT based on the deliverance of several fractions of Gy per session. Hence, a better knowledge of these specific radiobiological phenomena is essential for our understanding of the medical interest of such a specific type of RT. Recently, in the frame of the model based on the radio-induced nucleoshuttling of the ATM protein (RIANS), a unified interpretation of the hormesis, AR, and HRS phenomena has been proposed [16,19,20] (Figure 1). Briefly, in quiescent normal and cancer cells, ATM homodimers are present in the cytoplasm. Exposure to radiation produces, in a linearly dose-dependent manner, oxidative stress leading to DNA double-strand breaks (DSB) [21] and the monomerization of cytoplasmic ATM homodimers [20]. The ATM monomers then diffuse into the nucleus and mediate DSB recognition and repair via non-homologous end-joining (NHEJ), the most predominant DSB pathway in mammals [22,23]. Any delay in the RIANS leads to unrecognized DSB, which may contribute to the lethal cellular effect (*radiosensitivity*) via non-repaired DSB, carcinogenesis (*radiosusceptibility*) via misrepaired DSB and/or accelerated aging (*radiodegeneration*) via the accumulation of tolerated DSB [23–25]. A delayed RIANS is generally caused by the formation of cytoplasmic multiprotein complexes between ATM and ATM substrates called X-proteins. It has been shown that the proteins phosphorylated by the serine/threonine ATM kinase elicit some SQ or TQ domains [26]. Hence, any cytoplasmic protein holding SQ or TQ can be considered as a potential X-protein [23,24,27]. Some heterozygous mutations of X-proteins lead to their overexpression in the cytoplasm. From the RIANS data, three groups of individual response to

high doses of ionizing radiation have been defined [23]: group I gathers radioresistant cells with a fast RIANs (some minutes after 2 Gy) (Figure 1a); group II gathers radiosensitive cells with a delayed RIANs (some hours after 2 Gy) (Figure 1b); and group III gathers hyper-radiosensitive cells either with lack of RIANs such as the *ATM*-mutated cells or with a normal RIANs but a gross DSB repair such as the *LIG4*-mutated cells (Figure 1c). From the bases of the RIANs model, the following interpretations of the hormesis, AR, and HRS phenomena have been proposed:

- *Hormesis*: One Gy X-rays generally induce about 40 DSB and  $10^5$  to  $10^6$  ATM monomers per human non-transformed cell. Consequently, very few DSB are induced per cell at doses lower than 1/40 Gy (i.e., 25 mGy). If some spontaneous DSB are present in cells, exposure to a dose lower than 25 mGy provides some ATM monomers that may contribute to recognizing and repairing these spontaneous DSB. Hence, if these spontaneous DSB represent a risk of cancer or aging, a dose lower than 25 mGy may decrease such a risk. This phenomenon is generally observed in group I cells since the amount of ATM monomers after irradiation is significant at such low doses by comparison with group II cells, in which the flux of ATM monomers is reduced, and in group III cells, in which DSB recognition or repair are impaired [19] (Figure 1d).
- *Adaptive response*: In the AR scenario, a “priming” (low) dose may produce few DSB but overall a significant amount of ATM monomers that may contribute to recognizing and repairing the DSB induced by a “challenging” (high) dose, as far as the time interval between the two doses preserves the activity of the ATM monomers in the nucleus. The AR phenomenon is generally observed in group II cells since the contribution of ATM monomers provided by the priming dose is too low (due to their sequestration in the cytoplasm by the X-proteins) to recognize all the DSB induced by the priming dose. Conversely, in group I cells, all the DSB are recognized by the high flux of ATM monomers that diffuse in the nucleus [19].
- *Hypersensitivity to low dose (HRS)*: As said above, for the priming dose, a low dose induces few DSB and few ATM monomers. In group II cells, the sequestration of ATM monomers by overexpressed X-proteins may drastically reduce the number of ATM monomers that finally diffuse in the nucleus. Consequently, in group II cells, after a single low dose (whether after the priming dose in the frame of AR scenario or after an HRS dose), the few DSB induced by the low dose may not all be recognized and repaired by the few ATM monomers available in the nucleus. The rate of unrepaired DSB after a low dose (e.g., 0.2 Gy) could produce an effect equivalent to that produced by a dose 5 to 10 times higher (e.g., 2 Gy) [20]. Again, in group I cells, such conditions are never reached since there are no ATM–X-protein complexes, and the amount of ATM monomers is always sufficient [20,23] (Figure 1e).

Throughout the history of RT, some authors have proposed to apply RT based on a total dose lower than the standard (the most current) treatment plans. Such an approach that consists of reducing the dose per session or the number of sessions itself may be described under the general term of low-dose radiation therapy (LDRT). Considering, on the one hand, the increasing importance of LDRT in the treatment of some cancers and inflammatory and degenerative diseases and, on the other hand, the emerging interest in the RIANs model that may provide a unified mechanistic interpretation of the effects caused by the specific low-dose phenomena, this review aims to establish:

- A state of the art of the application of LDRT in clinical practice;
- A review of the basic mechanisms supporting the application of LDRT;
- A unified RIANs model integrating the radiobiological bases of LDRT.



**Figure 1.** High- and low-dose radiation cell response explained by the RIANs model. The RIANs underpins the efficiency of DSB recognition and repair and the cellular radiosensitivity. At high doses, (a) a fast RIANs ensures radioresistance (*group I*) with complete recognition and repair of radiation-induced DSB (red star), (b) a RIANs delayed by the interaction of ATM with X-proteins (blue squares) leads to moderate radiosensitivity (*group II*), and (c) mutated ATM kinase leads to the lack of DSB recognition, which causes hyper-radiosensitivity (*group III*). It is noteworthy that group III hyper-radiosensitivity can also be caused by gross DSB repair, such as in the case of *LIG4* mutation. However, this particular case is not illustrated here. (d) Hormesis effect. At very low-dose (< 25 mGy), some ATM monomers can contribute to the recognition and repair of spontaneous DSB (green star), the amount of radiation-induced DSB being negligible. The hormesis effect is preferentially observed in group I cells. (e) Hypersensitivity to low dose (HRS). At low doses (ideally between 0.1 and 0.5 Gy), the flux of ATM monomers can be reduced again by the interactions with X-proteins (in group II cells). A too-low amount of ATM monomers that diffuse in the nucleus does not permit the recognition of the few DSB induced by radiation (red): the HRS phenomenon is preferentially observed in group II cells. It is noteworthy that the hyper-radiosensitivity observed at high doses in group III cells should not be confused with the hyper-radiosensitivity to low-dose (HRS) phenomenon. Lastly, the AR phenomenon has not been illustrated since its corresponding irradiation scenario does not fall directly into the scope of this review.

## 2. LDRT in Oncology

### 2.1. Clinical Data about LDRT against Cancer

As evoked above, the technological limits of the 1895–1930 period did not facilitate the application of high doses and high-energy photons. Hence, the first attempts of anti-cancer RT were performed with single and repeated low doses [2,3,8,9]. LDRT has long been applied for the treatment of acute leukemia, with myeloablative total body irradiation (TBI) prior to hematopoietic stem cell transplantation. A TBI of 12 Gy total is commonly delivered according to different schedules: 2 Gy per session twice daily for 3 days, 3 Gy per session daily for 4 days, and, considering low doses, 1.5 Gy per session twice daily, or 1.2 Gy per session three times daily for 4 days [28].

Based on the good results of TBI in non-solid tumors, and since lymphomas are known to be radiosensitive [29], LDRT has then been assessed in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL). In a 1970s cohort, the TBI of 68 patients with NHL, with a median dose of 0.1 Gy per session and mean total dose of 1.78 Gy, achieved a recurrence-free survival of 32% and 27%, respectively, at 5 and 10 years [30]. A decade later, Richaud et al. underlined the excellent remission rate in NHL patients who received two courses of LD-TBI (0.75 Gy per 5 sessions) with concomitant chemotherapy followed 1 month later by radical involved-field RT [31].



More recently, LDRT exhibited a clinical interest in treating metastatic diseases. In 2004, a study examining 36 metastatic tumor nodules after a 12-day RT revealed that time to regrowth was longer when using an ultra-fractionated scheme (0.5 Gy every 4 h) compared to a standard fractionation (1.5 Gy daily) [32]. In a phase II study, Morganti et al. demonstrated that 38.9% of patients with metastatic colorectal cancer showed a complete response in lesions treated with two daily LDRT sessions (20 cGy every 6 h) on each of the 12 concomitant chemotherapy cycles [33]. Combined with immunotherapy, LDRT of 1 Gy per session also resulted in metastasis (liver and inguinal lymph node) complete response in an elderly patient with vaginal melanoma [34]. In another phase II trial, 74 patients with metastatic cancer (non-small cell lung cancer,  $n = 38$ ; melanoma,  $n = 21$ ) underwent a treatment of high-dose RT (HDRT: 20–70 Gy total; 3–12.5 Gy per session) associated or not with LDRT (1–10 Gy total; 0.5–2 Gy per session). Follow-up showed that adding LDRT to HDRT strengthened the 4-month disease control response (47% in HDRT + LDRT versus 37% in HDRT alone;  $p = 0.38$ ) and increased the overall response (26% in HDRT + LDRT versus 13% in HDRT alone;  $p = 0.27$ ). This scheme also appeared to be safe, with only three patients (4.1%) suffering from toxicity of grade 3 or more. However, it must be mentioned that the patients enrolled in the study received immunotherapy [35]. It is noteworthy that the hyperfractionated schemes commonly used in radiation oncology concern doses from 1.1 Gy per session (head and neck squamous cell carcinomas, [36]) to 1.5 Gy per session (limited small-cell lung cancer [37]), which is, strictly speaking, actually not in the historical scope of LDRT.

Table 1 summarizes the clinical attempts and results of LDRT in oncology. However, it must be stressed that the available data are mostly based on case reports or trials with a relatively low number of patients.

## 2.2. Biological Hypotheses about the Anti-Cancer Effect of LDRT

The application of LD-TBI against lymphoma was the result of a long succession of empirical attempts that was facilitated by the current radiosensitivity of lymphoma. In a second step, from the 1980s, the HRS phenomenon became the major molecular basis of LDRT against lymphoma. In fact, HRS has been described in a large subset of tumor cell lines. Particularly, Joiner and Marples observed an increased radiosensitivity in murine cells below 1 Gy per session, which was not predicted by the standard linear-quadratic (LQ) model that is still the current mathematical description of the cellular radiation response [20,38–40]. In fact, the standard LQ model predicts that clonogenic cell survival progressively and continuously decreases as far as the radiation dose increases. Interestingly, survival curves showing the HRS phenomenon elicited a discontinuous dose-response suggesting an excess of cell death in a specific range of low doses [20,40]. Later, Lambin et al. described excess mortality in human tumor cells after X-irradiation between 0.05–1 Gy, both in colorectal cancer [17] and bladder carcinoma [41], and, once again, underestimated by the LQ model. In parallel, one human glioblastoma cell line was found significantly more sensitive to LDRT (3 sessions of 0.4 Gy) than with a unique session of 1.2 Gy [42]. Observations showed that, in HRS-positive cells irradiated in the G2 phase, DSB were normally recognized by ATM phosphorylation of the histone variant H2AX ( $\gamma$ H2AX) [43], but cell cycle arrest was ineffective [44], leading to excess tumor cell death.

In addition to HRS, the immune microenvironment has also been mentioned to explain the LDRT anti-cancer efficiency. Some studies described an increased infiltration of effector immune cells (T cells and NK cells) in animal [45,46] and human [33,47] tumors submitted to LDRT. However, such an explanation has not been documented in a large subset of tumors, and the causal link between the immune microenvironment and the HRS remains to be established.

**Table 1.** State of the art of low-dose radiation therapy (LDRT) in oncology.

	Target	Study Design	Irradiation Scheme	Response	Reference
<b>Haemato-oncology</b>					
68 patients with NHL (90% stage III and IV)	Whole body	Retrospective	LD-TBI: midline 0.1 Gy per session (1.78 Gy total)	Recurrence-free survival: 32% at 5 years, 27% at 10 years	[30]
26 patients with NHL (stage III and IV)	Whole body	Prospective, non-randomized (pilot study)	Chemotherapy and 2 courses of LD-TBI: 5 × 0.15 Gy per session (separated by 2 weeks), followed 1 month later by radical involved-field RT (20 × 2 Gy per session)	Complete remission in 92.3% (24/26) of patients after LD-TBI and before IF-RT; Complete remission in 96.2% (25/26) of patients after IF-RT	[31]
<b>Distant metastases</b>					
8 patients with metastatic tumor nodules	Metastases	Randomized study	Standard fractionated RT: 12 × 1.5 Gy per session or ultra-fractionated RT: 0.5 Gy/4 h over 12 days	Significantly increased growth delay in nodules treated with the ultra-fractionated RT scheme	[32]
18 patients with metastatic colorectal cancer	Metastases	Phase II	0.2 Gy per session every 6 h interval (on each chemotherapy cycle)	Clinical or pathological complete response in 38.9% (7/18) of patients	[33]
A 73-yr woman with metastatic vaginal mucosal melanoma progressing on immunotherapy	Metastases	Case report	LDRT: 5 × 1 Gy per session (liver metastasis); 6 × 1 Gy per session (inguinal lymph node)	Clinical and radiographic complete response	[34]
74 patients with metastatic cancer (NSCLC, <i>n</i> = 38; melanoma, <i>n</i> = 21) progressing on immunotherapy within 6 months	Metastases	Phase II	HDRT alone: 3–12.5 Gy per session (20–70 Gy total) or HDRT + LDRT: 0.5–2 Gy per session (1–10 Gy total)	4-month disease control response: 47% in HDRT + LDRT vs. 37% in HDRT alone ( <i>p</i> = 0.38); Overall response: 26% in HDRT + LDRT vs. 13% in HDRT ( <i>p</i> = 0.27)	[35]

NSCLC = small-cell lung cancer. NHL = non-Hodgkin's lymphoma. TBI = total body irradiation. RT = radiation therapy. HD = high dose. LD = low dose.

### 2.3. The HRS Phenomenon and the RIANS Model

As evoked in the Introduction, the number of radiation-induced DSB and ATM monomers obey a linearly dose-dependent law, whatever the group of radiosensitivity of cells [20,23]. In the group I (radioresistant) cells, there are always many more ATM monomers than DSB produced, which facilitates the recognition of all the radiation-induced DSB by the ATM monomers available in the nucleus after irradiation [20,23]. In group III (hyper-radiosensitive) cells, the HRS phenomenon does not exist since there are no active ATM monomers to recognize DSB or no active NHEJ pathway to repair them. Conversely, in group II cells, the recognition of DSB is incomplete since the overexpressed X-proteins sequester a large amount of ATM monomers in the cytoplasm [20]. In these conditions, the subset of non-recognized DSB may produce a significant tumor cell-killing effect. The optimal conditions of LDRT may be simulated *in vitro*. At a high dose-rate (> 1 Gy/min), the maximal HRS effect may represent a decrease in cell survival of 25% in the range of 0.1 to 0.8 Gy [48]. Hence, an LDRT consisting of the application of several doses belonging to this dose range may result in a significant tumor cell-killing effect. However, the benefit of the LDRT is conditioned by the fact that the tumor should either belong to group III (hyper-radiosensitive) or be HRS-positive and belonging to group II and that the surrounding healthy tissues should be HRS-negative and group I (radioresistant) to avoid any adverse reactions or risk of radiation-induced cancer. It is also noteworthy that the dose range in which HRS is maximal decreases with the dose-rate [48]. Hence, further investigations are needed to optimize the LDRT protocol (doses and dose-rate) to reach the maximal tumor cell-killing effect by sparing healthy tissues.

### 3. LDRT in Inflammation-Related Pathologies

#### 3.1. Clinical Data about LDRT against Inflammation in Rheumatology

The palliative properties of X-rays have been abundantly documented together with their anti-cancer efficiency: indeed, reducing tumor volume can be frequently accompanied by the reduction of pain due to the decompression of the tumor against surrounding tissues. During the first historical attempt at RT, about 6 months after the discovery of X-rays, Victor Despeignes described in his X-ray-treated patient a significant reduction of pain together with the reduction of the tumor [2–4]. However, the analgesic properties of X-rays have been early described on other diseases than cancer, notably on rheumatology diseases and particularly arthritis. Indeed, radiation pioneers such as Sokolow (1897), Stenbeck (1899), Albers-Schönberg (1900), Stembo (1900), and Moser (1903) described a significant reduction in pain following RT against acute arthritis [5–7,49,50]. As already evoked in the Introduction, in the first decade of the 20th century, X-ray treatments against arthritis resulted in single or fractionated X-ray sessions of low doses because of technology limitations. After the 1930s, a number of anti-inflammatory RT protocols flourished, and the total dose increased. In parallel with the radium girls [51], the risk of radiation-induced cancers and/or long-term sequelae suggested that the total dose should be limited [52]. It is noteworthy that RT against ankylosing spondylitis became a routine from the 1930s up to the 1950s [53].

To date, the recommended total dose for painful joint disorders, such as synovitis, elbow syndrome, shoulder syndrome, trochanteric bursitis, plantar fasciitis, and arthrosis (although osteoarthritis is not always associated with inflammation), is typically set around 3–6 Gy, delivered in 0.5–1 Gy per session [54]. In a prospective study, Micke et al. depicted a pain relief effect of LDRT (6 Gy delivered in 0.5–1 Gy per session) in 166 elderly patients with degenerative joint disorders [55]. A more recent study came to the same conclusion after irradiating 196 patients with painful osteoarthritis of the ankle and foot with a LDRT scheme (3–6 Gy delivered in 0.5–1 Gy per session) [56]. Conversely, three randomized sham-controlled clinical trials invalidated this supposed LDRT benefit in patients with knee and hand osteoarthritis [57–59]. Altogether, this short review suggests that LDRT against inflammatory bone and joint tissue diseases was an important application of X-rays very early after the discovery of X-rays. However, the mechanisms by which LDRT can act on the bone system are still difficult to determine since the response of the regulation between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts appears to be strongly dose-dependent. Low doses were shown to modulate the immune system and impact bone homeostasis. Furthermore, low doses may stimulate osteoblast proliferation and/or differentiation while they inhibit the viability of osteoclasts, which may facilitate the promotion of bone formation and the reduction of bone resorption. Hence, further investigations are still needed to build a unified model linking the immunological and molecular features of the bone response to radiation [60].

#### 3.2. Clinical Data about LDRT against Inflammation after COVID-19 Infection

Recently, another important application of LDRT emerged with the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. COVID-19, due to the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is responsible for about 6.8 million deaths worldwide as of 3 February 2023 according to the WHO COVID-19 dashboard (<https://covid19.who.int/>, accessed on 1 February 2020). Lung inflammation has been mentioned to play a major role in COVID-19 pathogenesis and its mortality [61–63].

Since the beginning of the coronavirus pandemic, many authors evaluated the use of LDRT in COVID-19 patients, probably inspired by the anti-inflammatory properties of X-rays from the above data and/or by empirical observations after CT scan exams [62,64]. In two prospective trials, a single dose of 0.5–1 Gy to whole lungs produced a significant clinical improvement in terms of pulse oximetric saturation (SatO<sub>2</sub>)/fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>) ratio without radiotoxicity [65,66]. In a phase II trial, Ganesan et al. reported some pulmonary benefits (the SatO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio significantly improved, and the oxygen

supply decreased significantly) in 88% of COVID-19 patients after LDRT delivered in a single session of 0.5 Gy to the bilateral whole lungs [67]. These results were in agreement with those published by Rodríguez-Tomás et al. in 30 patients submitted to the same single 0.5 Gy LDRT scheme [68], but not with a randomized trial delivering 1 Gy in 20 patients [69]. Two randomized ongoing clinical trials are currently evaluating other dose fractionations: 1.5 Gy versus sham (NCT04433949, Emory University, USA, with its interim analysis [70]) and 0.35 Gy or 1 Gy versus sham (NCT04466683, Ohio State University Comprehensive Cancer Center, USA). Altogether, the clinical attempts and results of LDRT in inflammation-related pathologies (rheumatology and COVID-19) are presented in Table 2.

**Table 2.** State of the art of low-dose radiation therapy (LDRT) in inflammation-related pathologies.

	Target	Study Design	Irradiation Scheme	Response	Reference
<b>Rheumatology</b>					
166 patients with painful skeletal disorders (calcaneodynia, $n = 51$ ; achillodynia, $n = 8$ ; gonarthrosis, $n = 80$ ; bursitis trochanterica, $n = 27$ )	Joints/bone	Prospective	0.5–1 Gy per session (6 Gy total)	Good response in 37.3% (62/166) of patients immediately on completion of RT and in 49.5% (54/109) of patients after a median follow-up of 29 months ( $p = 0.001$ )	[55]
196 patients with ankle/foot osteoarthritis	Joints	Prospective	0.5–1 Gy per session (3–6 Gy total) over 3 weeks	Subjective improvement of 80–100% in 37% (71/196) of patients	[56]
56 patients with knee/hand osteoarthritis	Joints	Randomised, sham-controlled	LDRT: 6 × 1 Gy per session or sham	No significant evidence of beneficial LDRT effect	[57]
55 patients with knee osteoarthritis	Joints	Randomised, double-blinded, sham-controlled	LDRT: 6 × 1 Gy per session or sham	No significant evidence of beneficial LDRT effect	[58]
56 patients with hand osteoarthritis	Joints	Randomised, blinded, sham-controlled	LDRT: 6 × 1 Gy per session or sham	No significant evidence of beneficial LDRT effect	[59]
<b>COVID-19</b>					
36 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Prospective	1 × 0.5 Gy per session	SAFI improved from 255 mmHg to 283 mmHg at 24 h and to 381 mmHg at 1 week, respectively	[65]
41 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Prospective phase I-II	1 × 1 Gy per session	SAFI significantly improved on day +3 and +7 ( $p < 0.01$ )	[66]
25 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Phase II	1 × 0.5 Gy per session	SAFI significantly improved between pre-RT and day +2 ( $p < 0.05$ ), +3 ( $p < 0.001$ ) and +7 ( $p < 0.001$ ) post-RT; oxygen supply significantly decreased between pre-RT and day +2 ( $p < 0.05$ ), +3 ( $p < 0.001$ ), and +7 ( $p < 0.001$ ) post-RT	[67]
30 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Multicenter, prospective, observational	1 × 0.5 Gy per session	SAFI significantly improved; oxygen supply decreased	[68]
20 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Randomized, double-blinded	1 × 1 Gy per session or sham	No significant evidence in 15-day ventilator-free days ( $p = 1.00$ ) nor overall survival at 28 days ( $p = 0.69$ ) in both arms; lymphocyte counts significantly decreased after LDRT ( $p < 0.01$ )	[69]
100 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Phase II, randomized	LDRT: 1 × 0.35 Gy per session or 1 × 1 Gy per session or sham	Recruiting since 2020	NCT04466683 (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, OH, USA)
52 COVID-19 patients	Bilateral whole lungs	Phase III, randomized	1 × 1.5 Gy per session or sham	Recruiting since 2020	NCT04433949 (Emory University Atlanta, GA, USA) [70]

RT = radiation therapy. COVID-19 = coronavirus disease 2019. SAFI = pulse oximetric saturation (SatO<sub>2</sub>)/fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>).

In a recent overview, by insisting again on the low amount of data available (number of treated patients, variety of the treatments, and the diversity of the molecular and cellular endpoints used), Rödel et al. (2020) stressed the importance of the appropriate timing of irradiation with the dose fractionation and the succession of the different steps observed during a COVID-19 infection. Hence, even if LDRT appears to be efficient against inflammation after COVID-19 infection, strict monitoring and disease phase-adapted treatment based on objective markers such as IL-6 and D-dimer in serum are required [71].

### 3.3. Biological Hypotheses about the Anti-Inflammatory Effect of LDRT

It is noteworthy that, although inflammation may follow some steps common to both arthritis and COVID-19, a molecular model may not necessarily be relevant for both pathologies. However, hyper-inflammation has been documented both in rheumatology [72,73] and in COVID-19 [74]. On this point, cells involved in the inflammation process could represent a target for LDRT. In serums of osteoarthritis mice models, Weissmann et al. observed a significant reduction in the pro-inflammatory CD8+ T-cells and IL-17A and a significant increase in the anti-inflammatory CD4+ T-cells, IL-4, and IL-6 after LDRT (0.5–1 Gy per session) [56]. Rödel et al. and Arenas et al. showed that LDRT (investigated dose range 0.3–0.7 Gy) significantly reduces the adhesion of peripheral blood mononuclear cells and the number of adherent leukocytes, both in vitro and in vivo [75–77]. Furthermore, some authors observed a more pronounced production of anti-inflammatory TGF- $\beta$ 1 in blood [75] and a reduction in lymphocyte counts [69] after LDRT. Interestingly, Sanmamed et al. described a significant decrease in inflammation biomarkers such as C-reactive protein and lymphocyte counts after 1 Gy in the lungs [66]. In the same way, a single dose of 0.5 Gy applied to the lungs induced lower C-reactive protein and TGF- $\beta$ 1 concentrations in COVID-19 patients [68]. X-irradiation between 0.5–1 Gy also exhibited a significant reduction of CCL20, a chemokine that facilitates the recruitment of polymorphonuclear neutrophils toward the inflammation sites and is dependent on TGF- $\beta$ 1 [78]. More recently, in murine models, Meziani et al. (2021) showed that LDRT increases the immunosuppressive profile of lung macrophages during viral infection and pneumonia [79]. Jackson et al. showed that LDRT against acute inflammatory lung injury suppresses the bleomycin-induced accumulation of pulmonary interstitial macrophages [80].

Altogether, this brief review suggests that, for both treatments against arthritis and COVID-19, LDRT results in a reduction in pro-inflammatory pathways and the stimulation of anti-inflammatory pathways, even if the specificities and the optimization of each type of treatment remain to be determined.

### 3.4. Tissue Inflammation and the RANS Model

Inflammation involves a myriad of proteins through a complex process of autocrine, paracrine, and endocrine secretions of cytokines that may serve as pro- or anti-inflammatory actors. Notably, IL-1b, IL-6, and TNF- $\alpha$  are rather pro-inflammatory cytokines, while the IL-1 receptor antagonists IL-13 and TGF- $\beta$  are rather anti-inflammatory cytokines [81]. Interestingly, all these cytokines are expressed in a radiation dose-dependent manner. Furthermore, these cytokines are cytoplasmic, overexpressed after exposure to radiation, and hold some SQ/TQ domains, preferentially phosphorylated by the ATM kinase [26]. Altogether, these statements suggest that ATM is strongly involved in the inflammatory pathways via interactions and phosphorylations of these cytokines that may be therefore considered as potential X-proteins. Particularly, activation of IL-6 was shown to promote the proliferation of glioblastoma cells after ionizing radiation in the presence of functional ATM [82], while activation of TGF- $\beta$  was shown to consolidate the ATM-CHK2-p53 complex, favoring a progressive senescence death rather than a proliferation of cells that would increase in the number of propagated DNA damage and therefore the toxicity rate [83]. These two representative examples showed that the ATM kinase is strongly involved in the fate of irradiated cells via interactions with (and phosphorylations of?) pro-inflammatory cytokines, which stimulates cell proliferation and therefore amplification and propagation

of DNA damage, mitotic death, and apoptosis. Conversely, via interactions with (and phosphorylations of?) anti-inflammatory cytokines, ATM promotes the cell cycle checkpoint arrests and senescence death, which limits the amount of unrepaired DNA damage. Unfortunately, there are still no quantitative evaluations of the expression of cytokines to be compared with the number of available ATM monomers in a dose range corresponding to LDRT. However, despite of this lack of data, the RIANS model may predict the influence of individual factors in the response to low doses since individual X-proteins and cytokines as radiation-induced X-proteins may contribute together to the sequestration of ATM in the cytoplasm.

Further investigations are therefore needed to better clarify the role of ATM in the inflammatory process. However, it is noteworthy that if the HRS phenomenon occurs, it also affects the expression of cytokines, therefore complexifying the dose-dependence of the inflammatory process.

Lastly, it is important to note that viral infection is generally associated with the expression of viral proteins. In the particular case of COVID-19, the Spike protein may hold between 5 to 13 SQ/TQ domains according to the nature of the associated coronavirus. Overexpressed in cytoplasm during viral infection, the Spike protein appears to be a potential X-protein that may sequester ATM and drastically reduce the diffusion of ATM monomers in the nucleus to respond to DNA strand breaks induced by the viral infection [84]. Hence, the individuals of group II, with a delayed RIANS, may be at risk of toxicity during infection. Again, further investigations are needed to document the role of ATM during the viral infection process, but it is likely that the RIANS model may contribute to understanding the basic mechanisms and to predicting the cases at risk.

#### 4. LDRT in Alzheimer's Disease (AD)

Alzheimer's disease (AD) is the world's leading cause of dementia, considered by the World Health Organization (WHO) as a global public health priority. Most of the time, only a probability diagnosis can be made on the basis of clinical arguments (age, hippocampal amnesia, and family history of AD) [85], supported by biological criteria after lumbar puncture (increased pTau protein and decreased A $\beta$ 1-42 peptide in the cerebrospinal fluid) [86] and cerebral imaging (cortico-subcortical atrophy, hippocampal atrophy, and no evidence of other cause of dementia) [87]. Definitive diagnosis of AD is based on the histological demonstration of extracellular amyloid-A $\beta$ 42 peptide deposits (senile plaques) in the supporting tissue of the central nervous system [88] and intracellular neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated Tau protein [89]. If neurofibrillary degeneration and senile plaques can be found in other pathologies, their association is pathognomonic of AD. Neuroinflammation is also a frequent sign encountered in the pathogenesis of AD [90–92].

##### 4.1. LDRT Clinical Trials in AD Patients

Since 2016, Cuttler et al. published two case reports describing patients with AD whose cognitive performance temporarily improved after iterative low-dose brain computed tomography (CT) scans, about 40–50 mGy each within 10 s [93–95]. The first case report presents an 81 years-old woman with AD progressing for 10 years, living in hospice care for several months, «almost totally noncommunicative», «completely nonresponsive», «frequently refusing her medications», «almost immobile», and who did «not attempt to rise from her wheelchair in months», when examined in May 2015 by a neuropsychologist. In July, her physician prescribed two CT scans of the brain (total dose of 82 mGy) to exclude any anatomical changes and, according to the patient's spouse, to «stimulate neuroprotective systems». The patient improved so dramatically (cognition, speech, movement, and appetite) in the following days that she underwent three other CT scans in a 3-month period: a third (39 mGy) 2 weeks after the previous, a fourth (47 mGy) 2 weeks later, and a fifth (39 mGy) 6 weeks later in October. Consecutively, her condition improved enough that she no longer required to stay in hospice care, and she moved to a home for seniors on November 2015 with a stimulating day program. The patient had a sixth brain CT scan

(40 mGy) 5 months after the fifth, a seventh (40 mGy) 4 months later, and an eighth (40 mGy) 4 months later, and as soon as her state began declining, she had additional brain CT scans earlier, with a ninth (40 mGy) 47 days later, and the last two—the tenth and eleventh—(80 mGy) 41 days later, in January 2017. Ultimately, she received about 0.45 Gy over the whole brain in 11 CT scans in an 18-month period. She finally died on 18 May 2018, 16 months after the last CT [88,89].

The same authors reported another case of a 73-year-old man diagnosed with AD in January 2015, who benefited from similar brain CT scans but associated with the Mini-Mental State Examination (MMSE) throughout [95]. It is noteworthy that an MMSE score of 23/30 or less generally signs the presence of cognitive impairment [96]. The patient presented an MMSE baseline score of 22/30 in February 2016 and had a primary CT scan of 46 mGy in April 2016. Three weeks after, his MMSE improved to 24/30. He received a second CT scan two months after the first, and his MMSE continued to increase to 26/30 when assessed in September. The third and fourth CT scans preceded another 26/30 MMSE score in February 2017, which then started to decrease down to 25/30 in March and 24/30 in April. Two additional CT scans (a fifth and sixth) were given until October 2017, when the patient had been considered to enter the moderate or mid-range of AD. He then progressively declined and finally died on 7 September 2020, at age 77.

Radiation effects on the brain are actively evaluated *in vivo*. Hence, X-irradiation ( $5 \times 2$  Gy) of the brain seems to be correlated with cognitive improvement in murine AD models [97–99]. Based on these encouraging LDRT results on animals, some clinical trials are conducted with such dose schemes. Hence, NCT02359864 (William Beaumont Hospitals, Royal Oak, MI, USA) and NCT02769000 (Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA) attempted  $5 \times 2$  Gy and  $10 \times 2$  Gy fractionations but were suspended for staffing and budget limitations and interrupted due to COVID-19, respectively. Finally, the randomized and prospective NCT03352258 (Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland) is currently recruiting, with the aim to treat 10 AD patients at  $5 \times 2$  Gy. However, since human cells are more radiosensitive than murine cells [100,101], it is possible that the dose employed in these trials could be reduced to achieve clinical efficiency. It appears urgent to better explain and justify the drastic differences observed between the studies implying CT scan and mGy doses and those implying fractions of 2 Gy with radiotherapy irradiators. Again, the schedule of the dose fractionation should be adapted to the kinetics of the disease progression.

In continuity with their two questioning case reports [93,95], Cuttler et al. undertook a single-arm study in four AD patients with severe but stable dementia (age: 81–90 yr, MMSE baseline score: 0, 0, 0, and 5, respectively) [102]. Patients received two brain CT scans at once during the same treatment session (80 mGy total), then a third (40 mGy) two weeks later, and a fourth and last (40 mGy) two more weeks later. Three of the four patients showed slight cognition and behavior improvements on quantitative measures; notably, a Severe Impairment Battery (SIB) score improved from 21% to 31% in one patient and basic activities of daily living (ADL) improved from 26.7% to 30% in another patient. Although these minor results produced no long-term benefit for patients, some of the brief improvements observed directly after CT scans could reflect a significant biological effect of LDRT. Clinical attempts and results of LDRT in AD are depicted in Table 3. Lastly, if cellular mechanisms of LDRT are emerging in AD models, there is still no molecular model to explain LDRT effects in human AD patients.

#### 4.2. Biological Hypotheses about the Beneficial Effect of LDRT for AD

In two *in vivo* murine studies, cognitive alleviation after LDRT was also associated with a reduction in amyloid-A $\beta$ 42 plaques [98,99]. Furthermore, Yang et al. pointed out that X-rays positive effects on AD (senile plaque control and cognitive improvements) could be reached even when decreasing the dose in mice from standard fractionation ( $5 \times 2$  Gy) to an LDRT scheme ( $5 \times 0.6$  Gy) [99]. The radio-induced reduction of amyloid-A $\beta$ 42 plaques in AD mice appears to be concomitant with the mitigation of neuroinflamma-

tory cytokine production (CD54, IL-3, CXCL9/10, and CCL2/4) [99,103] and inconsistently with or without the reduction of Tau protein staining [104,105]. Kim et al. also showed a similar anti-inflammatory effect after delivering 5 sessions of 1.8 Gy each to mice heads, associated with decreased synaptic degeneration and neuronal loss [103].

**Table 3.** State of the art of low-dose radiation therapy (LDRT) in Alzheimer’s disease (AD).

	Target	Study Design	Irradiation Scheme	Response	Reference
An 81-yr-old woman with AD	Brain	Case report	5 × 40 mGy/CT over 3 months	Clinical cognitive improvement allowing discharge from hospice care	[93]
A 73-yr-old man with AD	Brain	Case report	6 × 45–50 mGy/CT over 18 months	Elevation of MMSE score from 22/30 up to 26/30	[95]
4 AD patients	Brain	Single-arm (pilot study)	4 × 40 mGy/CT over 1 month	Slight cognition and behavior improvements on quantitative measures (SIB, ADL)	[102]
30 AD patients	Brain	Phase I (single-arm pilot study)	5 × 2 Gy per session 10 × 2 Gy per session	Suspended due to staffing and budget limitations	NCT02359864 (William Beaumont Hospitals, Royal Oak, MI, USA)
5 AD patients	Brain	Phase IIa (single-arm pilot study)	5 × 2 Gy per session 10 × 2 Gy per session	Interrupted due to COVID-19	NCT02769000 (Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA)
20 AD patients	Brain	Randomized, monocentric, prospective (pilot study)	5 × 2 Gy per session	Recruiting since 2017	NCT03352258 (Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland)

MMSE = Mini-Mental State Examination. SIB = severe impairment battery. ADL = basic activities of daily living.

However, Ceyzériat et al. reported that memory performance improvements observed in AD mice after LDRT could also occur without changes in the amyloid load [97]. Then, it is possible that senile plaque accumulation would not be a cause but a consequence of AD [106]. Hence, to date, no molecular mechanism of LDRT’s effect on AD can be identified.

#### 4.3. Degenerative Diseases and the RIANs Model

The RIANs model has already been validated in a subset of neurodegenerative diseases, such as Huntington’s disease, tuberous sclerosis, some forms of xeroderma pigmentosum D and neurofibromatosis type 1, to explain the (group II) radiosensitivity associated with these syndromes [107–110]. In all these diseases, the X-proteins (huntingtin, tuberin, XPD, and neurofibromin, respectively) are highly expressed in the cytoplasm in skin fibroblasts of the mutated patients. All these X-proteins interact with ATM, which delays the RIANs [107–110]. Interestingly, the brain is one of the organs that expresses the least ATM protein, which may suggest that the biological consequences of delayed RIANs may be more severe in the brain than in skin cells [111].

Since the 1980s, some studies have shown that fibroblasts and lymphocytes from patients with AD are radiosensitive and may have dysfunctions in some DSB repair pathways [112–114]. Very recently, we have identified one of the potential X-proteins associated with AD: the APOE protein is overexpressed in a large subset of AD patients and interacts with ATM by forming perinuclear ATM–pAPOE complexes (Berthel et al., submitted). These complexes prevent the RIANs and progressively cumulate unrecognized DSB, which



leads to senescence, death, and accelerated aging (Berthel et al., submitted). Interestingly, exposure to radiation contributes to the dissociation of the ATM dimers and the ATM–pAPOE complexes, permitting thereafter some ATM monomers to recognize DNA breaks. However, the determination of the dose to optimize LDRT is in progress (Berthel et al., submitted).

The reports of Cuttler et al. raise another question: Cuttler et al. proposed LDRT involving doses ranging from 20 to 75 mGy. This dose range concerns the hormesis phenomenon [19]. Exposing cells to 20 to 75 mGy may result in producing ATM monomers and very few additional DNA strand breaks. Considering the pro-inflammatory DSB induced by permanent genotoxic stress, it is possible that LDRT, via a hormesis-like effect, promotes the monomerization of the ATM protein, its diffusion to the nucleus, and, finally, the initiation of DSB repair. Thereby, the RIANS model may explain the anti-inflammatory effect of LDRT with doses ranging from 20 to 75 mGy (Figure 1d). Further investigations are needed to consolidate this model and the crucial choice of the total dose and the dose per session in LDRT that should be efficient against neurodegenerative diseases.

## 5. Conclusions

LDRT is currently applied in oncology, in inflammation-related pathologies, and in AD, which illustrates well the discontinuity of the dose-response curve and the counterintuitive observation that a low dose may produce a biological effect higher than a certain higher dose. Even if further investigations are needed to document and optimize LDRT, the apparent paradox of some radiobiological effects specific to low doses may be explained by the same mechanistic model based on the radiation-induced nucleoshuttling of the ATM kinase.

## 6. Patents

The works and the data of the U1296 Inserm Unit regarding Alzheimer’s disease have been recently protected by a patent deposited in January 2023.

**Author Contributions:** E.L.R. and N.F. have contributed equally to the conceptualization, writing, editing and reviewing and agreed to the published version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Commissariat General à l’Investissement (Programmes Investissement d’Avenir (INDIRA Project)) and the Centre National d’Etudes Spatiales (ICARE Project).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Newmark, F.M. Radiation therapy of tuberculosis of hilar lymph nodes. *JAMA* **1955**, *157*, 532–533. [[CrossRef](#)]
2. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l’estomac traité par les rayons Roentgen. *Lyon Méd.* **1896**, *82*, 428–430.
3. Despeignes, V. Observation concernant un cas de cancer de l’estomac traité par les rayons Roentgen. *Lyon Méd.* **1896**, *82*, 503–506.
4. Bernier, J.; Hall, E.J.; Giaccia, A. Radiation oncology: A century of achievements. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 737–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Schmid-Monnard, C. Über Heilung des Gelenkrheumatismus durch Röntgenstrahlen bei Kindern. *Fortschr. Dem Geb. Der Röntgenstrahlen* **1898**, *1*, 209.
6. Stenbek, T. Om behandling of kronisk ledgangs-rheumatism med Rontgestralar. *Sv Läk Förh* **1898**, *117*.
7. Rodel, F.; Keilholz, L.; Herrmann, M.; Sauer, R.; Hildebrandt, G. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **2007**, *83*, 357–366. [[CrossRef](#)]
8. Foray, N. Victor Despeignes (1866–1937): How a hygienist became the first radiation oncologist. *Cancer Radiother.* **2013**, *17*, 244–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Foray, N. Victor Despeignes, the forgotten pioneer of radiation oncology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *96*, 717–721. [[CrossRef](#)]
10. Regaud, C.; Blanc, J. Action des rayons X sur les diverses générations de la lignée spermatique. Extrême sensibilité des spermatogonies à ces rayons. *Comptes-Rendus Société Biol.* **1906**, *61*, 163–165.
11. Regaud, C. The influence of the duration of irradiation on the changes produced in the testicle by radium. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1977**, *2*, 565–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Kato, H.; Schull, W.J.; Awa, A.; Akiyama, M.; Otake, M. Dose-response analyses among atomic bomb survivors exposed to low-level radiation. *Health Phys.* **1987**, *52*, 645–652. [[CrossRef](#)]
13. Calabrese, E.J. Hormesis: A fundamental concept in biology. *Microb. Cell* **2014**, *1*, 145–149. [[CrossRef](#)]
14. Luckey, T.D. *Hormesis with Ionizing Radiation*; CRC Press: New York, NY, USA, 1980.
15. Olivieri, G.; Bodycote, J.; Wolff, S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **1984**, *223*, 594–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2018**, *16*, 1559325818789836. [[CrossRef](#)]
17. Lambin, P.; Marples, B.; Fertil, B.; Malaise, E.P.; Joiner, M.C. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int. J. Radiat. Biol.* **1993**, *63*, 639–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Joiner, M.C.; Lambin, P.; Malaise, E.P.; Robson, T.; Arrand, J.E.; Skov, K.A.; Marples, B. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res.* **1996**, *358*, 171–183. [[CrossRef](#)]
19. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2020**, *18*, 1559325820913784. [[CrossRef](#)]
20. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)]
21. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **1991**, *13*, 641–648.
22. Pastwa, E.; Blasiak, J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*, 891–908. [[CrossRef](#)]
23. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.; Leblond, P.; Combemale, P.; et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7158. [[CrossRef](#)]
25. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. [[CrossRef](#)]
26. Kim, S.T.; Lim, D.S.; Canman, C.E.; Kastan, M.B. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37538–37543. [[CrossRef](#)]
27. El Nachef, L.; Berthel, E.; Ferlazzo, M.L.; Le Reun, E.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Bourguignon, M.; Foray, N. Cancer and Radiosensitivity Syndromes: Is Impaired Nuclear ATM Kinase Activity the Primum Movers? *Cancers* **2022**, *14*, 6141. [[CrossRef](#)]
28. Wong, J.Y.C.; Filippi, A.R.; Dabaja, B.S.; Yahalom, J.; Specht, L. Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *101*, 521–529. [[CrossRef](#)]
29. Holmes, G.W.; Schulz, M.D. Radiation treatment of localized malignant lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **1946**, *235*, 789–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lybeert, M.L.; Meerwaldt, J.H.; Deneve, W. Long-term results of low dose total body irradiation for advanced non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1987**, *13*, 1167–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Richaud, P.M.; Soubeyran, P.; Eghbali, H.; Chacon, B.; Marit, G.; Broustet, A.; Hoerni, B. Place of low-dose total body irradiation in the treatment of localized follicular non-Hodgkin’s lymphoma: Results of a pilot study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *40*, 387–390. [[CrossRef](#)]
32. Harney, J.; Short, S.C.; Shah, N.; Joiner, M.; Saunders, M.I. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *59*, 1190–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Morganti, A.G.; Cellini, F.; Mignogna, S.; Padula, G.D.; Caravatta, L.; Deodato, F.; Picardi, V.; Macchia, G.; Cilla, S.; Buwenge, M.; et al. Low-dose radiotherapy and concurrent FOLFIRI-bevacizumab: A Phase II study. *Future Oncol.* **2016**, *12*, 779–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sezen, D.; Patel, R.R.; Tang, C.; Onstad, M.; Nagarajan, P.; Patel, S.P.; Welsh, J.W.; Lin, L.L. Immunotherapy combined with high- and low-dose radiation to all sites leads to complete clearance of disease in a patient with metastatic vaginal melanoma. *Gynecol. Oncol.* **2021**, *161*, 645–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Patel, R.R.; He, K.; Barsoumian, H.B.; Chang, J.Y.; Tang, C.; Verma, V.; Comeaux, N.; Chun, S.G.; Gandhi, S.; Truong, M.T.; et al. High-dose irradiation in combination with non-ablative low-dose radiation to treat metastatic disease after progression on immunotherapy: Results of a phase II trial. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2021**, *162*, 60–67. [[CrossRef](#)]
36. Bourhis, J.; Overgaard, J.; Audry, H.; Ang, K.K.; Saunders, M.; Bernier, J.; Horiot, J.C.; Le Maitre, A.; Pajak, T.F.; Poulsen, M.G.; et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: A meta-analysis. *Lancet* **2006**, *368*, 843–854. [[CrossRef](#)]
37. Turrisi, A.T., 3rd; Kim, K.; Blum, R.; Sause, W.T.; Livingston, R.B.; Komaki, R.; Wagner, H.; Aisner, S.; Johnson, D.H. Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 265–271. [[CrossRef](#)]

38. Joiner, M.C.; Denekamp, J. The effect of small radiation doses on mouse skin. *Br. J. Cancer Suppl.* **1986**, *7*, 63–66.
39. Marples, B.; Joiner, M.C. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat. Res.* **1993**, *133*, 41–51. [[CrossRef](#)]
40. Bodgi, L.; Canet, A.; Pujo-Menjouet, L.; Lesne, A.; Victor, J.M.; Foray, N. Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review. *J. Theor. Biol.* **2016**, *394*, 93–101. [[CrossRef](#)]
41. Lambin, P.; Malaise, E.P.; Joiner, M.C. The effect of very low radiation doses on the human bladder carcinoma cell line RT112. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1994**, *32*, 63–72. [[CrossRef](#)]
42. Short, S.C.; Kelly, J.; Mayes, C.R.; Woodcock, M.; Joiner, M.C. Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **2001**, *77*, 655–664. [[CrossRef](#)]
43. Wykes, S.M.; Piasentin, E.; Joiner, M.C.; Wilson, G.D.; Marples, B. Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat. Res.* **2006**, *165*, 516–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Marples, B.; Wouters, B.G.; Collis, S.J.; Chalmers, A.J.; Joiner, M.C. Low-dose hyper-radiosensitivity: A consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G2-phase cells. *Radiat. Res.* **2004**, *161*, 247–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Savage, T.; Pandey, S.; Guha, C. Postablation Modulation after Single High-Dose Radiation Therapy Improves Tumor Control via Enhanced Immunomodulation. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 910–921. [[CrossRef](#)]
46. Barsoumian, H.B.; Ramapriyan, R.; Younes, A.I.; Caetano, M.S.; Menon, H.; Comeaux, N.I.; Cushman, T.R.; Schoenhals, J.E.; Cadena, A.P.; Reilly, T.P.; et al. Low-dose radiation treatment enhances systemic antitumor immune responses by overcoming the inhibitory stroma. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Herrera, F.G.; Ronet, C.; Ochoa de Olza, M.; Barras, D.; Crespo, I.; Andreatta, M.; Corria-Osorio, J.; Spill, A.; Benedetti, F.; Genolet, R.; et al. Low-Dose Radiotherapy Reverses Tumor Immune Desertification and Resistance to Immunotherapy. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 108–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Thomas, C.; Martin, J.; Devic, C.; Diserbo, M.; Thariat, J.; Foray, N. Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 813–822. [[CrossRef](#)]
49. May, E.A. Roentgen therapy in acute inflammatory conditions. *Radiology* **1930**, *14*, 411–415. [[CrossRef](#)]
50. Kuhns, J.G.; Morrison, S.L. Twelve years experience in roentgenotherapy for chronic arthritis. *N. Engl. J. Med.* **1946**, *235*, 399–405. [[CrossRef](#)]
51. Gunderman, R.B.; Gonda, A.S. Radium girls. *Radiology* **2015**, *274*, 314–318. [[CrossRef](#)]
52. McKeown, S.R.; Hatfield, P.; Prestwich, R.J.; Shaffer, R.E.; Taylor, R.E. Radiotherapy for benign disease; assessing the risk of radiation-induced cancer following exposure to intermediate dose radiation. *Br. J. Radiol.* **2015**, *88*, 20150405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Muscoplat, C.C.; Caperton, E.M.; Dusenbery, K.E. Radiation therapy for inflammatory arthritis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *60*, 688–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Seegenschmiedt, M.H.; Micke, O.; Muecke, R.; the German Cooperative Group on Radiotherapy for Non-malignant Diseases (GCG-BD). Radiotherapy for non-malignant disorders: State of the art and update of the evidence-based practice guidelines. *Br. J. Radiol.* **2015**, *88*, 20150080. [[CrossRef](#)]
55. Micke, O.; Seegenschmiedt, M.H.; Adamietz, I.A.; Kundt, G.; Fakhrian, K.; Schaefer, U.; Muecke, R.; the German Cooperative Group on Radiotherapy for Non-malignant Diseases (GCG-BD). Low-Dose Radiation Therapy for Benign Painful Skeletal Disorders: The Typical Treatment for the Elderly Patient? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2017**, *98*, 958–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Weissmann, T.; Ruckert, M.; Zhou, J.G.; Seeling, M.; Lettmaier, S.; Donaubaue, A.J.; Nimmerjahn, F.; Ott, O.J.; Hecht, M.; Putz, F.; et al. Low-Dose Radiotherapy Leads to a Systemic Anti-Inflammatory Shift in the Pre-Clinical K/BxN Serum Transfer Model and Reduces Osteoarthritic Pain in Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 777792. [[CrossRef](#)]
57. Van den Ende, C.H.M.; Minten, M.J.M.; Leseman-Hoogenboom, M.M.; Van den Hoogen, F.H.J.; Bden Broeder, A.A.; Mahler, E.A.M.; Poortmans, P.M.P. Long-term efficacy of low-dose radiation therapy on symptoms in patients with knee and hand osteoarthritis: Follow-up results of two parallel randomised, sham-controlled trials. *Lancet Rheumatol.* **2020**, *2*, E42–E49. [[CrossRef](#)]
58. Mahler, E.A.M.; Minten, M.J.; Leseman-Hoogenboom, M.M.; Poortmans, P.M.P.; Leer, J.W.H.; Boks, S.S.; van den Hoogen, F.H.J.; den Broeder, A.A.; van den Ende, C.H.M. Effectiveness of low-dose radiation therapy on symptoms in patients with knee osteoarthritis: A randomised, double-blinded, sham-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 83–90. [[CrossRef](#)]
59. Minten, M.J.M.; Leseman-Hoogenboom, M.M.; Kloppenburg, M.; Kortekaas, M.C.; Leer, J.W.; Poortmans, P.M.P.; van den Hoogen, F.H.J.; den Broeder, A.A.; van den Ende, C.H.M. Lack of beneficial effects of low-dose radiation therapy on hand osteoarthritis symptoms and inflammation: A randomised, blinded, sham-controlled trial. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26*, 1283–1290. [[CrossRef](#)]
60. Donaubaue, A.J.; Deloch, L.; Becker, I.; Fietkau, R.; Frey, B.; Gaipf, U.S. The Influence of Radiation on Bone and Bone Cells—Differential Effects on Osteoclasts and Osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6377. [[CrossRef](#)]
61. Que, Y.; Hu, C.; Wan, K.; Hu, P.; Wang, R.; Luo, J.; Li, T.; Ping, R.; Hu, Q.; Sun, Y.; et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: A major mechanism of morbidity and mortality. *Int. Rev. Immunol.* **2022**, *41*, 217–230. [[CrossRef](#)]
62. Calabrese, E.J.; Dhawan, D.K. How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: Could it be useful today? *Yale J. Biol. Med.* **2013**, *86*, 555–570. [[PubMed](#)]
63. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Oppenheimer, A. Roentgen therapy of interstitial pneumonia. *J. Pediatr.* **1943**, *23*, 534–538. [[CrossRef](#)]

65. Arenas, M.; Algara, M.; De Febrer, G.; Rubio, C.; Sanz, X.; de la Casa, M.A.; Vasco, C.; Marin, J.; Fernandez-Leton, P.; Villar, J.; et al. Could pulmonary low-dose radiation therapy be an alternative treatment for patients with COVID-19 pneumonia? Preliminary results of a multicenter SEOR-GICOR nonrandomized prospective trial (IPACOVID trial). *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft* **2021**, *197*, 1010–1020. [[CrossRef](#)]
66. Sanmamed, N.; Alcantara, P.; Gomez, S.; Bustos, A.; Cerezo, E.; Gaztanaga, M.; Doval, A.; Corona, J.; Rodriguez, G.; Cabello, N.; et al. Low-dose Radiation Therapy in the Management of COVID-19 Pneumonia (LOWRAD-Cov19). Final results of a prospective phase I–II trial. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2022**, *171*, 25–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ganesan, G.; Ponniah, S.; Sundaram, V.; Marimuthu, P.K.; Pitchaikannu, V.; Chandrasekaran, M.; Thangarasu, J.; Kannupaiyan, G.; Ramamoorthy, P.; Thangaraj, B.; et al. Whole lung irradiation as a novel treatment for COVID-19: Interim results of an ongoing phase 2 trial in India. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2021**, *163*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Rodriguez-Tomas, E.; Acosta, J.C.; Torres-Royo, L.; De Febrer, G.; Baiges-Gaya, G.; Castane, H.; Jimenez, A.; Vasco, C.; Araguas, P.; Gomez, J.; et al. Effect of Low-Dose Radiotherapy on the Circulating Levels of Paraoxonase-1-Related Variables and Markers of Inflammation in Patients with COVID-19 Pneumonia. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1184. [[CrossRef](#)]
69. Papachristofilou, A.; Finazzi, T.; Blum, A.; Zehnder, T.; Zellweger, N.; Lustenberger, J.; Bauer, T.; Dott, C.; Avcu, Y.; Kohler, G.; et al. Low-Dose Radiation Therapy for Severe COVID-19 Pneumonia: A Randomized Double-Blind Study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2021**, *110*, 1274–1282. [[CrossRef](#)]
70. Hess, C.B.; Buchwald, Z.S.; Stokes, W.; Nasti, T.H.; Switchenko, J.M.; Weinberg, B.D.; Steinberg, J.P.; Godette, K.D.; Murphy, D.; Ahmed, R.; et al. Low-dose whole-lung radiation for COVID-19 pneumonia: Planned day 7 interim analysis of a registered clinical trial. *Cancer* **2020**, *126*, 5109–5113. [[CrossRef](#)]
71. Rodel, F.; Arenas, M.; Ott, O.J.; Fournier, C.; Georgakilas, A.G.; Tapio, S.; Trott, K.R.; Gaipl, U.S. Low-dose radiation therapy for COVID-19 pneumopathy: What is the evidence? *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft* **2020**, *196*, 679–682. [[CrossRef](#)]
72. Walsh, N.C.; Crotti, T.N.; Goldring, S.R.; Gravallesse, E.M. Rheumatic diseases: The effects of inflammation on bone. *Immunol. Rev.* **2005**, *208*, 228–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Luyten, F.P.; Lories, R.J.; Verschueren, P.; de Vlam, K.; Westhovens, R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pr. Res. Clin. Rheumatol.* **2006**, *20*, 829–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zoulikha, M.; Huang, F.; Wu, Z.; He, W. COVID-19 inflammation and implications in drug delivery. *J. Control. Release* **2022**, *346*, 260–274. [[CrossRef](#)]
75. Rodel, F.; Schaller, U.; Schultze-Mosgau, S.; Beuscher, H.U.; Keilholz, L.; Herrmann, M.; Voll, R.; Sauer, R.; Hildebrandt, G. The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft* **2004**, *180*, 194–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Arenas, M.; Gil, F.; Gironella, M.; Hernandez, V.; Jorcano, S.; Biete, A.; Pique, J.M.; Panes, J. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, *66*, 560–567. [[CrossRef](#)]
77. Arenas, M.; Gil, F.; Gironella, M.; Hernandez, V.; Biete, A.; Pique, J.M.; Panes, J. Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: Correlation with TGF-beta(1) expression. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2008**, *86*, 399–406. [[CrossRef](#)]
78. Rodel, F.; Hofmann, D.; Auer, J.; Keilholz, L.; Rollinghoff, M.; Sauer, R.; Beuscher, H.U. The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft* **2008**, *184*, 41–47. [[CrossRef](#)]
79. Mezziani, L.; Robert, C.; Classe, M.; Da Costa, B.; Mondini, M.; Clemenson, C.; Alfaro, A.; Mordant, P.; Ammari, S.; Le Goffic, R.; et al. Low Doses of Radiation Increase the Immunosuppressive Profile of Lung Macrophages During Viral Infection and Pneumonia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2021**, *110*, 1283–1294. [[CrossRef](#)]
80. Jackson, M.R.; Stevenson, K.; Chahal, S.K.; Curley, E.; Finney, G.E.; Gutierrez-Quintana, R.; Onwubiko, E.; Rupp, A.; Strathdee, K.; Williams, K.; et al. Low-Dose Lung Radiation Therapy for COVID-19 Lung Disease: A Preclinical Efficacy Study in a Bleomycin Model of Pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2022**, *112*, 197–211. [[CrossRef](#)]
81. Zhang, J.M.; An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesth. Clin.* **2007**, *45*, 27–37. [[CrossRef](#)]
82. Lim, Y.C.; Quek, H.; Offenhauser, C.; Fazry, S.; Boyd, A.; Lavin, M.; Roberts, T.; Day, B. ATM inhibition prevents interleukin-6 from contributing to the proliferation of glioblastoma cells after ionizing radiation. *J. Neurooncol.* **2018**, *138*, 509–518. [[CrossRef](#)]
83. Cipriano, R.; Kan, C.E.; Graham, J.; Danielpour, D.; Stampfer, M.; Jackson, M.W. TGF-beta signaling engages an ATM-CHK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8668–8673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Jackson, C.B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 3–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **1984**, *34*, 939–944. [[CrossRef](#)]

86. Forlenza, O.V.; Radanovic, M.; Talib, L.L.; Aprahamian, I.; Diniz, B.S.; Zetterberg, H.; Gattaz, W.F. Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimers Dement.* **2015**, *1*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Westman, E.; Muehlboeck, J.S.; Simmons, A. Combining MRI and CSF measures for classification of Alzheimer's disease and prediction of mild cognitive impairment conversion. *Neuroimage* **2012**, *62*, 229–238. [[CrossRef](#)]
88. Thal, D.R.; Rub, U.; Orantes, M.; Braak, H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **2002**, *58*, 1791–1800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Barbier, P.; Zejneli, O.; Martinho, M.; Lasorsa, A.; Belle, V.; Smet-Nocca, C.; Tsvetkov, P.O.; Devred, F.; Landrieu, I. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 204. [[CrossRef](#)]
90. Leng, F.; Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* **2021**, *17*, 157–172. [[CrossRef](#)]
91. Cai, Y.; Liu, J.; Wang, B.; Sun, M.; Yang, H. Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Related Therapeutic Targets. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 856376. [[CrossRef](#)]
92. Ma, M.W.; Wang, J.; Zhang, Q.; Wang, R.; Dhandapani, K.M.; Vadlamudi, R.K.; Brann, D.W. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Cuttler, J.M.; Moore, E.R.; Hosfeld, V.D.; Nadolski, D.L. Treatment of Alzheimer Disease with CT Scans: A Case Report. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2016**, *14*, 1559325816640073. [[CrossRef](#)]
94. Cuttler, J.M.; Moore, E.R.; Hosfeld, V.D.; Nadolski, D.L. Update on a Patient with Alzheimer Disease Treated with CT Scans. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2017**, *15*, 1559325817693167. [[CrossRef](#)]
95. Cuttler, J.M.; Lamet, M.S.; Calabrese, E.J. Treatment of Early-Stage Alzheimer's Disease with CT Scans of the Brain: A Case Report. *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.* **2022**, *20*, 15593258221078392. [[CrossRef](#)]
96. Ruchinkas, R.A.; Curyto, K.J. Cognitive screening in geriatric rehabilitation. *Rehabil. Psychol.* **2003**, *48*, 14–22. [[CrossRef](#)]
97. Ceyzeriat, K.; Zilli, T.; Fall, A.B.; Millet, P.; Koutsouvelis, N.; Dipasquale, G.; Frisoni, G.B.; Tournier, B.B.; Garibotto, V. Treatment by low-dose brain radiation therapy improves memory performances without changes of the amyloid load in the TgF344-AD rat model. *Neurobiol. Aging* **2021**, *103*, 117–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Marples, B.; McGee, M.; Callan, S.; Bowen, S.E.; Thibodeau, B.J.; Michael, D.B.; Wilson, G.D.; Maddens, M.E.; Fontanesi, J.; Martinez, A.A. Cranial irradiation significantly reduces beta amyloid plaques in the brain and improves cognition in a murine model of Alzheimer's Disease (AD). *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2016**, *118*, 579–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Yang, E.J.; Kim, H.; Choi, Y.; Kim, H.J.; Kim, J.H.; Yoon, J.; Seo, Y.S.; Kim, H.S. Modulation of Neuroinflammation by Low-Dose Radiation Therapy in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2021**, *111*, 658–670. [[CrossRef](#)]
100. Diatloff-Zito, C.; Deschavanne, P.J.; Loria, E.; Malaise, E.P.; Macieira-Coelho, A. Comparison between the radiosensitivity of human, mouse and chicken fibroblast-like cells using short-term endpoints. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1981**, *39*, 419–430. [[CrossRef](#)]
101. Parkinson, E.K.; Hume, W.J.; Potten, C.S. The radiosensitivity of cultured human and mouse keratinocytes. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1986**, *50*, 717–726. [[CrossRef](#)]
102. Cuttler, J.M.; Abdallah, E.; Goldberg, Y.; Al-Shamaa, S.; Symons, S.P.; Black, S.E.; Freedman, M. Low Doses of Ionizing Radiation as a Treatment for Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2021**, *80*, 1119–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Kim, S.; Nam, Y.; Kim, C.; Lee, H.; Hong, S.; Kim, H.S.; Shin, S.J.; Park, Y.H.; Mai, H.N.; Oh, S.M.; et al. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Low-Moderate Dose Ionizing Radiation in Models of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wilson, G.D.; Wilson, T.G.; Hanna, A.; Fontanesi, G.; Kulchyski, J.; Buelow, K.; Pruetz, B.L.; Michael, D.B.; Chinnaiyan, P.; Maddens, M.E.; et al. Low Dose Brain Irradiation Reduces Amyloid-beta and Tau in 3xTg-AD Mice. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2020**, *75*, 15–21. [[CrossRef](#)]
105. Ceyzeriat, K.; Tournier, B.B.; Millet, P.; Dipasquale, G.; Koutsouvelis, N.; Frisoni, G.B.; Garibotto, V.; Zilli, T. Low-Dose Radiation Therapy Reduces Amyloid Load in Young 3xTg-AD Mice. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2022**, *86*, 641–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wang, S.; Mims, P.N.; Roman, R.J.; Fan, F. Is beta-amyloid accumulation a cause or a consequence of Alzheimer's disease? *J. Alzheimer Park. Dement.* **2016**, *1*, 007.
107. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)]
108. Ferlazzo, M.L.; Bach-Tobdj, M.K.E.; Djerad, A.; Sonzogni, L.; Burlet, S.F.; Devic, C.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Djefal-Kerrar, A.; Foray, N. Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *55*, 4973–4983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Lartin, O.; Devic, C.; Vogin, G.; Pereira, S.; Foray, N. Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 1200–1211. [[CrossRef](#)]
110. Combemale, P.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Bencokova, Z.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Burlet, S.F.; Pinson, S.; Amini-Adle, M.; Al-Choboq, J.; et al. Individual Response to Radiation of Individuals with Neurofibromatosis Type I: Role of the ATM Protein and Influence of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *59*, 556–573. [[CrossRef](#)]

111. Soares, H.D.; Morgan, J.I.; McKinnon, P.J. Atm expression patterns suggest a contribution from the peripheral nervous system to the phenotype of ataxia-telangiectasia. *Neuroscience* **1998**, *86*, 1045–1054. [[CrossRef](#)]
112. Robbins, J.H.; Otsuka, F.; Tarone, R.E.; Polinsky, R.J.; Brumback, R.A.; Nee, L.E. Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Hypersensitivity to X rays in cultured cell lines. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1985**, *48*, 916–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Smith, T.A.; Itzhaki, R.F. Radiosensitivity of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Mutat. Res.* **1989**, *217*, 11–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Tobi, S.E.; Moquet, J.E.; Edwards, A.A.; Lloyd, D.C.; Itzhaki, R.F. Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *J. Med. Genet.* **1990**, *27*, 437–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



Original article

## Lung stereotactic radiation therapy: Intercomparison of irradiation devices in terms of outcome and predictive factors

### Radiothérapie stéréotaxique pulmonaire : résultats et facteurs pronostiques selon différentes modalités de traitement



E. Le Reun<sup>a,b</sup>, A. Casutt<sup>c,g</sup>, A. Durham<sup>d</sup>, H. Bouchaab<sup>e</sup>, E. Romano<sup>a</sup>, A. Lovis<sup>c,g</sup>, T. Krueger<sup>f</sup>, C. Von Garnier<sup>c,g</sup>, E.M. Özşahin<sup>a,1</sup>, R. Kinj<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Radiation Oncology, University Hospital Center of Lausanne (CHUV), rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland

<sup>b</sup> Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), U1296 Research Unit « Radiations: Defense, Health and Environment », centre Léon-Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France

<sup>c</sup> Division of Pulmonology, University Hospital Center of Lausanne (CHUV), rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland

<sup>d</sup> Department of Radiation Oncology, University Hospital of Genève (HUG), rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1205 Genève, Switzerland

<sup>e</sup> Department of Medical Oncology, University Hospital Center of Lausanne (CHUV), rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland

<sup>f</sup> Department of Thoracic Surgery, University Hospital Center of Lausanne (CHUV), rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland

<sup>g</sup> Lausanne University (UNIL), Lausanne, Switzerland

#### INFO ARTICLE

Historique de l'article :  
Reçu le 20 janvier 2022  
Accepté le 17 mai 2022

#### ABSTRACT

**Purpose.** – To compare three different radiotherapy devices able to perform pulmonary stereotactic radiotherapy: CyberKnife® (CK), Helical Tomotherapy® (HT), and volumetric modulated arc therapy (VMAT). This study aims to define the patients' outcome in terms of SBRT efficacy and toxicities depending of the device choice.

**Materials and methods.** – We retrospectively analyzed the clinical, radiological, and dosimetric data of patients treated with lung SBRT between 2016 and 2020 at Lausanne University Hospital, using the Chi<sup>2</sup> test for proportions, the *t*-test for means comparisons, the Kaplan-Meier method for survival, and the Log-rank test and Cox-regression for intergroups comparisons.

**Results.** – We identified 111 patients treated by either CK (59.9%), VMAT (38.0%), or HT (2.1%). Compared to other techniques, CK treated comparable gross tumor volume (GTV; 2.1 vs. 1.4 cm<sup>3</sup>, *P*=0.84) with smaller planning treatment volume (PTV; 12.3 vs. 21.9 cm<sup>3</sup>, *P*=0.013) and lower V5 (13.5 vs. 19.9 cm<sup>3</sup>, *P*=0.002). Local control rates at 2 years were not different whatever the irradiation device, respectively of 96.2% (range, 90.8–100) and 98.1% (range, 94.4–100), *P*=0.68. Toxicity incidence significantly increased with V5 value > 17.2% (56.0 vs. 77.4%, *P*=0.021).

**Conclusion.** – Compared to other SBRT techniques, CK treatments permitted to treat comparable GTV with reduced PTV and V5. Toxicity incidence was less frequent when reducing the V5. CK is particularly attractive in case of multiple courses of lung SBRT or lung reirradiation.

© 2022 L'Auteur(s). Publié par Elsevier Masson SAS au nom de Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Cet article est publié en Open Access sous licence CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### RÉSUMÉ

**Objectif de l'étude.** – Comparer trois différents appareils capables de délivrer une radiothérapie stéréotaxique pulmonaire : le CyberKnife® (CK), l'Helical Tomotherapy® (HT) et l'arc-thérapie volumétrique avec modulation d'intensité (VMAT). Cette étude visait à définir le devenir des patients après radiothérapie stéréotaxique pulmonaire, en termes d'efficacité et de toxicité, en fonction de la technique employée.

**Matériel et méthodes.** – Analyse rétrospective des données cliniques, radiologiques et dosimétriques des patients traités par irradiation stéréotaxique pulmonaire entre 2016 et 2020 au centre hospitalier universitaire de Lausanne, en utilisant le test Chi<sup>2</sup> pour les proportions, le test-*t* pour les comparaisons de moyennes, la méthode Kaplan-Meier pour la survie, le test du Log-rank et la régression de Cox pour les comparaisons entre groupes.

**Keywords :**  
CyberKnife®  
Lung tumor  
SBRT

**Mots clés :**  
CyberKnife®  
Tumeur pulmonaire  
Radiothérapie stéréotaxique

\* Corresponding author at: Department of Radiation Oncology, CHUV, Rue du Bugnon 46, 1011 Lausanne, Switzerland.

Adresse e-mail : [remy.kinj@chuv.ch](mailto:remy.kinj@chuv.ch) (R. Kinj).

<sup>1</sup> Equally contributed as senior author.

**Résultats.** – Cent onze patients ont été traités soit par CK (59,9 %), VMAT (38,0 %) ou HT (2,1 %). Comparé aux autres modalités, le CK a traité des volumes tumoraux macroscopiques (GTV) semblables (2,1 contre 1,4 cm<sup>3</sup>,  $p=0,84$ ) pour des volumes cibles prévisionnels (PTV) et des V5 (volumes recevant 5 Gy) moindres (respectivement : 12,3 contre 21,9 cm<sup>3</sup>,  $p=0,013$  ; et 13,5 contre 19,9 cm<sup>3</sup>,  $p=0,002$ ). Le taux de contrôle local à 2 ans était semblable indépendamment de l'appareil, respectivement de 96,2 % (90,8–100) et 98,1 % (94,4–100),  $p=0,68$ . L'incidence de la toxicité augmentait au-delà d'un V5 > 17,2 % (56,0 contre 77,4 %,  $p=0,021$ ).

**Conclusion.** – Comparé aux autres modalités de radiothérapie stéréotaxique, les traitements par CK ont permis, à GTV comparables, de réduire les PTV et V5. L'utilisation du CK semble donc particulièrement intéressante en cas de traitements multiples ou de réirradiation stéréotaxiques pulmonaires.

© 2022 L'Auteur(s). Publié par Elsevier Masson SAS au nom de Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Cet article est publié en Open Access sous licence CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Lung cancer is the most common cause of cancer-related death [1]. The introduction of pulmonary stereotactic body radiotherapy (SBRT) for early malignancies has been correlated to a reduction in the number of patients who remain untreated [2,3]. SBRT is recommended for early stage non-small-cell lung cancer (NSCLC), either in medically or surgically inoperable patients, or in well-selected operable patients, according to clinical guidelines [4–7]. In addition, various SBRT indications for lung oligometastases are well known [8].

The radiation oncology department of the Lausanne University Hospital (CHUV) gathers three different radiotherapy devices able to treat pulmonary lesions in SBRT conditions: Synergy® (Elekta, Sweden), Helical Tomotherapy® (Accuray, USA), and CyberKnife® (Accuray, USA).

Synergy® is a linear accelerator (linac) that uses volumetric modulated arc treatment (VMAT). The second device, termed Helical Tomotherapy® (HT), combines a megavoltage computed tomography (MV-CT) and a miniaturized linac to provide image-guided radiation therapy. During helical irradiation, the machine slowly spins around the patient while the table travels longitudinally. When using Synergy® and HT, an internal target volume is either determined, on a 4D CT or in obstructed inspiration owing to a respiratory servo system called Active Breath Control® (ABC). When using a 4D-CT for planning, the gross tumor volume (GTV) of each phase is combined into an internal target volume (ITV). This method is the most commonly used when irradiation is done using VMAT or HT. The planning target volume (PTV) corresponds to an ITV with a 3-mm margin in this configuration. The CyberKnife® (CK) is a linear accelerator with a head and a robotic arm, totally dedicated to SBRT. Several tracking systems allow for alternative irradiation treatments with this device:

- Synchrony®: respiratory monitoring with placement through fiducial markers;
- X-sight Spine®: monitoring of the spine associated with a ITV delineated based on a 4D CT-scanner;
- X-sight Lung® with monitoring of the tumor itself [9,10].

When using the CK tracking method, the GTV is immediately expanded by 3 mm to the PTV. As a result, CK may be able to lower GTV to PTV margins while avoiding ITV-related volume growth.

Within the same radiation oncology department, only a few institutions have different devices able to perform pulmonary SBRT. The aim of this study is to determine the patients' outcomes in terms of irradiation efficacy and toxicities after lung SBRT, according to the different SBRT techniques.

## 2. Methods

Between January 2016 and February 2020, we reviewed the clinical, radiological, and dosimetric data of consenting patients with primary lung tumors or pulmonary oligometastases treated by SBRT at CHUV. All patients were selected for SBRT after a multidisciplinary thoracic oncological tumor board discussion, and signed an informed consent form for irradiation. Patients having a lung tumor treated with a method other than SBRT, such as surgery or conventional radiotherapy, were not included.

Clinical data such as the patient's age, sex, WHO performance index, smoking status, comorbidities, previous medical history including previous irradiation or thoracic surgery, cancer histology, pulmonary location of the tumor (affected lobe, central or peripheral), and the reason for radio-oncological treatment rather than the surgical one, were recorded. We reported toxicity data following SBRT according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v 5.0 for respiratory, thoracic, and mediastinal disorders; including cough, productive cough, dyspnea, laryngeal mucositis, oropharyngeal pain, pneumonitis, pneumothorax, pulmonary edema, pulmonary fibrosis, pulmonary fistula, pulmonary hypertension, sore throat, or wheezing [11].

The fractionation schedule, GTV, PTV, PTV dose, dose received by the lungs, i.e., the mean lung dose (MLD), the percent of the volume of the lung receiving 5 Gy (V5) and 20 Gy (V20), and composite dosimetry in the event of multiple courses of irradiation were all part of the dosimetric data records.

Radiological data included tumor response after SBRT (stable disease, complete or partial response to treatment), and any recurrence (local, locoregional, or distant metastatic disease) were described. Local control was defined as the stability or reduction of the tumor volume without progression during the follow-up imaging.

Clinical and radiological data were extracted from the institutional clinical software Soarian® (Cerner, United States) and Archimède® (CHUV) software; dosimetric data were recorded from RayStation® (RaySearch Laboratories, Sweden) and VelocityTM (Varian Medical Systems, USA) radiotherapy software. Data were then anonymized by assigning to each patient a neutral identifier of 4 digits, and the study was registered on February 24th 2021, ID 2021-00267, with the authorization of the CER-VD ethics committee (Switzerland). Statistical analyses were performed using the JMP® 15 software. We analyzed descriptive data using the Chi-2 test for proportions and the T-test for mean comparisons. Survival data were analyzed by the Kaplan-Meier method, and comparisons between groups by the Log-rank test. Confidence intervals (CI) were computed from standard errors. If p-value was  $\leq 0.15$  in univariate analysis, the variable was tested in multivariate analysis through Cox-regression test.



**Table 1**  
Descriptive statistics for patients' demographics, treatment, and outcome.

<b>Patients' characteristics</b>	<i>n</i> = 111		
Age: median - minimum - maximum [years]	71.4	32.5	91.6
Gender	<i>n</i> = 111		
Male	73 (65.8%)		
Female	38 (34.2%)		
WHO performance status	<i>n</i> = 111		
0	34 (30.6%)		
1	58 (52.3%)		
2	17 (15.3%)		
3	1 (< 1%)		
4	1 (< 1%)		
Smoker	<i>n</i> = 111		
Yes	72 (64.9%)		
No	39 (35.1%)		
History of cancer	<i>n</i> = 111		
Yes	43 (38.7%)		
No	68 (61.3%)		
History of thoracic irradiation	<i>n</i> = 111		
No	85 (76.6%)		
Yes	26 (23.4%)		
One previous irradiation	23 (88.5%)		
Two previous irradiations	3 (11.5%)		
1st history	<i>n</i> = 26		
Total dose: median - minimum - maximum [Gy]	60	8	70
Dose/fraction: median - minimum - maximum [Gy]	2	1.8	30
2nd history	<i>n</i> = 3		
Total dose: median - minimum - maximum [Gy]	36	25	60
Dose/fraction: median - minimum - maximum [Gy]	6	5	12
History of thoracic surgery	<i>n</i> = 111		
No	53 (47.7%)		
Yes	58 (52.3%)		
Wedge resection only	13 (22.4%)		
Segmentectomy	5 (8.6%)		
Lobectomy	28 (48.3%)		
Bilobectomy	6 (10.3%)		
Pneumonectomy	4 (6.9%)		
Others	2 (3.5%)		
Reason for non-operability	<i>n</i> = 111		
Surgery refused by patient	5 (4.5%)		
Surgically inoperable	24 (21.6%)		
Medically inoperable	49 (44.2%)		
Systemic disease	33 (29.7%)		
Number of metastatic sites	<i>n</i> = 111		
1	31 (27.9%)		
2	21 (18.9%)		
≥ 3	2 (1.8%)		
<b>Tumor characteristics</b>	<i>n</i> = 111		
Primary or metastasis			
Primary tumor	57 (51.4%)		
Metastasis	54 (48.6%)		
Lung	22 (40.7%)		
Digestive	14 (25.9%)		
ENT	7 (13.0%)		
Melanoma	5 (9.3%)		
Pleura	1 (1.8%)		
Others	5 (9.3%)		
Tumor localization (lesions)	<i>n</i> = 142		
Left lung	64 (45.1%)		
Upper left lobe	32 (50.0%)		
Lower left lobe	32 (50.0%)		
Right lung	74 (52.1%)		
Upper lobe	35 (47.3%)		
Middle lobe	6 (8.1%)		
Lower lobe	29 (39.2%)		
Two lobes	4 (5.4%)		
Bilateral	4 (2.8%)		
Central	32 (22.6%)		
Peripheral	105 (73.9%)		
Central + peripheral	5 (3.5%)		

Table 1 (Continued)

<b>Histology</b>			
Histological proof	<i>n</i> = 111		
Yes	77 (69.4%)		
No	34 (30.6%)		
<b>Histological type</b>			
NSCLC	3 (2.7%)		
Adenocarcinoma	43 (38.7%)		
Squamous-cell carcinoma	30 (27.1%)		
Adenoidcystic carcinoma	3 (2.7%)		
Sarcoma	2 (1.8%)		
Melanoma	5 (4.5%)		
Hepatocellular carcinoma	1 (0.9%)		
Others	24 (21.6%)		
<b>TNM score at diagnosis</b>			
<b>Tumor classification (T)</b>			
TX	<i>n</i> = 111		
Tis	9 (8.1%)		
T1	1 (<1%)		
T2	51 (45.9%)		
T3	28 (25.2%)		
T4	11 (9.9%)		
<b>Lymph nodes (N)</b>			
NX	8 (7.2%)		
N0	75 (67.6%)		
N1	13 (11.7%)		
N2	11 (9.9%)		
N3	4 (3.6%)		
<b>Metastasis (M)</b>			
MX	8 (7.2%)		
M0	75 (67.6%)		
M1	28 (25.2%)		
<b>Treatment characteristics</b>			
<b>Radiotherapy technique</b>			
CyberKnife®	<i>n</i> = 142		
VMAT	85 (59.9%)		
Tomotherapy®	54 (38.0%)		
SBRT modality	3 (2.1%)		
ABC	5 (3.5%)		
Fiducials	73 (51.4%)		
ITV	48 (33.8%)		
Mid-ventilation	2 (1.4%)		
X-sight lung®	3 (2.1%)		
X-sight spine®	11 (7.8%)		
<b>Dosimetry characteristics</b>			
<b>PTV volume</b>			
Median - minimum - maximum [cm <sup>3</sup> ]	<i>n</i> = 133		
	8.1	1.3	190.4
<b>Dosimetry</b>			
Total dose: median - minimum - maximum [Gy]	<i>n</i> = 142		
Duration: median - minimum - maximum [days]	55	34	60
Number of fractions: median - minimum - maximum	11	1	25
	5	1	8
<b>Current treatment</b>			
MLD: median - minimum - maximum [Gy]	<i>n</i> = 130		
V5: median - minimum - maximum [%]	3.7	0.2	22.3
V20: median - minimum - maximum [%]	17.2	2.1	93.6
	2.4	0.2	17
<b>Cumulative dosimetry</b>			
Composite MLD: median - minimum - maximum [Gy]	<i>n</i> = 38		
Composite V5: median - minimum - maximum [%]	7.9	0.9	22.3
	37.9	4.29	93.6
<b>Outcome</b>			
<b>Toxicity</b>			
No	<i>n</i> = 111		
Yes	35 (31.5%)		
<b>Acute toxicity</b>			
No	76 (68.5%)		
Yes	48 (43.2%)		
Grade 1	63 (56.8%)		
Grade 2	50 (79.3%)		
Grade 3	11 (17.5%)		
	2 (3.2%)		
<b>Late toxicity</b>			
No	82 (73.9%)		
Yes	29 (26.1%)		
Grade 1	13 (44.8%)		
Grade 2	13 (44.8%)		
Grade 3	3 (10.4%)		

Table 1 (Continued)

Best local response	<i>n</i> = 142
Tumor progression	1 (0.7%)
Complete response	13 (9.2%)
Partial response	48 (33.8%)
Stable disease	76 (53.5%)
ND	4 (2.8%)
Recurrence	<i>n</i> = 111
No	69 (62.2%)
Yes	42 (37.8%)
Local recurrence	3 (7.1%)
Regional recurrence	5 (11.9%)
Distant metastasis	34 (81.0%)
Second primary	10 (9.0%)
Survival	<i>n</i> = 111
Alive	78 (70.3%)
Without disease	46 (59.0%)
With disease	32 (41.0%)
Dead	33 (29.7%)
Without disease	12 (36.4%)
With disease	21 (63.6%)

WHO: World Health Organization; ENT: ear-nose-throat; NSCLC: non-small cell lung cancer; TNM: tumor size (T), lymph nodes (N), metastasis (M); PTV: planning target volume; VMAT: volumetric modulated arc therapy; SBRT: stereotactic body radiation therapy; ABC: active breathing control; ITV: internal target volume; MLD: Mean Lung Dose; V5: percent lung receiving 5 Gy; V20: percent lung receiving 20 Gy; ND: not documented.

### 3. Results

#### 3.1. Patients' and treatment characteristics

We identified 111 patients, mostly smoker (64.9%) men (65.8%) in good condition (82.9% PS 0–1) with a median age of 71.4 years. Patients presenting primary pulmonary tumors (*n* = 57) and lung metastases (*n* = 54) were found in equal numbers. Patients, who were medically inoperable due to comorbidities, were the most common cause for not selecting for surgery, and instead choosing SBRT (44.2%). We treated 142 pulmonary lesions, the majority being peripheral tumors (73.9%). More than half of the patients had a history of thoracic surgery (52.3%), and about a quarter had a history of thoracic irradiation (23.4%). The prescribed dose ranged from 34–60 Gy over 1–8 fractions with a typical fractionation of 55 Gy in 5 fractions (66.7%), delivered by CK (59.9%), VMAT (38.0%), or HT (2.1%). A large majority of patients benefited from a tumor tracking through fiducials (51.4%), and many of others from an ITV Planification with 4D-CT (33.8%). The median MLD was 3.7 Gy, with a median V5 at 17.2%. In case of iterative irradiation, the median composite MLD and composite V5 reached 7.9 Gy and 37.9% respectively. Other patients and treatment characteristics are presented in Table 1. Population of patients and treatment characteristics depending on the device choice is described in Table 2.

#### 3.2. Local control

Local control (LC) could be achieved in 138 out of 142 lesions, and it was 96.8% (92.3–100%, CI 95%) at 2 years and 94.8% (90.3–100%, CI 95%) at 3 years. LC at 2 and 3 years significantly decreased with age, from 100% to 93.4% and 88.9%, respectively when patients were older than 71 years. (*P* = 0.035), as shown in Table 3. LC was not influenced by the other treatment characteristics: the choice of radiotherapy device, neither by the SBRT modality, nor by the dose/fractionation scheme. We observed 2 mediastinal relapses, corresponding to a loco-regional control rate of 96.2% at 1 year and 94.4% at 2 years, respectively.

#### 3.3. Survival

Median follow up was 28.7 months (22.7–35.6 months, CI 95%). Overall survival (OS) rates at 2 and 3 years were respectively 58.5% (CI 95%, 48.4–68.6%) and 35.7% (CI 95%, 25.2–45.9%), with no difference regarding both SBRT modalities. Metastasis-free survival

(MFS) and progression-free survival (PFS) significantly decreased in case of first recurrence at brain (13.5 vs. 5.5 months, *P* = 0.007 and 0.010, respectively). MFS and PFS were significantly longer when treated lesions were primary lung tumors compared to metastases, while median MFS was not reached and PFS nearly doubled. However this last factor was not confirmed after multivariate analysis. Median survival, significantly decreased in case of first metastatic relapse occurred before 13.1 months. Median OS was 37.8 months when first metastatic relapse occurred before 13.1 months compared to a median OS of 64.5 months when first metastatic relapse occurred after 13.1 months (*P* = 0.035), and remained predictive after Cox-regression (*P* < 0.0001). Other predictive factors for survival (OS, MFS, and PFS) are depicted in Table 4.

#### 3.4. Toxicity

Patients presented at least one toxicity in 68.5% of the cases, mainly grade 1 acute toxicity (*n* = 50). About three quarter of patients did not develop any late toxicity (73.9%), and three patients presented a late grade 3 toxicity (Table 1). Toxicity incidence significantly increased beyond the median V5 value of 17.2% (56.0 vs. 77.4%, *P* = 0.021). Other dosimetric parameters such as PTV or MLD did not have any impact respectively on acute (*P* = 0.21; *P* = 0.24) or late toxicity (*P* = 0.29; *P* = 0.95). Toxicity according to dosimetric parameters is described in Table 5.

#### 3.5. CK versus other treatment modalities

Population of patients and treatment characteristics depending on the device choice is described in Table 2. Patients' population was comparable depending on the device choice regarding age (*P* = 0.60), gender (*P* = 0.90), WHO performance status (*P* = 0.74), smoking status (*P* = 0.98), or TNM score (T, *P* = 0.66; N, *P* = 0.38; M, *P* = 0.10), primary versus metastasis treatment (*P* = 0.33), central versus peripheral location (*P* = 0.57), and prescribed dose (*P* = 0.81).

Dosimetric analysis revealed significant differences depending of the choice of the machine. GTV were comparable between CK and other modalities (2.1 vs. 1.4 cm<sup>3</sup>, *P* = 0.84). Nevertheless, treatments with CK resulted in significantly smaller PTV (12.3 vs. 21.9 cm<sup>3</sup>, *P* = 0.013), and were associated with significant dosimetric benefit with lower MLD (2.6 vs. 4.1 Gy, *P* < 0.001), lower V5 (13.5 vs. 19.9%, *P* = 0.002) and lower V20 (means at 2.3 vs. 5.4%, *P* < 0.001). This dosimetric benefit was not associated with a clear clinical benefit after SBRT.

**Table 2**  
CyberKnife® versus other techniques: outcome, dosimetry, and toxicity.

	CyberKnife®	VMAT or Tomotherapy®	P-value
<b>Patients characteristics</b>	<i>n</i> = 71	<i>n</i> = 40	
Mean age [years]	70.2	69.5	0.6
Gender			0.9
Male	47 (66.2%)	26 (65.0%)	
Female	24 (33.8%)	14 (35.0%)	
WHO performance status			0.74
0	20 (28.2%)	14 (35.0%)	
1	39 (54.9%)	19 (47.5%)	
2	10 (14.1%)	7 (17.5%)	
3	1 (1.4%)	0 (0%)	
4	1 (1.4%)	0 (0%)	
Smoker			0.98
Yes	46 (64.8%)	26 (65.0%)	
No	25 (35.2%)	14 (35.0%)	
Reason for non-operability			0.2
Surgery refused by patient	4 (5.6%)	1 (2.5%)	
Surgically inoperable	17 (24.0%)	7 (17.5%)	
Medically inoperable	26 (36.6%)	23 (57.5%)	
Systemic disease	24 (33.8%)	9 (22.5%)	
Histological proof			0.91
Yes	49 (69.0%)	28 (70.0%)	
No	22 (31.0%)	12 (30.0%)	
Primary or metastasis			0.33
Primary tumor	34 (47.9%)	23 (57.5%)	
Metastasis	37 (52.1%)	17 (42.5%)	
History of cancer			0.84
Yes	27 (38.0%)	16 (40.0%)	
No	44 (70.0%)	24 (60.0%)	
History of thoracic irradiation			0.74
No	53 (74.6%)	31 (77.5%)	
Yes	18 (25.4%)	9 (22.5%)	
Number of previous irradiations	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 8	<b>0.043*</b>
One	<b>17 (94.4%)</b>	<b>6 (75.0%)</b>	
Two	<b>1 (5.6%)</b>	<b>2 (25.0%)</b>	
Dose of previous irradiation			0.85
≤ 55 Gy	8 (44.4%)	3 (37.5%)	
> 55 Gy	10 (55.6%)	5 (62.5%)	
Dose/fraction			0.52
≤ 11 Gy	16 (88.9%)	6 (75.0%)	
> 11 Gy	2 (11.1%)	2 (25.0%)	
Number of metastatic sites	<i>n</i> = 35	<i>n</i> = 19	0.61
1	19 (54.3%)	12 (63.2%)	
2	14 (40.0%)	7 (36.8%)	
≥ 3	2 (5.7%)	0 (0%)	
<b>TNM score at diagnosis</b>	<i>n</i> = 68	<i>n</i> = 35	
Tumor size (T)			0.66
T1	36 (52.9%)	21 (60.0%)	
T2	15 (22.1%)	9 (25.7%)	
T3	8 (11.8%)	2 (5.7%)	
T4	9 (13.2%)	3 (8.6%)	
Lymph nodes (N)			0.38
N0	47 (69.1%)	29 (82.8%)	
N1	11 (16.2%)	3 (8.6%)	
N2	7 (10.3%)	2 (5.7%)	
N3	3 (4.4%)	1 (2.9%)	
Metastasis (M)			0.1
M0	46 (67.6%)	29 (82.8%)	
M1	22 (32.4%)	6 (17.2%)	
Anatomical location			0.57
Central	18 (21.2%)	14 (9.9%)	
Peripheral	63 (74.1%)	42 (29.6%)	
Central + peripheral	4 (4.7%)	1 (1.75%)	
<b>SBRT modality</b>	<i>n</i> = 85	<i>n</i> = 57	<b>&lt;0.0001*</b>
ABC	<b>0 (0%)</b>	<b>9 (15.8%)</b>	
Fiducials	<b>69 (81.2%)</b>	<b>0 (0.0%)</b>	
ITV	<b>0 (0%)</b>	<b>46 (80.7%)</b>	
Mid-ventilation	<b>0 (0%)</b>	<b>2 (3.5%)</b>	
X-sight lung®	<b>3 (3.5%)</b>	<b>0 (0%)</b>	
X-sight spine®	<b>13 (15.2%)</b>	<b>0 (0%)</b>	

Table 2 (Continued)

	CyberKnife®	VMAT or Tomotherapy®	P-value
<b>Dosimetric characteristics</b>	n = 81	n = 52	
Median prescribed dose [Gy]	55.0	55.0	0.81
Median number of fractions	5	5	0.11
Mean GTV volume [cm <sup>3</sup> ]	2.1	1.4	0.84
Mean PTV volume [cm <sup>3</sup> ]	<b>12.3</b>	<b>21.9</b>	<b>0.013*</b>
Mean GTV/PTV ratio	<b>2.9</b>	<b>4.8</b>	<b>0.0013*</b>
Mean MLD [Gy]	<b>2.6</b>	<b>4.1</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
Mean V5 [%]	<b>13.5</b>	<b>19.9</b>	<b>0.002*</b>
Mean V20 [%]	<b>2.3</b>	<b>5.4</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
Composite dosimetry	n = 19	n = 19	
Mean composite MLD [Gy]	7.8	7.5	0.849
Mean composite V5 [%]	40.4	35.9	0.513
<b>Survival</b>	n = 71	n = 40	
Median OS [months]	not reached	64.5	
Median MFS [months]	27.9	48.0	
Median PFS [months]	25.9	48.0	
<b>Local control</b>	n = 82	n = 56	0.68
2-year local control (%)	96.2 (95% CI=90.8–100)	98.2 (95% CI=94.4–100)	
3-year local control (%)	93.3 (95% CI=85.6–100)	98.2 (95% CI=94.4–100)	
<b>Best local response</b>	n = 83	n = 51	0.07
Tumor progression	1 (1.2%)	0 (0%)	
Complete response	6 (7.2%)	7 (13.7%)	
Partial response	26 (31.4%)	17 (33.3%)	
Stable disease	49 (59.0%)	22 (43.1%)	
ND	1 (1.2%)	5 (9.8%)	
<b>Recurrence</b>			
Local recurrence	n = 85	n = 57	
Yes	3 (3.5%)	1 (1.8%)	0.39
No	82 (96.5%)	56 (98.2%)	
Metastatic recurrence	n = 78	n = 55	
Yes	<b>43 (55.1%)</b>	<b>16 (29.1%)</b>	<b>0.0029*</b>
No	<b>35 (44.9%)</b>	<b>39 (70.9%)</b>	
<b>Toxicity</b>	n = 71	n = 40	
No (%)	29.6	35.0	0.56
Yes (%)	70.4	65.0	
Acute toxicity			0.79
No (%)	45.1	42.5	
Yes (%)	54.9	57.5	0.98
Grade 1 (%)	45.1	45.0	
Grade 2 (%)	9.9	10.0	0.51
Grade 3 (%)	1.3	2.5	
Late toxicity			0.26
No (%)	71.8	77.5	
Yes (%)	28.2	22.5	
Grade 1 (%)	15.5	5.0	
Grade 2 (%)	11.3	12.5	
Grade 3 (%)	1.4	5.0	

CK: CyberKnife®; VMAT: volumetric modulated arc therapy; CI: confidence interval; WHO: World Health Organization; TNM: tumor size (T), lymph nodes (N), metastasis (M); PTV: planning target volume; SBRT: stereotactic body radiation therapy; ABC: active breathing control; ITV: internal target volume; GTV: gross tumor volume; PTV: planning target volume; MLD: Mean lung dose; V5: percent lung receiving 5 Gy; V20: percent lung receiving 20 Gy; OS: overall survival; MFS: metastasis-free survival; PFS: progression-free survival; LC: local control; ND: not documented; \*: statistically significant.

LC rates were comparable between CK and other treatment modalities, being 96.2% (95% CI: 90.8–100) vs. 98.2% (95% CI: 94.4–100), at 2 years; and 93.3% (95% CI: 85.6–100) vs. 98.2% (95% CI: 94.4–100) at 3 years,  $P = 0.68$  (Fig. 1). Moreover, OS, PFS, and best local response were not influenced by the choice of the machine neither.

Whereas, LC rates were similar in the two groups, though the crude metastatic recurrence was more frequent in case of CK treatment (55.1%) than with VMAT (29.1%),  $P = 0.0029$ .

There were no significant differences in terms of incidence of toxicity ( $P = 0.56$ ), acute toxicity ( $P = 0.79$ ), late toxicity ( $P = 0.51$ ), or in terms of maximal grade of acute and late toxicity ( $P = 0.98$  and  $P = 0.26$ ). Indeed, acute toxicity occurred in 54.9% of the patients treated by CK, and in 57.5% of the patients treated by VMAT or other treatment modality ( $P = 0.79$ ). Most of patients did not present late toxicity, as no late toxicity was reported in 71.8% of patients after CK, and 77.5% of patients after VMAT or other treatment modality ( $P = 0.51$ ).

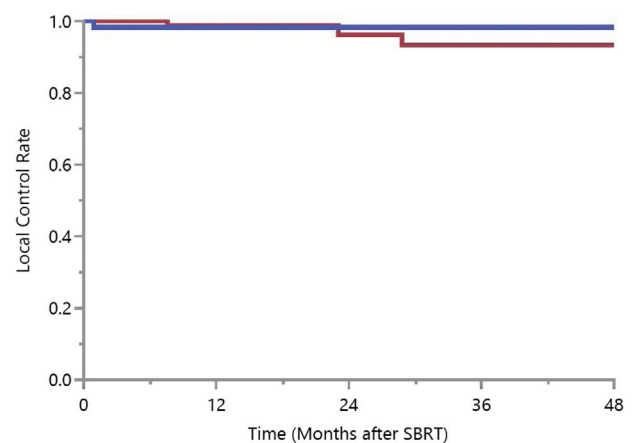


Fig. 1. Local control depending on the radiotherapy device..

**Table 3**  
Predictive factors for local control.

Variable	2-year local control (%)	95% CI	3-year local control (%)	95% CI	P-value	
All (n = 138)	96.8	92.3–100	94.8	90.3–100		
Age [years]						
≤ 71 (n = 66)	<b>100</b>	<b>100–100</b>	<b>100</b>	<b>100–100</b>	<b>0.035*</b>	
> 71 (n = 72)	<b>93.4</b>	<b>85.2–100</b>	<b>88.9</b>	<b>77.6–100</b>		
Gender						
Women (n = 45)	97.8	93.3–100	90.8	70.1–100	0.466	
Men (n = 93)	96.1	90.5–100	96.1	90.5–100		
Radiotherapy technique						
CyberKnife® (n = 82)	96.2	90.8–100	93.3	85.6–100	0.893	
VMAT (n = 53)	98.1	94.4–100	98.1	94.4–100		
Tomotherapy® (n = 3)	100	100–100	100	100–100	0.216	
SBRT modality						
ABC (n = 4)	80	44.9–100	80	44.9–100	0.99	
Fiducials (n = 70)	95.3	88.6–100	91.8	82.5–100		
ITV (n = 48)	100	100–100	100	100–100	0.553	
Mid-ventilation (n = 2)	100	100–100	100	100–100		
X-sight lung® (n = 3)	100	100–100	100	100–100	0.416	
X-sight spine® (n = 11)	100	100–100	100	100–100		
Dose [Gy]						
≤ 50 (n = 10)	100	100–100	100	100–100	0.99	
54 (n = 15)	100	100–100	80	44.9–100		
55 (n = 92)	96.2	90.8–100	96.2	90.8–100		
60 (n = 21)	95.5	86.8–100	95.5	86.8–100		
Treatment duration [days]						
≤ 11 (n = 48)	100	100–100	95.7	87.4–100	0.553	
> 11 (n = 90)	94.9	88.8–100	94.9	88.8–100		
History of cancer						
No (n = 80)	97.4	93.9–100	93.8	85.7–100	0.519	
Yes (n = 58)	96.2	88.8–100	96.2	88.8–100		
History of thoracic irradiation						
No (n = 90)	96.4	91.3–100	93.4	85.9–100	0.758	
Yes (n = 48)	97.9	93.9–100	97.9	93.9–100		
History of thoracic surgery						
No (n = 69)	96.8	92.4–100	96.8	92.4–100	0.944	
Yes (n = 69)	96.9	90.9–100	93.2	84.0–100		
Reason of non-operability:						
Surgery refused by patient (n = 5)	100	100–100	100	100–100	0.333	
Surgically non operable (n = 27)	100	81.4–100	77.1	48.8–100		
Medically non operable (n = 70)	98.6	95.9–100	98.6	95.9–100		
Systemic disease (n = 36)	96.8	90.6–100	96.8	90.6–100		
Primary tumor (n = 74)	95.9	89.9–100	92.3	83.4–100	0.416	
Metastasis (n = 64)	98.2	94.7–100	98.2	94.7–100		
Tumor localization						
Laterality						
Left lung (n = 61)	100	100–100	95.5	86.8–100	0.67	
Right lung (n = 73)	94.2	87.3–100	94.2	87.3–100		
Bilateral (n = 4)	100	100–100	100	100–100	0.443	
Central or peripheral						
Central (n = 32)	100	100–100	100	100–100	0.948	
Peripheral (n = 101)	95.5	90.1–100	92.6	85.0–100		
Central + peripheral (n = 5)	100	100–100	100	100–100		
Histology						
Histological proof						
No (n = 55)	96.2	88.8–100	96.2	88.8–100	0.519	
Yes (n = 83)	97.5	94.0–100	93.7	85.8–100		
Histological type						
NSCLC (n = 5)	83.3	53.5–100	83.3	53.5–100	0.837	
Adenocarcinoma (n = 46)	100	100–100	95	85.5–100		
Squamous cell (n = 35)	96.6	90.0–100	96.6	90.0–100		
Adenoid cystic carcinoma (n = 4)	100	100–100	100	100–100		
Melanoma (n = 5)	100	100–100	100	100–100		
Sarcoma (n = 2)	100	100–100	100	100–100		
Hepatocellular carcinoma (n = 1)	100	100–100	100	100–100		
Mesothelioma (n = 1)	100	100–100	100	100–100		
Nerves (n = 1)	100	100–100	100	100–100		
ND (n = 38)	92.9	79.4–100	92.9	79.4–100		
Number of metastatic sites						
0 (n = 1)	100	100–100	100	100–100		0.948
1 (n = 38)	97	91.2–100	97	91.2–100		
≥ 2 (n = 26)	100	100–100	100	100–100		
PTV volume [cm <sup>3</sup> ]						
≤ 8.1 (n = 65)	98	94.0–100	93.7	84.7–100	0.904	
> 8.1 (n = 64)	95.6	89.3–100	95.6	89.3–100		

CI: confidence interval; VMAT: volumetric modulated arc therapy; SBRT: stereotactic body radiation therapy; ABC: active breathing control; ITV: internal target volume; NSCLC: non-small cell lung cancer; ND: not documented; PTV: planning target volume.  
Missing values (n = 4).

**Table 4**  
Predictive factors for survival (overall survival [OS], metastasis-free survival [MFS], and progression-free survival [PFS]).

Variable	Median OS [months]	P-value (log-rank/ Cox regression)	Median MFS [months]	P-value (log-rank/ Cox regression)	Median PFS [months]	P-value (log-rank/ Cox regression)
Age [years]						
≤ 71 (n = 54)	64.5	0.95	<b>25.9</b>	<b>0.037*/NS</b>	<b>24.8</b>	<b>0.075/0.02</b>
> 71 (n = 57)	40.1		NR		NR	
Radiotherapy technique						
CyberKnife® (n = 71)	NR	0.34	27.9	0.33	25.9	0.18
Other (n = 40)	64.5		48		48	
Smoker:						
No (n = 39)	41.1	0.46	25.9	0.98	25.9	0.94
Yes (n = 72)	64.5		48		28.8	
History of thoracic irradiation:						
No (n = 84)	64.5	0.19/NS	45	0.83	68.9	0.76
Yes (n = 27)	29.6		28.4		48.7	
Reason of non-operability:						
Surgery refused (n = 5)	NR	0.82	NR	0.11/NS	NR	0.15/NS
Surgically inop (n = 24)	40.1		45		28.8	
Medically inop (n = 49)	NR		48		48	
Systemic disease (n = 33)	41.1		19.3		17.7	
MLD (Gy)						
≤ 3.7 (n = 52)	NR	0.15/NS	28.4	0.78	45	0.85
> 3.7 (n = 52)	41.1		48		20	
Number of metastatic sites:						
≤ 2 (n = 32)	31.3	0.753	24.8	0.097/NS	26.2	0.12/NS
> 2 (n = 23)	41.1		13.5		15.4	
Time before new metastasis [months]:						
≤ 13.1 (n = 19)	<b>37.8</b>	<b>0.035*/&lt;0.0001</b>	<b>5</b>	<b>&lt;0.001*/&lt;0.0001</b>	<b>4.9</b>	<b>&lt;0.001*/&lt;0.0001</b>
> 13.1 (n = 20)	<b>64.5</b>		<b>19.7</b>		<b>19.1</b>	
Metastatic recurrence:						
Brain (n = 6)	16.4	0.14/NS	<b>5.5</b>	<b>0.007*/NS</b>	<b>5.5</b>	<b>0.010*/0.04</b>
Other (n = 33)	64.5		<b>13.5</b>		<b>13.5</b>	
Primary tumor (n = 57)	64.5	0.13/NS	NR	<b>0.0034*/NS</b>	<b>48</b>	<b>0.006*/NS</b>
Metastasis (n = 54)	41.1		<b>24.8</b>		<b>20.4</b>	
V5 [%]:						
≤ 17.2 (n = 52)	64.5	0.78	45	0.91	27	0.59
> 17.2 (n = 52)	41.1	27.8	27.9		27.9	
Composite V5 [%]:						
≤ 37 (n = 9)	NR	0.28	24.8	0.29	25.7	0.64
> 37 (n = 10)	29.6		28.4		NR	
PTV volume [cm <sup>3</sup> ]:						
≤ 8.1 (n = 52)	NR	0.72	27.9	0.22	27	0.3
> 8.1 (n = 52)	41.1		48		48	

Variable	Relative Risk	SD	P-value
<b>OS</b>			
Time to first metastasis (< 13.1 months)	9.0	0.02	<b>&lt;0.0001</b>
<b>PFS</b>			
Age (median: >71)	1.2	0.37	<b>0.02</b>
Time to first metastasis (< 13.1 months)	2.6	0.06	<b>&lt;0.0001</b>
Metastatic recurrence at brain	1.2	0.6	<b>0.04</b>

OS: overall survival; MFS: metastasis-free survival; PFS: progression-free survival; Inop: inoperable; MLD: Mean lung dose; V5: percent lung receiving 5 Gy; PTV: planning target volume; NR: not reached; NS: not significant; SD: standard deviation.

#### 4. Discussion

This retrospective study describes factors associated with outcome, toxicity, and dosimetric parameters after lung SBRT, depending on the chosen delivery device.

Claude et al., prospectively analyzed the efficiency and toxicity of SBRT with CK compared to linear accelerator SBRT treatments for peripheral early stage NSCLC. A total of 68 patients were treated using a linac and 38 by means of CK. Authors have not described a significant difference in terms of local control depending on the employed device; 2-year local control rate was 97.0% (95% CI: 90.6–99.4%) with linear accelerator vs. 100% with CK, respectively ( $P=0.2839$ ). Neither, acute and late toxicity differed between the two modalities. However, we can notice that this study did not report the dosimetric parameters specific to the device choice. The paper of Claude et al., represents the unic project that has

confronted these two modalities; however, we can underline that the treatments were not performed in the same institution (multicentric study), and this fact could induce bias preventing direct comparison [12]. Even retrospective, our study represents the first one directly comparing the outcomes of patients receiving lung SBRT using three different modalities in the same radiotherapy department.

There are no strict criteria to choose *a priori* one technique rather than another. Our data revealed that dosimetric parameters such as lung doses are slightly reduced using CyberKnife without clinical benefit on toxicity. However, this dosimetric benefit must be balanced with general condition of the patient. Indeed, it is important to remember that the CK treatment duration is usually much longer than with VMAT or Tomotherapy [13]. Therefore, CK treatment might be more suitable for fit patients who are able to stay almost 40–60 minutes on the treatment couch.

**Table 5**  
Predictive factors for toxicity.

Variable	Toxicity (%)		P-value	Acute toxicity (%)		P-value	Late toxicity (%)		P-value
	Yes	No		Yes	No		Yes	No	
CyberKnife® (n=71)	70.4	29.6	0.56	54.9	45.1	0.79	28.2	71.8	0.51
Others (n=40)	65.0	35.0		57.5	42.5		22.5	77.5	
PTV volume [cm <sup>3</sup> ]:									
≤ 8.1 (n=52)	65.4	34.6	0.49	50.0	50.0	0.21	21.2	78.8	0.29
> 8.1 (n=52)	71.7	28.3		62.3	37.7		30.2	69.8	
V5 [%]:									
≤ 17.2 (n=52)	<b>56.0</b>	<b>44.0</b>	<b>0.021*</b>	46.0	54.0	0.06	22.0	78.0	0.60
> 17.2 (n=52)	<b>77.4</b>	<b>22.6</b>		64.2	35.8		26.4	73.6	
V20 [%]:									
≤ 2.4 (n=52)	60.4	39.6	0.14	50.9	49.1	0.36	18.9	81.1	0.19
> 2.4 (n=52)	74.0	26.0		60.0	40.0		30.0	70.0	
MLD [Gy]:									
≤ 3.7 (n=52)	61.5	38.5	0.21	50.0	50.0	0.24	25.0	75.0	0.95
> 3.7 (n=52)	73.1	26.9		61.5	38.5		25.0	75.0	
Cumulative MLD [Gy]:									
≤ 7.9 (n=12)	61.1	38.9	0.14	53.7	46.3	0.60	22.2	77.8	0.54
> 7.9 (n=8)	74.5	25.5		58.8	41.2		27.5	72.5	

PTV: planning target volume; V5: percent lung receiving 5 Gy; V20: percent lung receiving 20 Gy; MLD: Mean lung dose.

In our cohort, about 40% of patients were treated without histological proof of malignancy, and indication for irradiation was based on clinical and radiological criteria and this subset of patients presented similar outcomes compared to those with an histological proof of malignancy. In this context, several publications already showed comparable outcomes in patients after empiric SBRT, supporting the hypothesis that patients did have lung cancers [14–16].

Our results revealed excellent local control rates of 96.8% and 94.8% at 2 and 3 years after SBRT. This good loco-regional control rates were comparable to other studies of lung SBRT, and when compared to surgical outcomes after video-assisted thoracoscopic surgical lobectomy with mediastinal lymph node dissection [17]. We have not obtained a significant difference in terms of local control rate according to the SBRT technique choice. OS was significantly decreased in case of early metastatic recurrence (< 13.1 months), and PFS was significantly shorter when the first identified relapse site was the brain corresponding to the usual clinical factors and influencing the outcome in metastatic patients [18,19].

In our study, all patients that presented a local relapse were older than 71 years old. We identified that oldest patients presented a significantly lower local control compared to younger ones. A retrospective study of 219 patients also reported that age significantly influenced the local outcome after SBRT [20]. On the other hand, Watanabe, et al. depicted a preserved local control in a cohort of 64 patients older than 80 years old, which was 98.4% at 3 years [21].

Although the crude metastatic recurrence was more frequent in case of CK treatment than with VMAT, our study showed no difference in terms of OS, PFS, MFS, or LC between the two groups.

Our results also showed an acceptable rate of moderate-severe toxicity, which was comparable to the reported data in the literature [12,22,23]. More than half of our patients presented at least one toxicity (68.5%), and the most common form was grade 1 acute toxicity (79.3%). About three quarter (73.9%) of patients have not developed any late toxicity. Incidence of toxicity was comparable with the literature [24–27]. In our cohort, several dosimetric parameters were analyzed in order to identify predictive factors for toxicity such as PTV, V5, V20, MLD, and composite MLD. Compared to other techniques, and even though comparable GTV, CK treatments significantly permitted to decrease PTV, MLD, V5, and V20; which are dosimetric parameters usually found to be related with toxicity [28,29]. In our cohort, an increased V5 value correlated with a higher incidence of toxicity. Reducing the V5 value could be

particularly interesting in case of multiple courses of SBRT lung irradiations [29]. Hence, even if we not found a significant difference regarding toxicity in relation to the delivery device employed, it can be appropriate to favor CK irradiation in order to improve dosimetric parameters. Indeed, our study showed that cumulative MLD and cumulative V5 values are approximately doubled in case of multiple courses of lung irradiations, and techniques able to spare healthy lung reducing these dosimetric parameters could be preferred from the first lung SBRT. Moreover, CK could be particularly of interest in the event of local relapse re-irradiation, situation known to be at risk of high rates of severe toxicity [30,31].

## 5. Conclusion

Compared to other SBRT modalities, CK technique seems to be able to treat comparable GTV with reduced PTV, MLD, V5, and V20. The dosimetric benefit of CK irradiation was not associated with a clinical benefit, with comparable outcome in terms of control rates and toxicity. This retrospective study, suggests that toxicity incidence was less frequent when reducing the V5. Altogether, CK technique seems particularly suitable in fit patients with multiple courses of irradiations, or in case of re-irradiations.

## Funding

None.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Références

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-Adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2019;5:1749–68.
- [2] Palma D, Visser O, Lagerwaard FJ, Belderbos J, Slotman BJ, Senan S. Impact of introducing stereotactic lung radiotherapy for elderly patients with stage I non-small-cell lung cancer: a population-based time-trend analysis. *J Clin Oncol* 2010;28:5153–9.
- [3] Haasbeek CJA, Palma D, Visser O, Lagerwaard FJ, Slotman B, Senan S. Early-stage lung cancer in elderly patients: a population-based study of changes in treatment patterns and survival in the Netherlands. *Ann Oncol* 2012;23:2743–7.
- [4] Weder W, Moghanaki D, Stiles B, Siva S, Rocco G. The great debate flashes: surgery versus stereotactic body radiotherapy as the primary treatment of early-stage lung cancer. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 2018;53:295–305.



- [5] Guckenberger M, Andratschke N, Dieckmann K, Hoogeman MS, Hoyer M, Hurkmans C, et al. ESTRO ACROP consensus guideline on implementation and practice of stereotactic body radiotherapy for peripherally located early stage non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol* 2017;124:11–7.
- [6] Videtic GMM, Woody NM, Reddy CA, Stephans KL. Never too old: a single-institution experience of stereotactic body radiation therapy for patients 90 years and older with early stage lung cancer. *Pract Radiat Oncol* 2017;7:543–9.
- [7] Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28 [iv1–iv21].
- [8] Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie AV, Haasbeek C, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial. *Lancet* 2019;393:2051–8.
- [9] Bondiau PY, Bénézyer K, Beckendorf V, Peiffert D, Gérard JP, Mirabel X, et al. [CyberKnife robotic stereotactic radiotherapy: technical aspects and medical indications]. *Cancer Radiother* 2007;11:338–44.
- [10] Kilby W, Dooley JR, Kuduavalli G, Sayeh S, Maurer CR. The CyberKnife® robotic radiosurgery system in 2010. *Technol Cancer Res Treat* 2010;9:433–52.
- [11] National Cancer Institute: Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Events (CTCAE).v.5.0 [https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\_applications/ctc.htm#ctc\_50]. 2017 Nov 27:155–150.
- [12] Claude L, Morelle M, Mahé MA, Pasquier D, Boisselier P, Bondiau PY, et al. A comparison of two modalities of stereotactic body radiation therapy for peripheral early-stage non-small cell lung cancer: results of a prospective French study. *Br J Radiol* 2020;93 [20200256].
- [13] Dupic G, Huertas A, Nassef M, Cosset JM. [Place of Linacs in extracranial stereotactic radiotherapy: are they now equivalent to Cyberknife®?]. *Bull Cancer* 2022;109:338–45.
- [14] Berman AT, Jabbour SK, Vachani A, Robinson C, Choi JI, Mohindra P, et al. Empiric radiotherapy for lung cancer collaborative group multi-institutional evidence-based guidelines for the use of empiric stereotactic body radiation therapy for non-small cell lung cancer without pathologic confirmation. *Transl Lung Cancer Res* 2018;8:5–14.
- [15] Takeda A, Kunieda E, Sanuki N, Aoki Y, Oku Y, Handa H. Stereotactic body radiotherapy (SBRT) for solitary pulmonary nodules clinically diagnosed as lung cancer with no pathological confirmation: Comparison with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012;77:77–82.
- [16] Versteegen NE, Lagerwaard FJ, Haasbeek CJA, Slotman BJ, Senan S. Outcomes of stereotactic ablative radiotherapy following a clinical diagnosis of stage I NSCLC: Comparison with a contemporaneous cohort with pathologically proven disease. *Radiother Oncol* 2011;101:250–4.
- [17] Chang JY, Mehran RJ, Feng L, Verma V, Liao Z, Welsh JW, et al. STARS Lung Cancer Trials Group Stereotactic ablative radiotherapy for operable stage I non-small-cell lung cancer (revised STARS): long-term results of a single-arm, prospective trial with prespecified comparison to surgery. *Lancet Oncol* 2021;22:1448–57.
- [18] Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037–57.
- [19] Ren C, Ji T, Liu T, Dang J, Li G. The risk and predictors for severe radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with thoracic reirradiation. *Radiat Oncol* 2018;13:69.
- [20] Kessel KA, Grosser RCE, Kraus KM, Hoffmann H, Oechsner M, Combs SE. Stereotactic body radiotherapy (SBRT) in patients with lung metastases—prognostic factors and long-term survival using patient self-reported outcome (PRO). *BMC Cancer* 2020;20:442.
- [21] Watanabe K, Katsui K, Sugiyama S, Yoshio K, Kuroda M, Hiraki T, et al. Lung stereotactic body radiation therapy for elderly patients aged  $\geq 80$  years with pathologically proven early-stage non-small cell lung cancer: a retrospective cohort study. *Radiat Oncol* 2021;16:39.
- [22] Gutiérrez E, Sánchez I, Díaz O, Valles A, Balderrama R, Fuentes J, et al. Current evidence for stereotactic body radiotherapy in lung metastases. *Curr Oncol* 2021;28:2560–78.
- [23] Virbel G, Fèvre C, Le, Noël G, Antoni D. Stereotactic body radiotherapy for patients with lung oligometastatic disease: a five-year review. *Cancers (Basel)* 2021;13:3623.
- [24] Zhao J, Yorke ED, Li L, Kavanagh BD, Li XA, Das S, et al. Simple factors associated with radiation-induced lung toxicity after stereotactic body radiation therapy of the thorax: a pooled analysis of 88 studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016;95:1357–66.
- [25] Badra EV, Baumgartl M, Fabiano S, Jongen A, Guckenberger M. Stereotactic radiotherapy for early stage non-small cell lung cancer: current standards and ongoing research. *Transl Lung Cancer Res* 2021;10:1930–49.
- [26] Dupic G, Biau J, Molnar I, Chassin V, Dedieu V, Lapeyre M, et al. Significant correlation between overall survival and mean lung dose in lung stereotactic body radiation therapy (SBRT). *Front Oncol* 2020;10:1577.
- [27] Matsuo Y, Shibuya K, Nakamura M, Narabayashi M, Sakanaka K, Ueki N, et al. Dose-volume metrics associated with radiation pneumonitis after stereotactic body radiation therapy for lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83.
- [28] Saha A, Beasley M, Hatton N, Dickinson P, Franks K, Clarke K, et al. Clinical and dosimetric predictors of radiation pneumonitis in early-stage lung cancer treated with Stereotactic Ablative radiotherapy (SABR) – An analysis of UK's largest cohort of lung SABR patients. *Radiother Oncol* 2021;156:153–9.
- [29] Muller DA, Dutta SW, Aliotta E, Sanders JC, Wijesooriya K, Watkins WT, et al. Clinical outcomes and predictors of lung toxicity after multiple courses of lung stereotactic body radiotherapy for early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2021;22:234–41.
- [30] Kinj R, Casutt A, Bennassi A, Bouchaab H, Vallet V, Lovis A, et al. Stereotactic lung reirradiation for local relapse: a case series. *Clin Transl Radiat Oncol* 2021;28:85–7.
- [31] Kennedy WR, Gabani P, Nikitas J, Robinson CG, Bradley JD, Roach MC. Repeat stereotactic body radiation therapy (SBRT) for salvage of isolated local recurrence after definitive lung SBRT. *Radiother Oncol* 2020;142:230–5.

## Article

# Influence of the Hypersensitivity to Low Dose Phenomenon on the Tumor Response to Hypofractionated Stereotactic Body Radiation Therapy

Eymeric Le Reun <sup>1,2,†</sup>, Adeline Granzotto <sup>1,†</sup>, Adeline Pêtre <sup>1,3,†</sup>, Larry Bodgi <sup>4</sup> , Guillaume Beldjoudi <sup>3</sup> , Thomas Lacornerie <sup>5</sup>, Véronique Vallet <sup>2</sup>, Audrey Bouchet <sup>1</sup> , Joëlle Al-Choboq <sup>1</sup> , Michel Bourguignon <sup>1,6</sup>, Juliette Thariat <sup>7</sup>, Jean Bourhis <sup>2</sup>, Eric Lartigau <sup>5</sup> and Nicolas Foray <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> U1296 Unit, “Radiation: Defense, Health and Environment”, Centre Léon-Bérard, Inserm, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France; eymeric.le-reun@inserm.fr (E.L.R.); adeline.granzotto@inserm.fr (A.G.); adeline.petre@lyon.unicancer.fr (A.P.); audrey.bouchet@inserm.fr (A.B.); joelle.al-choboq@inserm.fr (J.A.-C.); michel.bourguignon@inserm.fr (M.B.)

<sup>2</sup> Service de Radio-Oncologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), 46 Rue du Bugnon, 1011 Lausanne, Switzerland; veronique.vallet@chuv.ch (V.V.); jean.bourhis@chuv.ch (J.B.)

<sup>3</sup> Département de Radiothérapie, Centre Léon-Bérard, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France; guillaume.beldjoudi@lyon.unicancer.fr

<sup>4</sup> Department of Radiation Oncology, American University of Beirut Medical Center, Riad El-Solh, Beirut 1107-2020, Lebanon; lb38@aub.edu.lb

<sup>5</sup> Département de Radiothérapie, Centre Oscar-Lambret, 3 Rue Frédéric Combemale, 59000 Lille, France; t-lacornerie@o-lambret.fr (T.L.); e-lartigau@o-lambret.fr (E.L.)

<sup>6</sup> Département de Biophysique et Médecine Nucléaire, Université Paris Saclay, Versailles St. Quentin en Yvelines, 78035 Versailles, France

<sup>7</sup> Département de Radiothérapie, Centre François-Baclesse, 3 Avenue du Général Harris, 14076 Caen, France; j.thariat@baclesse.unicancer.fr

\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-478782828

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Le Reun, E.; Granzotto, A.; Pêtre, A.; Bodgi, L.; Beldjoudi, G.; Lacornerie, T.; Vallet, V.; Bouchet, A.; Al-Choboq, J.; Bourguignon, M.; et al. Influence of the Hypersensitivity to Low Dose Phenomenon on the Tumor Response to Hypofractionated Stereotactic Body Radiation Therapy. *Cancers* **2023**, *15*, 3979. <https://doi.org/10.3390/cancers15153979>

Academic Editor: Franz Rödel

Received: 4 July 2023

Revised: 30 July 2023

Accepted: 3 August 2023

Published: 5 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** We demonstrated the possible occurrence of the hypersensitivity to low dose (HRS) phenomenon in SBRT modality in both tumor and healthy cells. In HRS-positive cells, the response to SBRT was found exacerbated. Notably, a subset of highly damaged cells can appear and increase the efficiency of the treatment. Hence, each SBRT session can be viewed as hyperfractionated dose delivery by means of hundreds of low dose minibeam. To determine the HRS status of tumors and healthy tissues appears to be useful to increase SBRT efficiency and decrease the risk of adverse reactions.

**Abstract:** Stereotactic body radiation therapy (SBRT) has made the hypofractionation of high doses delivered in a few sessions more acceptable. While the benefits of hypofractionated SBRT have been attributed to additional vascular, immune effects, or specific cell deaths, a radiobiological and mechanistic model is still needed. By considering each session of SBRT, the dose is divided into hundreds of minibeam delivering some fractions of Gy. In such a dose range, the hypersensitivity to low dose (HRS) phenomenon can occur. HRS produces a biological effect equivalent to that produced by a dose 5-to-10 times higher. To examine whether HRS could contribute to enhancing radiation effects under SBRT conditions, we exposed tumor cells of different HRS statuses to SBRT. Four human HRS-positive and two HRS-negative tumor cell lines were exposed to different dose delivery modes: a single dose of 0.2 Gy, 2 Gy, 10 × 0.2 Gy, and a single dose of 2 Gy using a non-coplanar isocentric minibeam irradiation mode were delivered. Anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence, assessing DNA double-strand breaks (DSB), was applied. In the HRS-positive cells, the DSB produced by 10 × 0.2 Gy and 2 Gy, delivered by tens of minibeam, appeared to be more severe, and they provided more highly damaged cells than in the HRS-negative cells, suggesting that more severe DSB are induced in the “SBRT modes” conditions when HRS occurs in tumor. Each SBRT session can be viewed as hyperfractionated dose delivery by means of hundreds of low dose minibeam. Under current SBRT conditions (i.e., low dose per minibeam and not using ultra-high dose-rate), the response of

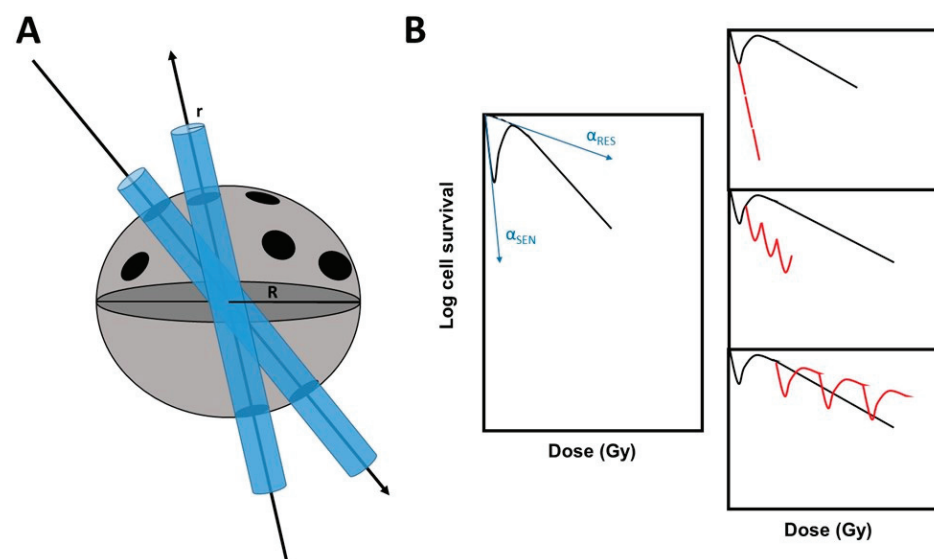
HRS-positive tumors to SBRT may be enhanced significantly. Interestingly, similar conclusions were reached with HRS-positive and HRS-negative untransformed fibroblast cell lines, suggesting that the HRS phenomenon may also impact the risk of post-RT tissue overreactions.

**Keywords:** low-dose; radiation therapy; SBRT; LDRT; radiosensitivity; cancer; HRS phenomenon

## 1. Introduction

Over the last decades, numerous technological advances in radiotherapy (RT)—notably, via stereotactic approaches—have permitted better tumor targeting and a drastic reduction in the volume of irradiated healthy tissues. This is, notably, the case of the stereotactic body radiation therapy (SBRT). Considering the great diversity of SBRT protocols, with various doses per fraction, number of fractions, dose gradient, etc., it appears more rigorous to describe SBRT from its physical features, i.e., as a RT modality delivering many non-coplanar minibeam converging to the tumor with sub-millimetric accuracy, as defined by the International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) [1–6]. Particularly, hypofractionated SBRT has been shown to improve anti-tumor efficiency and decrease the volume of irradiated healthy tissues for numerous tumor indications, including spine metastasis [7–9], prostate cancer [10], liver metastasis [11], as well as lung carcinoma and metastasis [7,12,13].

In stereotactic approaches, a precise tumor target is reached in each session by hundreds of minibeam delivering subfractions of Gy [14]. For example, during one SBRT session, the targeted tumor may be exposed to a hyperfractionation of low doses of the order of cGy. Furthermore, some minibeam may overlap in the same regions of the targeted tumor; hence, in a given tumor region, a session of SBRT results in some repeated low doses that are separated by some seconds to some minutes (Figure 1).



**Figure 1.** SBRT and the hypersensitivity to low doses phenomenon (HRS). (A) A schematic view of SBRT centripetal minibeam crossing a spherical tumor. (B) On the left, there is a representative example of a survival curve showing HRS phenomenon. The HRS parameters defined in Material and Methods are indicated. On the right, the survival effect of repeated low doses in an HRS-positive cell at different doses is shown. Red lines indicate the expected fractionation effect.

Interestingly, at the ranges of doses and dose-rates involved during an SBRT session, the hypersensitivity to low dose (HRS) phenomenon can occur and result in enhancing the effect of the low dose to an effect that is equivalent to a dose 5 to 10 times greater [15–17].

Any HRS-positive tumor treated by SBRT could, therefore, elicit a considerable dose enhancement effect caused by HRS. (Figure 1). At high dose-rate (some Gy/min), the maximal HRS effect generally ranges from 0.1 to 0.8 Gy. However, the dose at which the maximal HRS effect occurs has been shown to decrease with dose-rate reaching a maximal HRS effect in the mGy to cGy range [18]. By using unrepaired DSB as an endpoint, such dose enhancement may be quantified after one single SBRT session.

The present study aims to investigate the potential influence of the HRS phenomenon in the response of tumor and normal cells exposed to SBRT, as defined above. In order to verify such a hypothesis, four HRS-negative and two HRS-positive human tumor cell lines were exposed to a single dose of 0.2 Gy, 2 Gy, 10 × 0.2 Gy, and a single dose of 2 Gy using a non-coplanar isocentric minibeams irradiation mode at Centre Léon-Bérard (CLB), Lyon, France and at Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland. There were also one HRS-negative and one HRS-positive human untransformed fibroblast cell lines used to evaluate the influence of the HRS status on the response of healthy tissues to SBRT. The immunofluorescence against the phosphorylated forms of the variant X of the H2A histone ( $\gamma$ H2AX), a current biomarker of DSB recognized by the non-homologous end-joining (NHEJ), the most predominant DSB repair pathway in mammals [19,20], was applied to each condition to investigate the DSB repair and signaling response.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Lines

There were four HRS-positive and two HRS-negative commercial human tumor cell lines used in this study. Their major biological and radiobiological features were detailed in Table 1. All the experiments with tumor cell lines were performed in the log phase of growth with similar relative distributions in the cell cycle phases (70–80% in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; 10–15% in S and 10–20% in G<sub>2</sub>/M) [21]. In addition, to evaluate the influence of the HRS status on the response of healthy tissues to SBRT, one HRS-negative (AG1521) and one HRS-positive (13HNG) human untransformed fibroblast cell line were irradiated in the same conditions as those used for tumor, to the notable exception that they were irradiated in plateau phase of growth [22]. While the AG1521 fibroblast cell line is provided from a commercial cell repository (Table 1), the 13HNG cell line belongs to the COPERNIC collection (N.F.'s lab), which has been abundantly documented and composed of radioresistant and radiosensitive fibroblast cell lines derived from RT-treated patients. The COPERNIC radiobiological database is protected under the reference IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300. All sampling protocols of the COPERNIC collection were approved by the national ethical committee in agreement with the current national regulations. The resulting cells were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437, and DC2020-3957 to the Ministry of Research. All the cells used in this study were routinely cultured with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), which was supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin, and streptomycin.

**Table 1.** Biological features of the tumor and fibroblast cell lines used in this study.

Cell Line	Origin		HRS Status
HT29	Grade II colon adenocarcinoma isolated from a primary tumor from a white Caucasian female patient	#HTB-38, ATCC <sup>a</sup>	+
A549	lung carcinoma from a white Caucasian male patient	#CCL-185, ATCC <sup>a</sup>	+
U373 MG	glioblastoma astrocytoma from a malignant tumor	#08061901, ECACC <sup>b</sup>	–
U87 MG	from malignant glioma from a male patient	#HTB-14, ATCC <sup>a</sup>	+

Table 1. Cont.

Cell Line	Origin		HRS Status
LN229	from the right frontal parieto-occipital cortex of a white female patient with glioblastoma.	#CRL-2611, ATCC <sup>a</sup>	+
SNU475	from an hepatocellular carcinoma	#CRL-2236 ATCC <sup>a</sup>	–
AG1521	Skin (foreskin) fibroblast from a foreskin of a 3 day child	#AG01521, Coriell Institute Repository <sup>c</sup>	–
13HNG	Skin fibroblast from a cancer patient showing adverse tissue after radiotherapy	COPERNIC Collection	+

<sup>a</sup> American Type Culture Collection (ATCC), (Manassas, VA, USA); <sup>b</sup> European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Health Security Agency, (Salisbury, UK); <sup>c</sup> Coriell Institute Repository (Camden, NJ, USA). + and – mean HRS-positive and -negative status, respectively.

## 2.2. Irradiation

Irradiations simulating a hyperfractionated RT were performed with a 6 MV X-rays medical irradiator (SL 15 Philips) (dose-rate: 4 Gy.min<sup>-1</sup>) at Centre Léon-Bérard (Lyon, France) [23]. In all the experiments, a dose of 2 Gy was chosen as reference since it simulates a current dose per RT session. Cells in Petri dishes were exposed in a static irradiation described elsewhere [23]. Dosimetry was certified by radiophysicists of the Centre Léon-Bérard. SBRT Irradiations were performed with a CyberKnife<sup>TM</sup> treatment unit (Accuray Inc, Sunnyvale, CA, USA) at Centre Léon Bérard (Lyon, France) or at CHUV (Lausanne, Switzerland) [24]. First, cells in Petri dishes were exposed with static irradiation: dishes were positioned on the floor on 10 cm of water equivalent plates, for backscattering purposes, and under 5 cm of water equivalent plates. A fixed collimator of 60 mm was used. In these conditions, dose-rate to the cells was estimated to about 1.5 Gy.min<sup>-1</sup>. Cells were irradiated by considering three schemes: 2 Gy delivered in one time (“2 Gy”), 0.2 Gy delivered in one time (“0.2 Gy”), and 2 Gy delivered in 10 subfractions of 0.2 Gy, with a 2 min time interruption between each fraction, leading to a planned delivery time of about 20 min (“10 × 0.2 Gy”). A second setup was considered with a CyberKnife<sup>TM</sup> treatment unit: Petri dishes were positioned inside a homemade phantom containing fiducials that could be seen by the CyberKnife<sup>TM</sup> system, and a CT scan was performed. Multiplan<sup>TM</sup> (Accuray Inc., Sunnyvale, CA, USA) treatment planning system was used to create a clinical plan, and the fixed 20 mm, 35 mm, and 50 mm collimators were chosen. A homogeneous dose of 2 Gy was planned for the target volume, containing the Petri dishes plus isotropic extension margins, of 5 mm to account for setup uncertainties. The treatment consisted of 82 minibeam, including 8, 71, and 3 minibeam provided by fixed 20, 35, and 50 mm collimators, respectively. The planned delivery time was about 20 min. It will be further referred to, in this paper, as the (“2 Gy Cyber”) condition.

## 2.3. Cell Survival

Standard clonogenic assays were used for the assessment of intrinsic radiosensitivity, as previously described [25,26]. For HRS-negative cells, the linear-quadratic (LQ) model describes the cell survival  $S$  as a function of dose  $D$ , as follows:

$$S(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (1)$$

in which  $\alpha$  and  $\beta$  are adjustable parameters to be determined.

For HRS-positive cells, the induced repair model describes the cell survival  $S$  as a function of dose  $D$ , similar to the LQ model, but by integrating the HRS phenomenon with the following modifications on the  $\alpha$  parameter, by defining the HRS variant LQ model as follows:

$$S(D) = \exp(-\alpha_{\text{res}} (1 + g \exp(-D/D_c))D - \beta D^2) \quad (2)$$

in which  $D_c$  is an adjustable parameter and  $g$  is the amount by which  $\alpha$ , at the very low doses ( $\alpha_{\text{sen}}$ ), is larger than  $\alpha$  at high doses ( $\alpha_{\text{res}}$ ). Hence,  $\alpha_{\text{sen}} = \alpha_{\text{res}} (1 + g)$  for the hyperradiosensitive cells [27] (Figure 1). The HRS/IRR ratio can also be used to quantify the extent of the HRS phenomenon. It is defined as the ratio of high and low doses, providing the lowest survival values at low doses and corresponding to the maximal HRS effect.

#### 2.4. Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol and foci scoring were described elsewhere [23]. Briefly, cells were fixed in 4% (*w/v*) paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature, and they were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4 °C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37 °C, respectively. Anti- $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> antibody (#05-636; Merck Millipore, Burlington, VT, USA) was used at a 1:800 ratio. Anti-mouse fluorescein (FITC) secondary antibody was used at a 1:100 ratio. Slides were mounted and counterstained in 4',6' Diamidino-2-Phenyl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys, Paris, France), and nuclei were examined with a BX51 Olympus fluorescence microscope. For each of the three independent replicates, 100 nuclei were analyzed. The foci scoring procedure applied here has received the certification agreement of CE mark and ISO-13485 quality management system norms. Our foci scoring procedure also developed some features that are protected in the frame of the patents (FR3017625 A1 and FR3045071 A1).

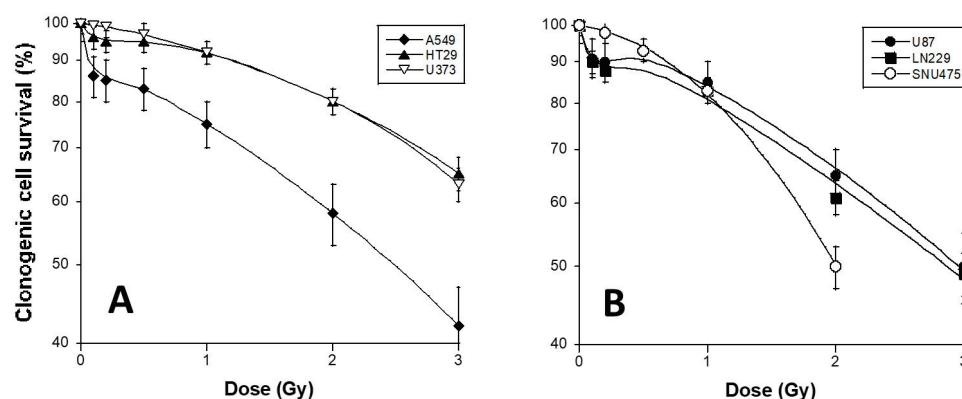
#### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA), Graphpad Prism (San Diego, CA, USA), and MATLAB R2020B (Math-Work, Natick, MA, USA). Each experiment is the result of three independent replicates, so the mean is given with the standard error of the mean (SEM).

### 3. Results

#### 3.1. HRS Status of the 6 Tumor Cell Lines Used in This Study

Using a standard orthovoltage irradiator, delivering X-rays at high dose-rate, clonogenic cell survival assays were applied to the HT29, A549, U373, U87, LN229, and SNU475 cell lines. With regard to cell survival, while the U373 and SNU475 cells were found to be HRS-negative by obeying the classical LQ model data fitting, the HT29, A549, U87, and LN229 cells showed a specific hyperradiosensitivity in the range of 0.1 to 0.5 Gy, and they obeyed the HRS variant LQ model (Figure 2; Table 2). It is noteworthy that the surviving fractions, at 2 Gy (SF2) of the HRS-positive LN229 and the HRS-negative U373 cells, were not significantly different ( $61 \pm 3\%$  and  $58 \pm 6\%$ , respectively;  $p > 0.8$ ), while the SF2 values of the LN229 (HRS-positive) and the A549 (HRS-positive) were significantly different ( $61 \pm 3\%$  and  $80 \pm 4\%$ , respectively;  $p < 0.001$ ). These findings suggest that the extent of HRS phenomenon may be observed independently of the SF2 value. A similar conclusion can be reached with the cell cycle since all the cell lines have been irradiated in similar distributions of cell cycle phases. Our results were found to be in agreement with literature data [28–30] (Figure 2).



**Figure 2.** Clonogenic cell survival of the 6 tumor cell lines used in this study. Cell survival data were plotted as a function of X-ray dose delivered at high dose rate (4 Gy/min) by a standard orthovoltage irradiator. Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM. Survival data were fitted to the LQ model and HRS LQ variant model. The HRS-positive cell lines are represented by closed symbols, while the HRS-negative cell lines are represented by open symbols. The (A) panel represents the A549, HT29, and U373 data and the (B) panel represents the U87, LN229, and SNU475 data.

**Table 2.** Numerical values of the adjustable parameters defining the variant LQ model for the tumor cell lines used here \*.

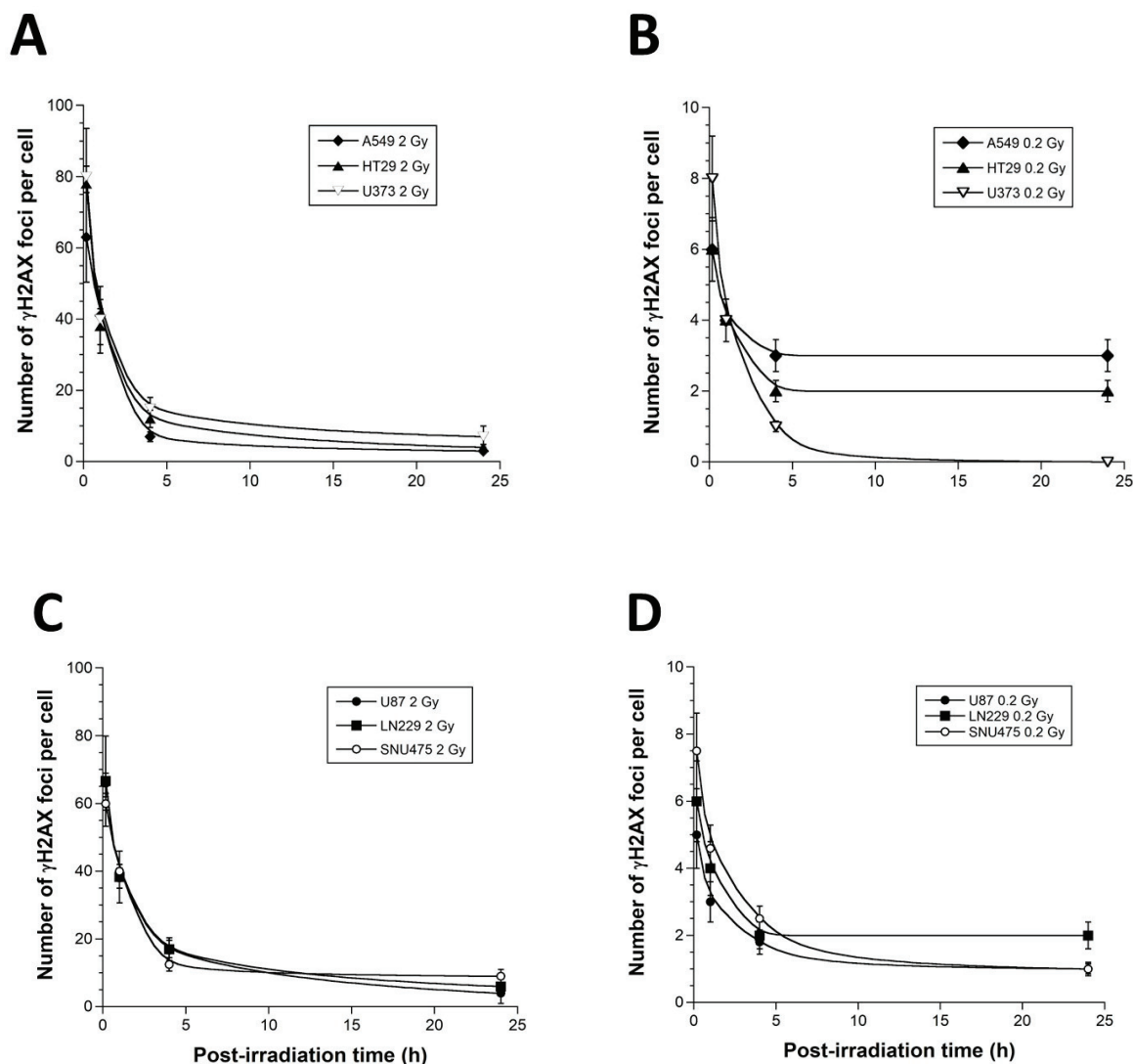
Cell Lines	HRS Status	$\alpha_{\text{res}}$ (Gy <sup>-1</sup> )	g	Dc (Gy)	HRS/IRR Ratio	$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	SF2 (%)
U373	–	0.05	0	NA	1	0.029	58 $\pm$ 6
SNU475	–	0.05	0	NA	1	0.14	50 $\pm$ 4
A549	+	0.273	8.11	0.17	4.5	0.0003	80 $\pm$ 4
HT29	+	0.001	12.63	0.15	6	0.003	80 $\pm$ 6
U87	+	0.14	12.05	0.13	3.75	0.03	65 $\pm$ 6
LN229	+	0.19	7.03	0.15	7.5	0.016	61 $\pm$ 3

\* Survival data shown in Figure 2 were fitted to  $S(D) = \exp(-\alpha_{\text{res}}(1 + g \exp(-D/D_c))D - \beta D^2)$  (Formula (2)). It is noteworthy that all the data fit provided correlation coefficients larger than 0.98; + and – mean HRS-positive and -negative status, respectively; NA: non applicable.

### 3.2. $\gamma$ H2AX Foci Kinetics of the 6 Tumor Cell Lines Used in This Study

The formation of nuclear  $\gamma$ H2AX foci reveals the DSB, which is recognized by the non-homologous end-joining pathway (NHEJ), the most predominant DSB repair and signaling in mammals [20]. The early (10 min)  $\gamma$ H2AX foci document the recognition step of the DSB managed by NHEJ, while the residual (24 h)  $\gamma$ H2AX foci reflect the DSB repair step [20]. After 2 Gy, the anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence revealed a maximal number of  $\gamma$ H2AX foci reached at 10 min post-irradiation and corresponding to 80  $\pm$  5 and 78  $\pm$  4  $\gamma$ H2AX foci in the U373 and the HT29 cells ( $p > 0.2$ ), respectively. Conversely, in the A549 cells, this number was found to be significantly lower (65  $\pm$  4  $\gamma$ H2AX foci;  $p < 0.005$ ), suggesting an impaired DSB recognition, which was in agreement with literature [20] (Figure 3). At 24 h after 2 Gy, the amounts of residual  $\gamma$ H2AX foci in the three cell lines tested were found to be similar ( $p > 0.2$ ), suggesting that, at 2 Gy, (1) the DSB recognized by H2AX phosphorylation are repaired similarly, and (2) the differences between cell survival (SF2) values are likely due to DSB that are not recognized by NHEJ and not revealed by  $\gamma$ H2AX foci [17] (Figure 3). After a single dose of 0.2 Gy, the number of  $\gamma$ H2AX foci were about 10 times lower for all the cells. However, the HRS-positive cells elicited a lower number of  $\gamma$ H2AX foci, assessed 10 min post-irradiation, than the HRS-negative cells ( $p < 0.05$ ), suggesting a DSB recognition impairment at 0.2 Gy. Furthermore, the HRS-positive cells elicited a higher number of  $\gamma$ H2AX foci 24 h post-irradiation than the HRS-negative cells ( $p > 0.001$ ), suggesting a slower DSB repair (Figure 3). Altogether, these findings suggest that, at 0.2 Gy, unlike the HRS-negative U373 cells, the HRS-positive HT29 and A549 cells showed a lack of DSB recognition by NHEJ pathway and a larger amount of unrepaired

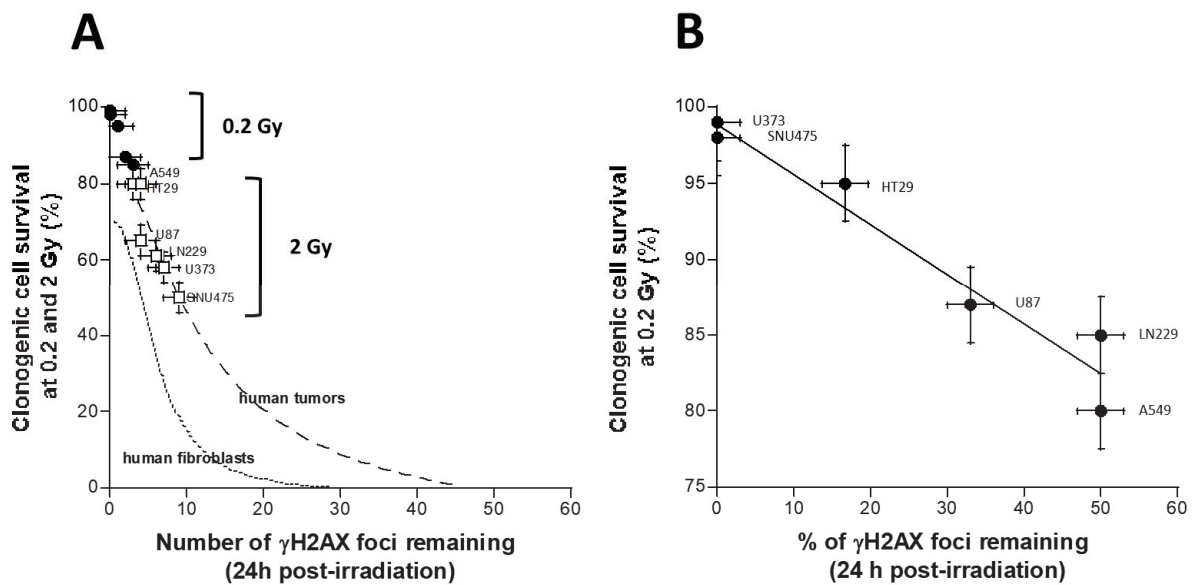
DSB, which documents the HRS phenomenon (Figure 3). Similar conclusions were reached with the HRS-positive U87 and LN229 cells and the HRS-negative SNU475 cells.



**Figure 3.** Radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci kinetics of the 6 tumor cell lines used in this study. The  $\gamma$ H2AX foci data were expressed as a number of  $\gamma$ H2AX foci per cell, as a function of post-irradiation time, after a dose of 2 Gy (A,C) and 0.2 Gy (B,D) X-ray delivered at high dose rate (4 Gy/min) by a standard orthovoltage irradiator. Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM.

Among the most current questions with regard the relevance of the HRS phenomenon is how a low dose, such as 0.2 Gy, can provide a similar lethal effect to higher doses such as 2 Gy. In fact, the link between unrecognized/unrepaired DSB and cell survival is now very clearly documented [20]. Literature data converge to the conclusion that one to two unrepaired DSB is a lethal event for human fibroblasts [31], and the same link is true about two to three unrepaired DSB for human tumors since tumors may tolerate more unrepaired DSB than healthy tissues [14,20,32]. Furthermore, we have already shown that HRS phenomenon results in the lack of recognition and repair of DSB by the NHEJ pathway [19,20]. Hence, in order to consolidate the relevance of our data with regard to these two features, we have plotted the number of residual  $\gamma$ H2AX foci with the corresponding cell survival data at 2 Gy (SF2) and 0.2 Gy (SF0.2) (Figure 4).





**Figure 4.** Relationships between the cell survival and the  $\gamma$ H2AX data. **A.** The survival data assessed at 0.2 (SF0.2) and 2 Gy (SF2), shown in Figure 2, were plotted against the corresponding  $\gamma$ H2AX data assessed at 24 h post-irradiation, shown in Figure 3, and obtained from the indicated human tumor cell lines. Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM. The dashed and the dotted lines represent the links between the SF2 and the number of residual  $\gamma$ H2AX foci obtained from 40 human tumor cell lines described in [32], as well as 200 human fibroblast cell lines described in [20]. **(B)** The survival data assessed at 0.2 (SF0.2), shown in panel (A), were plotted against the corresponding percentage of  $\gamma$ H2AX data assessed at 24 h post-irradiation (24 h data divided by 10 min data, shown in Figure 3, and obtained from the indicated human tumor cell lines). Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM. The line represents the formula  $y = 98.8 - 0.32x$  ( $r = 0.97$ ).

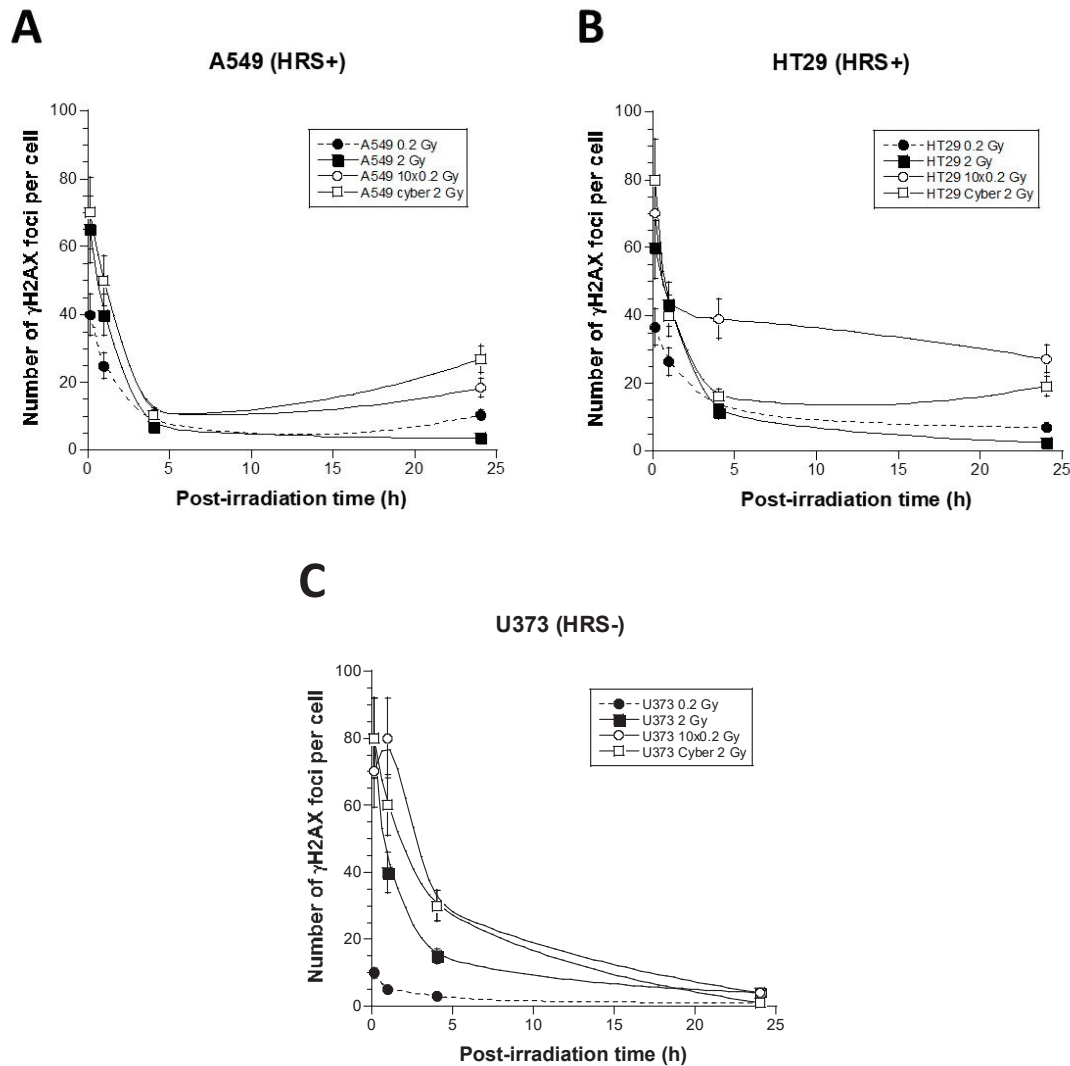
The relationship between the SF2 data, shown in Figure 2, and the corresponding  $\gamma$ H2AX foci assessed at 24 h post-irradiation, shown in Figure 3, was found to be in agreement with the link between SF2 and the number of unrepaired DSB reflected by the  $\gamma$ H2AX foci described in [32] (Figure 4A). It is also noteworthy that data obtained with a dose of 0.2 Gy obeyed the same relationship (Figure 4A), supporting, again, that a very small number of unrepaired DSB can lead to cellular death. Lastly, the clonogenic cell survival at 0.2 Gy appeared to be inversely proportional to the percentage of DSB recognized and repaired by the NHEJ (Figure 4B). The formula deduced from the data fits suggested that cell survival decreased by 1% each time the percentage of DSB recognized and repaired by NHEJ decreased by one-third (Figure 4B).

### 3.3. Molecular Response to SBRT of the 6 Tumor Cell Lines Used in This Study

In order to further examine the potential impact of the HRS status in the response to SBRT, we applied 2 and 0.2 Gy delivered at one time, 2 Gy delivered in 10 subfractions of 0.2 Gy, and 2 Gy delivered in CyberKnife conditions, with minibeam to the 6 tumor cell lines. The first series was performed with a CyberKnife irradiator of CLB (Lyon, France) with the HT29, A549, and U373 cells. The second parallel series was performed in the same conditions with a CyberKnife irradiator of the CHUV (Lausanne, France).

The  $\gamma$ H2AX foci kinetics after the “2 Gy” condition were not found to be significantly different from those obtained with an orthovoltage X-ray irradiator ( $p > 0.2$ ) (Figure 4). After the “0.2 Gy” condition, in the two HRS-positive cells, the number of  $\gamma$ H2AX foci was found to be lower at 10 min and higher at 24 h post-irradiation than in the HRS-negative cells ( $p < 0.01$ ) (Figure 5). Interestingly, the “10  $\times$  0.2 Gy” condition resulted in a number of early  $\gamma$ H2AX foci, assessed 10 min post-irradiation, similar to that assessed in the “2 Gy” condition ( $p > 0.4$ ) (Figure 5). At 24 h post-irradiation, the “10  $\times$  0.2 Gy” condition resulted

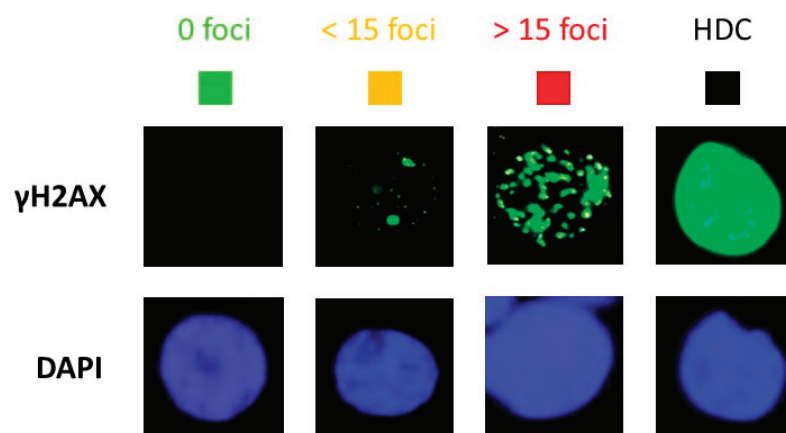
in increasing the amount of residual  $\gamma$ H2AX foci reflecting unrepaired DSB in the two HRS-positive cells by comparison with the “2 Gy” condition ( $p < 0.02$ ). Conversely, the “ $10 \times 0.2$  Gy” condition did not significantly change the number of residual  $\gamma$ H2AX foci in the HRS-negative cells ( $p > 0.2$ ). These findings suggest that the severity of DSB only increases in HRS-positive cells (Figure 5). The “2 Gy Cyber” condition was found to amplify the differences already noticed with the “0.2 Gy” condition ( $p < 0.02$ ) again. The “2 Gy Cyber” and “ $10 \times 0.2$  Gy” conditions showed the most severe DSB and the largest differences between the HRS-negative and positive cells, (Figure 5). Similar conclusions were reached with the U87, LN229, and SNU475 cell lines.



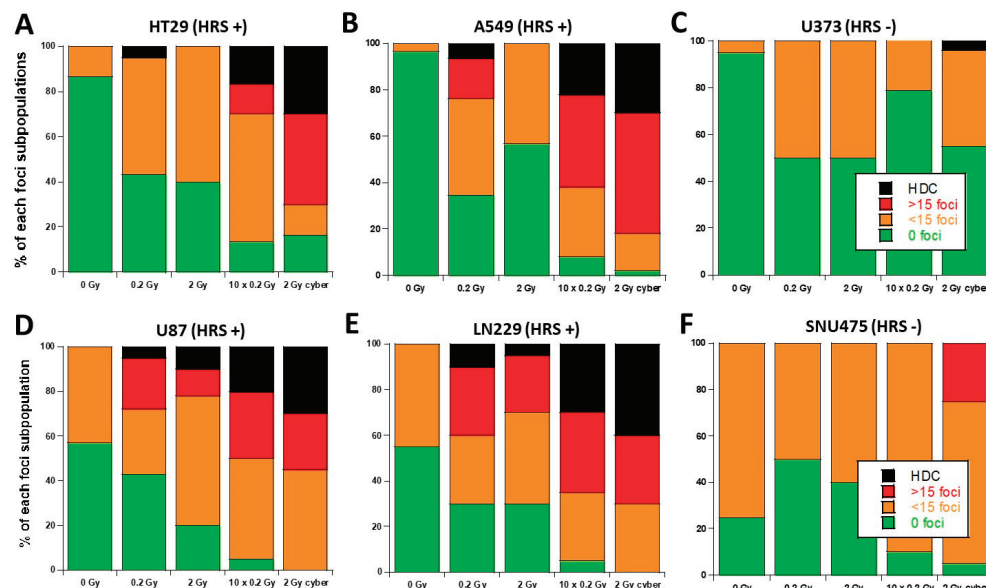
**Figure 5.** Radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci kinetics of the A549 (HRS-positive) (A), HT29 (HRS-positive) (B), and U373 (HRS-negative) (C) tumor cell lines irradiated with different SBRT delivery mode. For each cell line, the  $\gamma$ H2AX foci data were expressed as a number of  $\gamma$ H2AX foci per cell and a function of post-irradiation time (top) after a single dose of 2 Gy (2 Gy), 0.2 Gy (0.2 Gy), a series of 10 times 0.2 Gy ( $10 \times 0.2$  Gy), and a dose of 2 Gy delivered by CyberKnife (2 Gy Cyber). Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM.

During our experiments, we observed some cells showing a number of  $\gamma$ H2AX foci higher than 100, i.e., they were difficult to score with precision. Such highly damaged cells (HDC) appeared to be a specific feature of the HRS-positive cells that was mainly observed in “ $10 \times 0.2$  Gy” and in “2 Gy Cyber” conditions (Figure 6). In order to account for HDC, we have re-expressed the previous data by considering four categories of cells:

no  $\gamma$ H2AX foci, no more than 15  $\gamma$ H2AX foci, more than 15  $\gamma$ H2AX foci, and HDC. The 24 h data did not show any HDC after a single dose of 2 Gy (Figures 6 and 7). The HDC were observed in HRS-positive cells in the “0.2 Gy” conditions, and such features increased in “10 × 0.2 Gy” and “2 Gy Cyber” conditions in the HRS-positive cells only, suggesting a specific biological dose-enhancement. Conversely, with regards to the HRS-negative cells, a non-significant amount of HDC was observed. No cell with more than 15 foci was observed in HRS-negative cells. (Figures 6 and 7). These findings suggest that a considerable amount of additional DSB may be specifically induced in the HRS-positive cells when the dose is delivered in the hyper-fractionated SBRT conditions.



**Figure 6.** Representative images of the four categories of cells observed 24 h post-irradiation: cells showing no  $\gamma$ H2AX foci, no more than 15  $\gamma$ H2AX foci, more than 15  $\gamma$ H2AX foci, and HDC. The  $\gamma$ H2AX staining is in green, and the corresponding DAPI counterstaining is in blue.

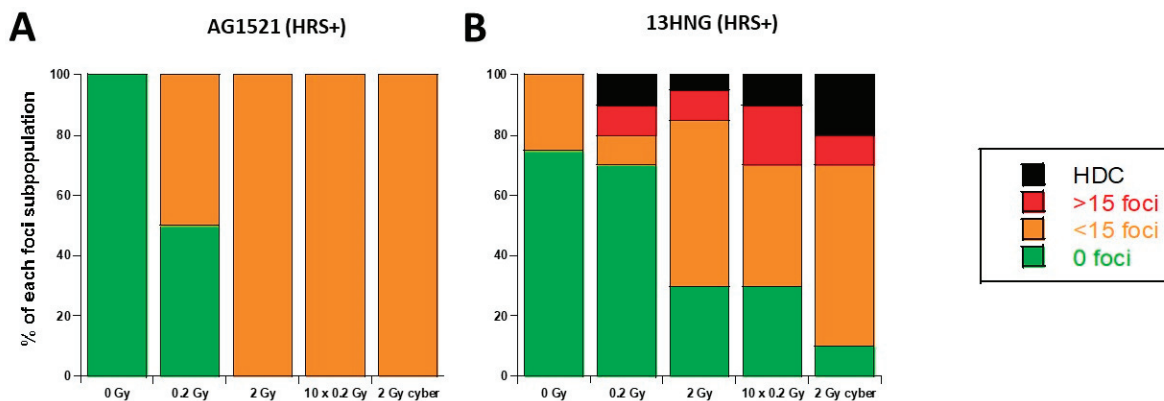


**Figure 7.** Stacked bar chart of 24 h  $\gamma$ H2AX foci data from the 6 tumor cell lines used this study. The 24 h data obtained from the 6 indicated tumor cell lines were re-expressed by considering four categories of cells defined in Figure 6. Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM.

### 3.4. Molecular Response to SBRT of the 13HNG and AG1521 Skin Fibroblast Cell Lines

The HRS phenomenon is not limited to the tumor cell lines; it has also been observed in healthy tissues such as skin fibroblasts [33–37]. Hence, if the SBRT irradiation would concern the healthy tissues around the tumor, some over-reaction would also be expected. Hence, in order to examine the influence of the HRS status in the response of

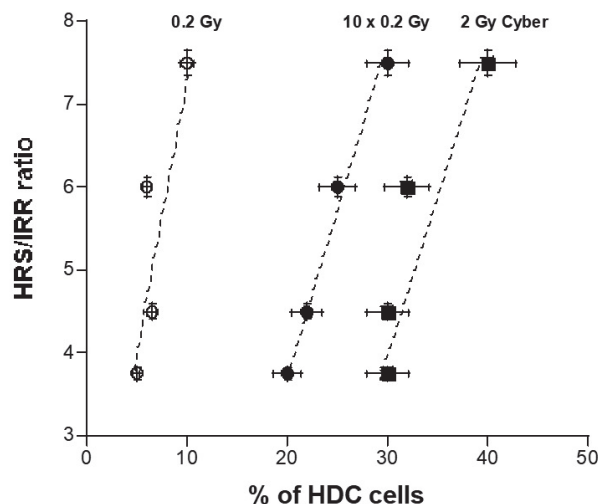
skin fibroblasts to SBRT, we applied the same irradiation conditions as described above to two untransformed skin fibroblast cell lines: AG1521 (HRS-positive) and 13HNG (HRS-negative) (Figure 8). The HDC were only observed in HRS-positive cells in the “0.2 Gy” and “2 Gy” conditions, and such features increased in “10 × 0.2 Gy” and “2 Gy Cyber” conditions. Such data confirm again that the positive HRS status may lead to a specific biological dose-enhancement in SBRT irradiation conditions (Figure 8).



**Figure 8.** Stacked bar chart of 24 h  $\gamma$ H2AX foci data. The 24 h data obtained from the 2 indicated healthy tissue cell lines were re-expressed by considering four categories of cells defined in Figure 6. Each point represents the mean of triplicate experiments  $\pm$  SEM.

### 3.5. Quantified Relationship between the HRS/IRR Ratio and the Percentage of HDC

The HDC appeared to be a biomarker specific to a repeated HRS phenomenon. In order to examine whether a quantified link exists between the percentage of HDC and the HRS/IRR ratio, these two parameters, obtained from the four HRS-positive tumor cells, were plotted together (Figure 9). Interestingly, the higher the HRS/IRR ratio, the larger the percentage of HDC. Furthermore, the percentage of HDC increased with the number of SBRT sessions by obeying a linear function close to a one-to-one correlation. Hence, each infinitesimal extent of HRS corresponds to about a 1% increase in HDC. The HRS/IRR ratio is a bounded value, so the percentage of HDC is expected to be a curvilinear function of the number of SBRT sessions. However, further investigations will be needed to document the occurrence of the HRS phenomenon in the SBRT sessions and to verify such a hypothesis.



**Figure 9.** HRS/IRR ratio as a function of percentage of HDC. The HRS/IRR ratios mentioned for the four HRS-positive tumor cells in Table 2 were plotted against the corresponding percentage of HDC in the 0.2 Gy, 10 × 0.2 Gy, and 2 Gy Cyber conditions shown in Figure 6. Dotted lines correspond to a linear function used for data fitting.

## 4. Discussion

### 4.1. From Hypofractionated to Stereotactic RT Modalities

The occurrence of the HRS phenomenon in RT depends on the dose, the dose-rate, and the HRS status of the irradiated cells. To date, some hypofractionated and/or stereotactic RT modalities may include conditions in which the HRS phenomenon may occur and may be repeated. In this study, we have applied particular hypofractionated SBRT conditions (those of CyberKnife™ RT). Theoretically, as far as the HRS phenomenon can occur and be repeated, our conclusions may be relevant for any stereotactic delivery of the dose. Furthermore, our results showed that the HRS phenomenon is independent of the tumor cell type (glioblastoma, lung adenocarcinoma . . .), and therefore, many SBRT or stereotactic radiosurgery (SRS) protocols can be concerned by such conditions. Further investigations are therefore needed to document the occurrence of HRS in other RT modalities.

Historically, hypofractionated RT has long been associated with severe complications, while hyperfractionated RT, with several sessions of about 2 Gy, was known to reduce them [38–40]. In the 1930s, the “German School” with Holzkecht and Wintz preferentially applied hypofractionated RT, while the “French school”, represented by the medical staff of the Curie Institute in Paris with Regaud, Coutard, and Del Regato, promoted hyperfractionated RT [38–40]. First developed in the 1950s, the stereotactic approach has significantly improved the tumor targeting, which has revived the old debate about hypo or else hyperfractionated RT [41]. Particularly, while hypofractionation may concern other RT modalities, it remains intimately linked to SBRT, and the efficiency of such specific modality has been often attributed, at least partially, to hypofractionation [42,43]. Some authors have suggested that long periods between two RT sessions may facilitate immune reactions, tumor reoxygenation, or repopulation, but these last features have not been correlated to radiosensitivity in a unified model yet [14,44,45]. Furthermore, immune reactions and tumor repopulation require a significant cell killing effect. With regards to DNA damage, if the 24 h repair time is protracted, no significant number of additional DNA damage is created or repaired, and therefore, no additional cell killing effect is produced [14]. In other terms, by considering unrepaired DNA breaks, protracting the time between RT sessions over 24 h should not protect significantly more healthy tissues or kill more tumor cells and, consequently, should not favor the occurrence of immune reactions and tumor repopulation [14]. In a hypofractionated RT modality (whether SBRT or not), hypofractionation of the total dose is likely to produce additive, but not supra-additive, effects. Conversely, by not considering the hypofractionation of high doses delivered during all the treatment but the hyperfractionation of low doses during each session, a significant dose-enhancement may be observed if the HRS phenomenon occurs, i.e., if some doses and dose-rates obey HRS conditions [18]. In addition, by producing an excess of cell lethality, HRS may also impact on vascular damage and immune response. Hence, our model is compatible with other hypotheses evoked above.

### 4.2. HRS Phenomenon and Stereotactic RT

The HRS phenomenon results in a significant reduction in clonogenic cell survival, increase in chromosome breaks, micronuclei, and unrepaired DSB, but also an increase in mutation frequency after a single low-dose ranging between 1 and 800 mGy [18,46]. At a dose-rate higher than 1 Gy/min, HRS generally occurs between 1 and 800 mGy. At 0.1 Gy/min, HRS is expected at few cGy [18]. In 2016, we have provided a relevant biological interpretation of the HRS phenomenon in the frame of the radiation-induced ATM nucleoshuttling (RIANS) model [17]. Briefly, in the RIANS model, IR induce DNA damage (similarly to DSB), but they also induce monomerization of the cytoplasmic ATM dimers in a dose-dependent manner. The resulting ATM monomers diffuse to the nucleus to participate in the DSB recognition by NHEJ [47]. The delay of the RIANS was shown to be correlated with the cell survival and severity grade of post-RT tissue reactions [20,23]. The RIANS is very fast (some minutes after 2 Gy) in radioresistant cells (SF2 > 60%) called group I cells. It is not functional in hyperradiosensitive cells (SF2 < 10%) called group III

cells. In cells showing significant but intermediate radiosensitivity ( $10\% < SF2 < 60\%$ ), called group II cells, the RIANS is delayed by the cytoplasmic over-expression of some proteins called X-proteins [17,47]. At low doses, the number of ATM monomers that diffuse in the nucleus and the number of DSB induced by IR decrease together but not at the same rate. Indeed, the number of DSB induced by IR decreases by obeying an induction rate of about 40 DSB induced per Gy per cell, regardless of the group of radiosensitivity. In group II cells, because ATM monomers are sequestered by X-proteins in the cytoplasm, the number of ATM monomers decreases faster than in group I cells. Consequently, the ratio of ATM monomers that diffuse in the nucleus per DSB is much lower in group II than group I cells [17,47]. In a specific mGy dose range, the flux of ATM monomers may not be sufficient for recognizing the few DSB induced. In the case of non-recognition of some DSB, the survival rate, the number of unrepaired DSB, micronuclei, or mutations may be affected significantly. Hence, the HRS-positive cells necessarily belong to the group II, i.e., they are characterized by a moderate radiosensitivity and a delayed RIANS. It must be stressed that such a hypothesis is relevant for both healthy tissues and tumors [17,47].

#### 4.3. Evidence That Each SBRT Session Results in a Repetition of Low Doses

Through the graphical demonstration of Figure 1, there is evidence that each SBRT session results in a repetition of low doses. Hence, let us consider the cell survival of the irradiated tumor  $S(d)$ , at a dose  $d$ , delivered by one single minibeam: the resulting cell survival  $S_{SBRT}$  after one SBRT session of  $\rho$  repeated doses delivered by  $\rho$  minibeam is:

$$S_{SBRT} = [S(d)]^\rho \quad (3)$$

By using the HT29, A549, and U373 tumor data described above and applying the Equation (3), let us consider that each minibeam delivered 10 cGy on average: the HRS-negative cells show a cell survival  $S(d)$  of about 0.9999, while the HRS-positive cells show a cell survival  $S(d)$  ranging from 0.98 to 0.93. Hence, by taking a numerical example with  $\rho = 10$  minibeam overlapping in the same region of the tumor, the resulting cell survival  $S_{SBRT}$ , after one SBRT session for HRS-negative and positive tumors, is  $0.9999^{10} = 0.999$  and  $0.98^{10} = 0.817$  to  $0.91^{10} = 0.39$ , respectively. Hence, in the HRS-positive cells exposed to one SBRT session, the final survival rate may reach a survival from 1.2 to 2.5 times lower than the HRS-negative cells. Altogether, such experimental and calculated data are consistent with a significant dose enhancement due to the specific occurrence of an HRS phenomenon repeated several times during each SBRT session.

#### 4.4. The HRS Phenomenon in Stereotactic RT Modalities: Towards New Predictive Assays?

If the HRS-positive cells show an enhanced killing effect, our findings raise two important questions: (1) What would be the effect on healthy tissues if they are also HRS-positive? (2) How can we predict whether a tumor/healthy tissue is HRS-positive or negative? For the first question, it appears obvious that healthy tissues can also be HRS-positive and that the HRS phenomenon is not a specific feature of tumors, as demonstrated by the Slonina's group [33–37]. However, it is important to note that the HRS statuses of tumor and healthy tissues, as with their radiosensitivity at high doses, are independent. If healthy tissues are HRS-positive, or even if both healthy tissues and tumors are HRS-positive, the benefit of a hyperfractionation of low-doses may be reduced. However, it must be stressed again that, in the particular case of SBRT, the tumor targeting is particularly precise, and therefore, healthy tissues may be spared more than with any other RT modality. The benefit of SBRT may be not negligible in this case.

With regards to the second question, the frequency of a positive HRS status in tumors is still unknown. However, a predictive assay, based on the irradiation of 2 and 0.2 Gy at high dose rate by taking DSB biomarkers as endpoints, may be informative enough to verify the HRS status of a given tumor, even if the feasibility of such a specific assay may be strongly linked to the accessibility of the tumor to perform biopsies. Fortunately, in radiation oncology, a tumor sample is, in the vast majority of cases, a prerequisite before

irradiation, whether in the form of a surgical specimen or a biopsy. With regard to healthy tissues, it is always possible to perform cutaneous biopsies or blood lymphocyte assays to verify the HRS status.

#### 4.5. Towards a Biology-Guided Radiation Therapy (BGRT)?

In the long term, determining the HRS status of both tumors and healthy tissues, may improve RT efficiency and increase its safety. Indeed, healthy tissues exhibiting an HRS-negative radiosensitivity surrounding an HRS-positive tumor would be a good candidate for a treatment technique favoring discontinuous microbeams, such as CyberKnife™, rather than volumetric modulated arc therapy (VMAT) or 3D RT modalities that involve a few beams. In this case, a de-escalation of the dose could even be considered in order to reduce the risk of radiotoxicity while safely maintaining anti-tumor efficiency. It must be stressed that such a biomolecular selection of the patients would be entirely compatible with all current SBRT techniques, allowing for increased treatment precision [48,49].

## 5. Conclusions

As mentioned in the above paragraph, the practical requirements for the occurrence of the HRS phenomenon depends on some specific ranges of dose and dose-rate. For example, some 3D-conformational RT protocols (i.e., several non-coplanar arcs) may also include such conditions and concern HRS-positive cells. Hence, our approach should be considered as a first step of investigations about the impact of the HRS phenomenon on certain modalities of RT. For the first time to our knowledge, it is suggested, here, that the benefit of the SBRT modalities may not be due to the hypofractionation of the dose through the whole treatment but, rather, to the hyperfractionation of the low dose delivered by each minibeam during each session, as well as the occurrence of the HRS phenomenon, in cells exhibiting HRS positive status. Further experiments are needed to document these findings in other SBRT modalities and, even, to better evaluate the risk of exposing HRS-positive healthy tissues and the benefit of treating HRS-positive tumors.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.L.R., A.G., A.P. and N.F.; data acquisition and methodology, E.L.R., A.G., A.P., L.B., G.B., T.L., V.V., A.B. and J.A.-C.; validation and data analysis, E.L.R., A.G., A.P., L.B., G.B., T.L., V.V., A.B., J.A.-C., M.B., J.T., J.B., E.L. and N.F.; writing and original draft preparation, and review and editing: all the authors; project administration, and funding acquisition, N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'avenir—INDIRA project, NF), National Space Agency (CNES) (ATHENA and BERNADOTTE projects, NF), and by Région Auvergne Rhône-Alpes (PAI ERATOSTHENE project) and Campus France CEDRE project (47880PE).

**Institutional Review Board Statement:** To the notable exception of the 13HNG cell line belonging to the COPERNIC collection (see Table 1), all the fibroblast and tumor cell lines used in this study were purchased from commercial repositories (see Materials and Methods). The COPERNIC collection has been approved by the regional Ethical Committee. The COPERNIC Cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437 and DC2021-3957 to the Ministry of Research. Database was protected under the reference IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300.

**Informed Consent Statement:** The commercial repositories that have provided the fibroblast cell lines used in this study applied all the ethics and regulations related to the human samplings. All the anonymous COPERNIC patients were informed and signed consent according to the ethics recommendation, notably for their consent to participate and for publication of anonymous data (informed and written consent, anonymization and acceptance for publication).

**Data Availability Statement:** The data presented here are either present in a deposited database (see Section 2) or will be made available on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bondiau, P.Y.; Benezery, K.; Beckendorf, V.; Peiffert, D.; Gerard, J.P.; Mirabel, X.; Noel, A.; Marchesi, V.; Lacornerie, T.; Dubus, F.; et al. CyberKnife robotic stereotactic radiotherapy: Technical aspects and medical indications. *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2007**, *11*, 338–344. [[CrossRef](#)]
2. Kilby, W.; Dooley, J.R.; Kuduvalli, G.; Sayeh, S.; Maure, C.R. The CyberKnife® Robotic Radiosurgery System in 2010. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2010**, *9*, 433–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. De Jong, E.E.C.; Guckenberger, M.; Andratschke, N.; Dieckmann, K.; Hoogeman, M.S.; Milder, M.; Moller, D.S.; Nyeng, T.B.; Tanadini-Lang, S.; Lartigau, E.; et al. Variation in current prescription practice of stereotactic body radiotherapy for peripherally located early stage non-small cell lung cancer: Recommendations for prescribing and recording according to the ACROP guideline and ICRU report 91. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2020**, *142*, 217–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wilke, L.; Andratschke, N.; Blanck, O.; Brunner, T.B.; Combs, S.E.; Grosu, A.L.; Moustakis, C.; Schmitt, D.; Baus, W.W.; Guckenberger, M. ICRU report 91 on prescribing, recording, and reporting of stereotactic treatments with small photon beams: Statement from the DEGRO/DGMP working group stereotactic radiotherapy and radiosurgery. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgenes.* **2019**, *195*, 193–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Biston, M.C.; Dupuis, P.; Gassa, F.; Gregoire, V. Do all the linear accelerators comply with the ICRU 91's constraints for stereotactic body radiation therapy treatments? *Cancer Radiother. J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.* **2019**, *23*, 625–629. [[CrossRef](#)]
6. ICRU. *ICRU Report 91, Prescribing, Recording, and Reporting of Stereotactic Treatments with Small Photon Beams*; International Commission on Radiation Units and Measurements: Bethesda, MD, USA, 2017.
7. Calcerrada Diaz-Santos, N.; Blasco Amaro, J.A.; Cardiel, G.A.; Andradas Aragones, E. The safety and efficacy of robotic image-guided radiosurgery system treatment for intra- and extracranial lesions: A systematic review of the literature. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2008**, *89*, 245–253. [[CrossRef](#)]
8. Gibbs, I.C.; Kamnerdsupaphon, P.; Ryu, M.R.; Dodd, R.; Kiernan, M.; Chang, S.D.; Adler, J.R., Jr. Image-guided robotic radiosurgery for spinal metastases. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2007**, *82*, 185–190. [[CrossRef](#)]
9. Ehret, F.; Senger, C.; Kufeld, M.; Furweger, C.; Kord, M.; Haidenberger, A.; Windisch, P.; Ruess, D.; Kaul, D.; Ruge, M.; et al. Image-Guided Robotic Radiosurgery for the Management of Intramedullary Spinal Cord Metastases-A Multicenter Experience. *Cancers* **2021**, *13*, 297. [[CrossRef](#)]
10. Jereczek-Fossa, B.A.; Beltramo, G.; Fariselli, L.; Fodor, C.; Santoro, L.; Vavassori, A.; Zerini, D.; Gherardi, F.; Ascione, C.; Bossi-Zanetti, I.; et al. Robotic image-guided stereotactic radiotherapy, for isolated recurrent primary, lymph node or metastatic prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2012**, *82*, 889–897. [[CrossRef](#)]
11. Ihnat, P.; Skacelikova, E.; Tesar, M.; Penka, I. Stereotactic body radiotherapy using the CyberKnife((R)) system in the treatment of patients with liver metastases: State of the art. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 4685–4691. [[CrossRef](#)]
12. Khadige, M.; Salleron, J.; Marchesi, V.; Oldrini, G.; Peiffert, D.; Beckendorf, V. Cyberknife((R)) stereotactic radiation therapy for stage I lung cancer and pulmonary metastases: Evaluation of local control at 24 months. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 4976–4984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Diamant, A.; Heng, V.J.; Chatterjee, A.; Faria, S.; Bahig, H.; Fillion, E.; Doucet, R.; Khosrow-Khavar, F.; Naqa, I.E.; Seuntjens, J. Comparing local control and distant metastasis in NSCLC patients between CyberKnife and conventional SBRT. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2020**, *144*, 201–208. [[CrossRef](#)]
14. Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. Rev.* **2016**, *770*, 369–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Joiner, M.C.; Marples, B.; Lambin, P.; Short, S.C.; Turesson, I. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2001**, *49*, 379–389. [[CrossRef](#)]
16. Marples, B.; Collis, S.J. Low-dose hyper-radiosensitivity: Past, present, and future. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, *70*, 1310–1318. [[CrossRef](#)]
17. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Thomas, C.; Martin, J.; Devic, C.; Diserbo, M.; Thariat, J.; Foray, N. Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 813–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rothkamm, K.; Lohrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)]
20. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. [[CrossRef](#)]
21. Granzotto, A.; Bencokova, Z.; Vogin, G.; Devic, C.; Joubert, A.; Balosso, J.; Foray, N. DNA double-strand breaks repair and signaling of human gliomas and normal brain cells in response to radiation: Potential impact of the ATM- and BRCA1-dependent pathways. In *Brain Tumors/Book 3*; Abujamra, A.L., Ed.; Intechweb: Rijeka, Croatia, 2011.
22. Foray, N.; Priestley, A.; Alsbeih, G.; Badie, C.; Capulas, E.P.; Arlett, C.F.; Malaise, E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 271–283.



23. Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.; Forcheron, F.; Viau, M.; et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 450–460. [[CrossRef](#)]
24. Mengue, L.; Bertaut, A.; Ngo Mbus, L.; Dore, M.; Ayadi, M.; Clement-Colmou, K.; Claude, L.; Carrie, C.; Laude, C.; Tanguy, R.; et al. Brain metastases treated with hypofractionated stereotactic radiotherapy: 8 years experience after Cyberknife installation. *Radiat. Oncol.* **2020**, *15*, 82. [[CrossRef](#)]
25. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Al-Choboq, J.; Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; El-Nachef, L.; Maalouf, M.; Berthel, E.; Foray, N. Usher Syndrome Belongs to the Genetic Diseases Associated with Radiosensitivity: Influence of the ATM Protein Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Marples, B.; Lambin, P.; Skov, K.A.; Joiner, M.C. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *71*, 721–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, Q.; Chen, Y.; Chang, H.; Hu, T.; Wang, J.; Xie, Y.; Cheng, J. The Role and Mechanism of ATM-Mediated Autophagy in the Transition from Hyper-Radiosensitivity to Induced Radioresistance in Lung Cancer Under Low-Dose Radiation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 650819. [[CrossRef](#)]
29. Schoenherr, D.; Krueger, S.A.; Martin, L.; Maignol, L.; Wilson, G.D.; Marples, B. Determining if low dose hyper-radiosensitivity (HRS) can be exploited to provide a therapeutic advantage: A cell line study in four glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 1009–1016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ryan, L.A.; Seymour, C.B.; Joiner, M.C.; Mothersill, C.E. Radiation-induced adaptive response is not seen in cell lines showing a bystander effect but is seen in lines showing HRS/IRR response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *85*, 87–95. [[CrossRef](#)]
31. Cornforth, M.N.; Bedford, J.S. A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat. Res.* **1987**, *111*, 385–405. [[CrossRef](#)]
32. Chavaudra, N.; Bourhis, J.; Foray, N. Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: A study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2004**, *73*, 373–382.
33. Slonina, D.; Biesaga, B.; Urbanski, K.; Kojs, Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. *Radiat. Res.* **2007**, *167*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Slonina, D.; Biesaga, B.; Urbanski, K.; Kojs, Z. The response of primary keratinocytes and fibroblasts from cancer patients to multiple low-dose irradiations. *Radiat. Res.* **2007**, *168*, 631–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Slonina, D.; Biesaga, B.; Urbanski, K.; Kojs, Z. Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 421–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Slonina, D.; Biesaga, B.; Urbanski, K.; Kojs, Z.; Waligorski, M. Evidence of low-dose hyper-radiosensitivity in normal cells of cervix cancer patients? *Radiat. Prot. Dosim.* **2006**, *122*, 282–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Slonina, D.; Kowalczyk, A.; Janecka-Widla, A.; Kabat, D.; Szatkowski, W.; Biesaga, B. Low-Dose Hypersensitive Response for Residual pATM and gammaH2AX Foci in Normal Fibroblasts of Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *100*, 756–766. [[CrossRef](#)]
38. Del Regato, J.A. Fractionation: A panoramic view. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1990**, *19*, 1329–1331. [[CrossRef](#)]
39. Ellis, F. Fractionation in radiotherapy. In *Modern Trends in Radiotherapy*; Wood, D.A., Ed.; Butterworth: London, UK, 1967; Volume 1, p. 34.
40. Willers, H.; Beck-Bornholdt, H.P. Origins of radiotherapy and radiobiology: Separation of the influence of dose per fraction and overall treatment time on normal tissue damage by Reisner and Miescher in the 1930s. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **1996**, *38*, 171–173. [[CrossRef](#)]
41. Lasak, J.M.; Gorecki, J.P. The history of stereotactic radiosurgery and radiotherapy. *Otolaryngol. Clin. N. Am.* **2009**, *42*, 593–599. [[CrossRef](#)]
42. Klement, R.J.; Sonke, J.J.; Allgauer, M.; Andratschke, N.; Appold, S.; Belderbos, J.; Belka, C.; Dieckmann, K.; Eich, H.T.; Flentje, M.; et al. Estimation of the alpha/beta ratio of non-small cell lung cancer treated with stereotactic body radiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2020**, *142*, 210–216. [[CrossRef](#)]
43. Stuschke, M.; Pottgen, C. Altered fractionation schemes in radiotherapy. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* **2010**, *42*, 150–156. [[CrossRef](#)]
44. Nahum, A.E. The radiobiology of hypofractionation. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol.* **2015**, *27*, 260–269. [[CrossRef](#)]
45. Brand, D.H.; Kirby, A.M.; Yarnold, J.R.; Somaiah, N. How Low Can You Go? The Radiobiology of Hypofractionation. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol.* **2022**, *34*, 280–287. [[CrossRef](#)]
46. Thomas, C.; Charrier, J.; Massart, C.; Cherel, M.; Fertil, B.; Barbet, J.; Foray, N. Low-dose hyper-radiosensitivity of progressive and regressive cells isolated from a rat colon tumour: Impact of DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 533–548. [[PubMed](#)]
47. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Tsang, M.W. Stereotactic body radiotherapy: Current strategies and future development. *J. Thorac. Dis.* **2016**, *8*, S517–S527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ferro, M.; Crocetto, F.; Lucarelli, G.; Lievore, E.; Barone, B. Radiotherapy to the Primary Tumor: The First Step of a Tailored Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1981. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Article

# Toward an Early Diagnosis for Alzheimer's Disease Based on the Perinuclear Localization of the ATM Protein

Elise Berthel <sup>1,2</sup>, Laurent Pujo-Menjouet <sup>3,†</sup>, Eyméric Le Reun <sup>1,†</sup>, Laurène Sonzogni <sup>1,†</sup>, Joëlle Al-Choboq <sup>1</sup>, Abdennasser Chekroun <sup>3</sup>, Adeline Granzotto <sup>1</sup>, Clément Devic <sup>1</sup>, Mélanie L. Ferlazzo <sup>1</sup>, Sandrine Pereira <sup>2</sup>, Michel Bourguignon <sup>1,4</sup> and Nicolas Foray <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1296 Research Unit «Radiation: Defense, Health, Environment», Centre Léon-Bérard, 28 Rue Laennec, 69008 Lyon, France; eberthel@neolys-diagnostics.fr (E.B.); eymeric.le-reun@inserm.fr (E.L.R.); laurene.sonzogni@inserm.fr (L.S.); joelle.al-choboq@inserm.fr (J.A.-C.); adeline.granzotto@inserm.fr (A.G.); ferlazzo@ansto.au (M.L.F.); michel.bourguignon@inserm.fr (M.B.)

<sup>2</sup> NEOLYS Diagnostics, 7 Allée de l'Europe, 67960 Entzheim, France; spereira@neolys-diagnostics.fr

<sup>3</sup> Université Claude-Bernard Lyon 1, CNRS UMR5208, INRIA, Institut Camille-Jordan, 21 Avenue Claude Bernard, 69603 Villeurbanne, France; pujo@maths.univ-lyon1.fr (L.P.-M.); checkroun@maths.univ-lyon1.fr (A.C.)

<sup>4</sup> Université Paris-Saclay, 78035 Versailles, France

\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-04-78-78-28-28

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative dementia, for which the molecular origins, genetic predisposition and therapeutic approach are still debated. In the 1980s, cells from AD patients were reported to be sensitive to ionizing radiation. In order to examine the molecular basis of this radiosensitivity, the ATM-dependent DNA double-strand breaks (DSB) signaling and repair were investigated by applying an approach based on the radiation-induced ataxia telangiectasia-mutated (ATM) protein nucleoshuttling (RIANS) model. Early after irradiation, all ten AD fibroblast cell lines tested showed impaired DSB recognition and delayed RIANS. AD fibroblasts specifically showed spontaneous perinuclear localization of phosphorylated ATM (pATM) forms. To our knowledge, such observation has never been reported before, and by considering the role of the ATM kinase in the stress response, it may introduce a novel interpretation of accelerated aging. Our data and a mathematical approach through a brand-new model suggest that, in response to a progressive and cumulative stress, cytoplasmic ATM monomers phosphorylate the APOE protein (pAPOE) close to the nuclear membrane and aggregate around the nucleus, preventing their entry in the nucleus and thus the recognition and repair of spontaneous DSB, which contributes to the aging process. Our findings suggest that pATM and/or pAPOE may serve as biomarkers for an early reliable diagnosis of AD on any fibroblast sample.

**Keywords:** Alzheimer's disease; ATM; APOE; aging; fibroblasts; immunofluorescence; DNA double-strand breaks; irradiation



Citation: Berthel, E.;

Pujo-Menjouet, L.; Le Reun, E.;

Sonzogni, L.; Al-Choboq, J.;

Chekroun, A.; Granzotto, A.;

Devic, C.; Ferlazzo, M.L.;

Pereira, S.; et al. Toward an Early

Diagnosis for Alzheimer's Disease

Based on the Perinuclear Localization

of the ATM Protein. *Cells* **2023**, *12*,

1747. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/cells12131747)

[cells12131747](https://doi.org/10.3390/cells12131747)

Academic Editor: Maurizio Romano

Received: 22 May 2023

Revised: 9 June 2023

Accepted: 26 June 2023

Published: 29 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and devastating neurodegenerative disorder with a poor prognosis, and for which no efficient curative treatment is currently available [1,2]. AD has been shown to result in specific neurobiological events, such as extracellular deposits of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) plaques [3] and intracellular neurofibrillary tangles consisting in hyper-phosphorylated aggregates of the microtubule-associated tau protein [4]. Interestingly, cellular radiosensitivity was also reported in lymphocytes derived from AD patients [5–7]. However, to date, a mechanistic model linking the abnormal response to ionizing radiation (IR) and the accelerated neurodegeneration/aging observed in AD patients in response to oxidative stress, whether endogenous or exogenous, is still needed.

In 2016, from one of the largest collections of cutaneous fibroblasts derived from patients suffering from post-radiotherapy radiosensitivity, a unified mechanistic model of individual responses to IR was proposed [8,9]. This model was based on the radiation-induced (RI) nucleoshuttling of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) protein (RIANS) required for signaling and repair of DNA double-strand breaks (DSB), the key DNA damage in response to IR. The RIANS model has been shown to be the most reliable predictor of radiosensitivity [8,10–14], and to provide a molecular explanation of some low-dose-specific radiobiological phenomena [9,15–17]. It was also validated in non-radiative oxidative stress, such as contamination with metals and pesticides [18,19]. In the frame of the RIANS model, any oxidative stress induces DNA breaks and the monomerization of ATM dimers. Cytoplasmic ATM monomers diffuse thereafter in the nucleus and trigger the DSB recognition and repair via the non-homologous end-joining (NHEJ), the predominant DSB signaling and repair pathway in quiescent human cells [8,9]. Any delayed RIANS was shown to be associated with radiosensitivity (RI cell lethality), radio-susceptibility (RI cancers) and/or radio-degeneration (RI accelerated aging) [17,20]. Delayed RIANS is generally caused by the sequestration of cytoplasmic ATM monomers by overexpressed ATM substrate proteins, called X-proteins [17,21]. A number of X-proteins have already been identified in neurodegenerative/aging or cancer-prone diseases associated with radiosensitivity, therefore validating the RIANS model. This is notably the case of Huntington’s disease [22], tuberous sclerosis complex [23], Xeroderma Pigmentosum D [24], retinoblastoma [25], neurofibromatosis type I [26] and Rothmund–Thomson syndromes [27]. It is noteworthy that the occurrence of cytoplasmic forms of ATM, the basis of the RIANS model, has been initially supported by several other research groups [28–32].

Here, the major steps of the ATM-dependent RI DSB signaling and repair pathway were investigated in cutaneous fibroblasts derived from 10 AD patients. The AD data were compared to those obtained from fibroblasts derived from 5 apparently healthy and radioresistant donors and 11 patients suffering from cancer or neurodegenerative diseases. During our investigations, a spontaneous perinuclear localization of the ATM protein was observed specifically in the AD fibroblasts, which prompted us to propose a mechanistic interpretation of AD deriving from the RIANS model and consolidated by a biomathematical approach.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

All the experiments were performed with human untransformed cutaneous fibroblasts that were routinely cultured as monolayers with Gibco modified Eagle’s minimum medium (DMEM) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin (Thermo Fisher). All the experiments were performed with cells in the plateau phase of growth to avoid any cell cycle effect [33]. The genetic and cellular features of the cutaneous fibroblasts tested are detailed in Table 1. The 10 untransformed AD fibroblasts were purchased from the Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA). All the non-AD fibroblasts used in this study were purchased either from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, UK Health Security Agency, Salisbury, UK), the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), the Coriell Institute or from the COPERNIC collection of our lab that gathers primary fibroblasts of different origin and radiosensitivity. The COPERNIC collection was approved by a regional ethical committee, declared under the numbers DC2011-1437 and 2021-3957 to the Ministry of Research as required by the French regulations, and was already described elsewhere [8]. It obeys the French regulations about the anonymous sampling and the informed consent. Cell authentication and culture quality control were insured by commercial repositories. With regard to the cell lines isolated from the lab (COPERNIC collection), the respect of the good practices of the laboratory (GPL) was included in the declaration of the cell line collection to the French Ministry of Research.

**Table 1.** Major characteristics of the fibroblast cell lines used in this study.

Cell Lines	Gender	Associated Disease	Radiation Response	Age (at Sampling)	APOE Genotype	Origin
1BR3	Male	Apparently healthy	Radioresistant	3	nd	ECACC
149BR	Male	Apparently healthy	Radioresistant	51	nd	ECACC
HF19	Female	Apparently healthy	Radioresistant	fetus	nd	ECACC
Hs27	Male	Apparently healthy	Radioresistant	<1 month	$\epsilon 3/\epsilon 4$	ATCC
MRC5	Male	Apparently healthy	Radioresistant	children	$\epsilon 3/\epsilon 4$	ECACC
GM03399	Female	AT heterozygous mutation	Radioresistant	20	nd	Coriell Institute
AT2EM	nd	nd	Hyper-radiosensitive	nd	nd	COPERNIC
AT3BI	Male	nd	Hyper-radiosensitive	4	nd	COPERNIC
AT4BI	Male	nd	Hyper-radiosensitive	6	nd	COPERNIC
GM05823 (AT5BI)	Male	AT Compound heterozygous mutation	Hyper-radiosensitive	18	nd	Coriell Institute
Rackham 12	Male	Neurofibromatosis type I	Moderately radiosensitive	23	nd	COPERNIC
GM21756	Female	Huntington's disease	Moderately radiosensitive	nd	nd	Coriell Institute
XP26VI	nd	Xeroderma Pigmentosum D	Moderately radiosensitive	15	nd	COPERNIC
AG17524	Female	Rothmund–Thomson Syndrome	Moderately radiosensitive	4	nd	Coriell Institute
AG01972	Female	Hutchinson–Gilford syndrome	Hyper-radiosensitive	14	nd	Coriell Institute
AG06300	Male	Werner's syndrome	Hyper-radiosensitive	37	nd	Coriell Institute
AG11415	Male	AD	Moderately Radiosensitive	55	$\epsilon 3/\epsilon 3$	Coriell Institute
AG21158	Female	AD	Moderately Radiosensitive	69	$\epsilon 2/\epsilon 3$	Coriell Institute
AG06840	Male	AD <i>PSEN1</i> mutation	Moderately Radiosensitive	56	$\epsilon 3/\epsilon 3$	Coriell Institute
AG06844	Male	AD Family history early onset	Moderately Radiosensitive	59	$\epsilon 3/\epsilon 4$	Coriell Institute
AG06848	Female	AD <i>PSEN1</i> mutation	Moderately Radiosensitive	56	$\epsilon 3/\epsilon 4$	Coriell Institute
AG06869	Female	AD	Moderately Radiosensitive	60	$\epsilon 4/\epsilon 4$	Coriell Institute
AG07376	Male	AD	Moderately Radiosensitive	60	$\epsilon 3/\epsilon 3$	Coriell Institute
AG08170	Male	AD Family history early onset	Moderately Radiosensitive	56	$\epsilon 3/\epsilon 4$	Coriell Institute
AG08541	Female	AD	Moderately Radiosensitive	59	$\epsilon 3/\epsilon 3$	Coriell Institute
AG09908	Female	AD <i>PSEN2</i> mutation	Moderately Radiosensitive	81	$\epsilon 3/\epsilon 3$	Coriell Institute

Nd: not determined; ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures; ATCC: American Type Culture Collection.

## 2.2. Treatment with Zoledronate and Pravastatine (ZOPRA)

The combination of zoledronate and pravastatin was called ZOPRA treatment, as described elsewhere [34], and it was applied to more than ten different genetic diseases associated with a delayed RIANS [35]. Briefly, cells were incubated with 1  $\mu$ M of pravastatin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) in phosphate-buffered saline solution (PBS) for 24 h at 37 °C. Thereafter, 1  $\mu$ M of zoledronate (Sigma-Aldrich) in PBS was added into the culture medium and cells were incubated for 12 h at 37 °C. The culture medium was renewed immediately before irradiation.

### 2.3. Irradiation

All the irradiations were performed on a 6 MeV X-ray clinical irradiator (SL 15 Phillips) at the Anti-Cancer Centre Léon-Bérard (Lyon, France), at a dose of 2 Gy with a dose rate of 6 Gy min<sup>-1</sup>. Dosimetry was certified by the Radiophysics Department of Centre Léon-Bérard.

### 2.4. Clonogenic Cell Survival

The intrinsic cellular radiosensitivity was quantified by using the clonogenic cell survival assay, for which the protocol was detailed elsewhere [36]. Each survival data point is the mean of at least 3 replicates with 3 different dilutions tested per dose. The number of cells seeded ranged from 200 to 10,000 cells per 6 cm-diameter Petri dish [36]. The intrinsic radiosensitivity was quantified by the surviving fraction at 2 Gy (SF2) [9].

### 2.5. Phosphospecific APOE Antibodies

Two custom rabbit polyclonal phosphospecific APOE antibodies were developed against pAPOE<sup>ser72</sup> and pAPOE<sup>thr75</sup> residues at our request by the CliniSciences company (Nanterre, France) by following standard procedures developed by the manufacturer.

### 2.6. Immunofluorescence

Immunofluorescence and foci scoring procedures were described elsewhere [8,24,37]. Briefly, the anti- $\gamma$ -H2AX<sup>ser139</sup> antibody (clone JBW301; Merck, Millipore, Darmstadt, Germany) was applied at 1:800. Anti-pATM<sup>ser1981</sup> (clone 10H11.E12; Millipore, Germany) and anti-MRE11 (#56211; Abcys, Paris, France) were used at 1:100. Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI), which also permitted to score the micronuclei in the same conditions. The foci scoring procedure applied here has received the certification agreement of CE mark and ISO-13485 quality management norms and developed some features protected in the frame of the patents FR3017625 A1 and FR3045071 A1. The immunofluorescence data resulted in at least 3 independent replicates with 100 nuclei analyzed per experiment and per biomarker.

### 2.7. Micronuclei Assay

During each immunofluorescence experiment, the DAPI counterstaining permitted to quantify the micronuclei at magnification  $\times 100$  [14]. The micronuclei data resulted in at least 3 independent replicates with 100 nuclei analyzed per experiment and per biomarker.

### 2.8. Immunoprecipitation and Immunoblotting

Total extracts were obtained from 1 to 2  $\times 10^6$  cells collected by scraping and rinsed by centrifugation with cold phosphate-buffered saline (1500 rpm, 200  $\times g$ , 4  $^{\circ}C$ , 5 min), then lysed in lysis buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP40 nonidet and 10% glycerol) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (#78442, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and maintained in 4  $^{\circ}C$  for 15 min. Total extracts were finally obtained in the supernatant after centrifugation (1500 rpm, 200  $\times g$ , 4  $^{\circ}C$ , 5 min). Cytoplasmic extracts were obtained from 1 to 2  $\times 10^6$  rinsed cells using the buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCL, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.2% Nonidet NP40, H<sub>2</sub>O), supplemented with protease and phosphatase inhibitors (#78442, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and maintained in 4  $^{\circ}C$  for 15 min. Cytoplasmic extracts were finally obtained in the supernatant after centrifugation (5000 rpm, 800  $\times g$ , 4  $^{\circ}C$ , 5 min). After this procedure, nuclear extracts were obtained from the residual pellet lysed in the following buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 450 mM KCL, 2 mM EDTA, 1 mM ethyl-glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether-tetraacetic acid) (EGTA) pH 8, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.25% glycerol, H<sub>2</sub>O), supplemented with protease and phosphatase inhibitors (#78442, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) applied for 1 h, at 4  $^{\circ}C$ . Nuclear extracts were finally obtained from the supernatant after centrifugation (5000 rpm, 800  $\times g$ , 4  $^{\circ}C$ , 5 min). Protein concentrations were determined by the Bradford procedure (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

For immunoprecipitations, lysates containing 1.5 mg of protein were pre-cleared by stirring with 40  $\mu$ L of Protein G–Sepharose beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) for 1 h, at 4 °C. After centrifugation, immunoprecipitation was performed with the pre-cleared lysate and 2  $\mu$ g of antibody for 3 h, at 4 °C. A 40  $\mu$ L volume of Protein G–Sepharose was added and incubated for 30 min at 4 °C. After centrifugation, beads were washed three times with lysis buffer A and proteins were eluted by heating at 95 °C for 5 min in SDS loading buffer and 100 mM of dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich). Proteins were subjected to SDS-PAGE and blotted onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Burlington, MA, USA). Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) solution containing 0.05% Tween 20 and 5% (*w/v*) non-fat dried skimmed milk powder and incubated with primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch-Europe, Ely, UK) were used for the detection of immunoreactive proteins via the ECL kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.9. *In Situ Proximity Ligation Assay (PLA)*

The PLA technology allows the *in situ* detection of endogenous protein interactions by immunofluorescence microscopy [38]. This technique consists in recognition of two proteins of interest using secondary antibodies conjugated with DNA strands. When in close proximity ( $\leq 10$  nm), these strands form a template for rolling-circle amplification using fluorescent oligonucleotides. The interaction between the two proteins of interest is visible as a distinct fluorescent spot. Cells were fixed with 4% (*w/v*) paraformaldehyde for 15 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich) for 3 min at 4 °C. Cells were then blocked for 2 h at room temperature using 30  $\mu$ L of blocking solution from the Duolink™ *In Situ* Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (#DUO92102, Sigma-Aldrich) per coverslip. Mixtures of two primary antibodies' incubations were performed for 1 h at 37 °C (one raised in rabbit, the other one in mouse). The following antibodies were diluted in the Duolink antibody diluent 1X (#DUO82008-Sigma) at a ratio of 1:100: mouse monoclonal anti-ATM antibody (#2C1 (1A1); Abcam, Cambridge UK) and rabbit polyclonal anti-APOE antibody (#SAB2701971; Sigma-Aldrich). PLA probes (Duolink PLA Probe anti-mouse MINUS and Duolink PLA Probe anti-rabbit PLUS, Olink AB) were diluted the same as all Duolink reagents. After 1 h of incubation at 37 °C with the PLA probes, cells were washed in buffer A (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) and treated with the Duolink *In Situ* Detection Reagents Orange (Olink AB, Sigma-Aldrich). Cells were incubated with the ligation solution for 30 min at 37 °C in the humidified chamber. After washing in buffer A, cells were incubated with the amplification solution for 100 min at 37 °C in darkness in the humidified chamber. Cells were then washed with wash buffer B (DUO82048-1EA, Sigma-Aldrich), followed by a quick wash with 1/100 wash buffer B. Samples were mounted with Duolink *In Situ* Mounting Medium with DAPI (DUO82040; Sigma-Aldrich). Samples were analyzed under fluorescent microscopy. Fluorescent signals were viewed under an Olympus BX51 microscope ( $\times 100$  objective). Analysis and quantification of these samples were performed using the ImageJ 1.52g software. The PLA data resulted in at least 3 independent replicates with 100 nuclei analyzed per experiment and per biomarker couple.

### 2.10. *Statistical Analysis*

All data were obtained with the numbers of independent experiments indicated and each value was expressed as the mean and standard error of the mean (Poisson's law). The statistical analyses were performed either by PRISM software version 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) or by using Kaleidagraph version 4.5.4 (Synergy Software, Reading, PA, USA). One-way ANOVA tests were performed for point-to-point analysis.

### 2.11. *Mathematical Modeling*

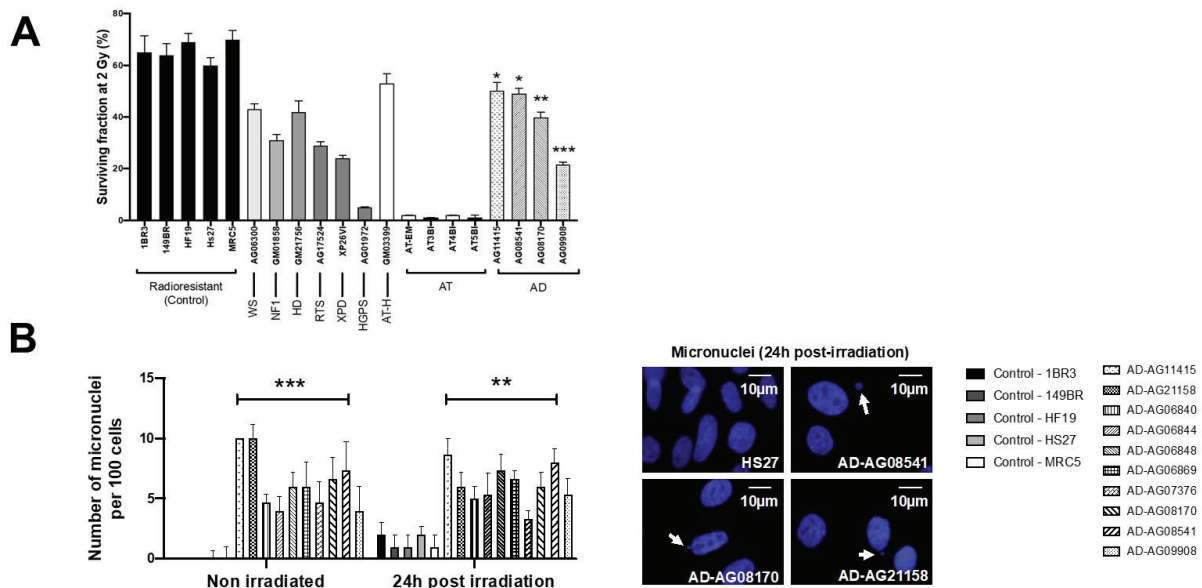
A brand-new mathematical model was designed to unify all four patterns (no pATM crown, no pATM crown with foci, thin pATM crown with foci, thick pATM crown without

foci) in a single system of nonlinear differential equations, and based on the description of protein interactions, in six compartments: the ATM dimers in cytoplasm, the ATM monomers in cytoplasm, the ATM dimers inside the perinuclear crown, the APOE-ATM complexes, the APOE proteins, and finally, the ATM monomers in the nucleus. Each interaction from one compartment to another was represented by a term of the equation (interaction, nucleus passage, monomerization, dimerization, complex formation) with specific kinetics. Some of these kinetic parameters were protein-dependent (such as  $k_4$  depending on AM (that is the APOE-ATM complexes with saturation) and  $k_5$  depending inversely on  $D_A$  (that is the ATM dimers in the perinuclear crowns)). The simulation results led to one of the four patterns regarding the values of the parameters and/or initial conditions.

### 3. Results

#### 3.1. AD Fibroblasts Show Radiosensitivity Associated with a Delayed RIANs

Cellular radiosensitivity is currently quantified by the clonogenic cell survival fraction at 2 Gy (SF2) [39]. While the average SF2 values from the radioresistant controls ( $65.6 \pm 1.8\%$ ) were in good agreement with the literature [39–41], the AD fibroblasts tested showed significantly lower SF2 than controls (average SF2 =  $40.2 \pm 6.6\%$ ;  $p < 0.01$ ) (Figure 1A). The SF2 values of AD cells suggested a moderate but significant radiosensitivity, quantitatively similar to that of Werner’s syndrome or Huntington’s disease, but significantly lower than that observed in ataxia telangiectasia (AT), the human syndrome associated with the highest radiosensitivity (average SF2 =  $1.5 \pm 0.3\%$ ;  $p < 0.001$ ) [21,39–41] (Figure 1A). The SF2 values of AD fibroblasts were found in agreement with those from AD lymphocytes published in the 1980s [5–7].

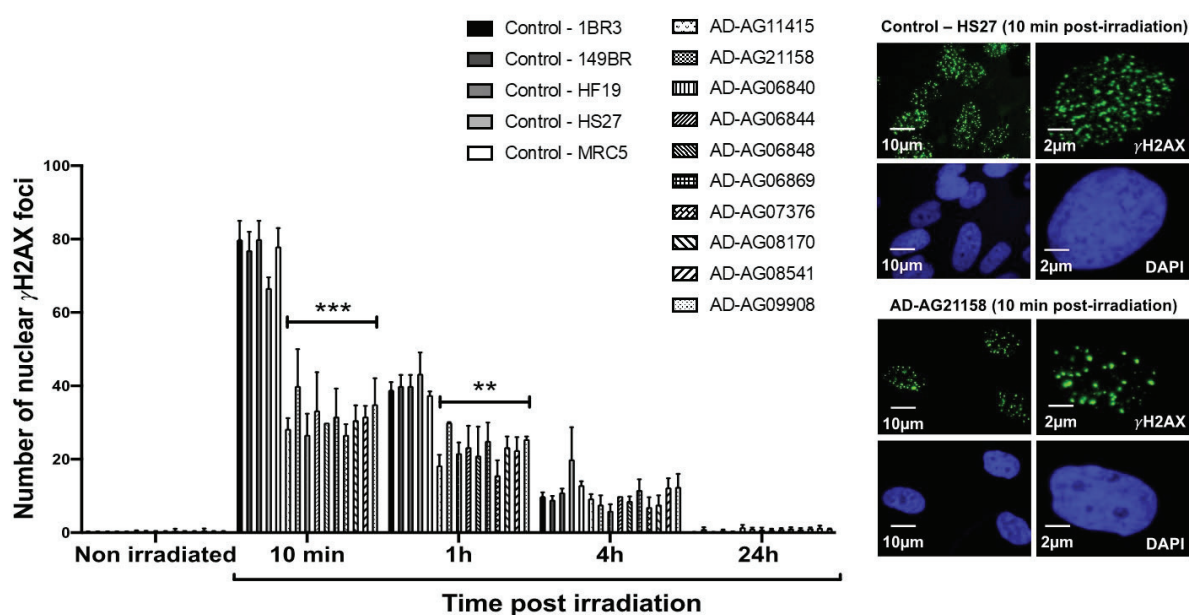


**Figure 1.** Cellular radiosensitivity and cytogenetic features of AD fibroblasts. **(A)** Surviving fraction at 2 Gy (SF2) of the indicated fibroblast cell lines from the indicated syndromes (WS: Werner’s syndrome; NF1: neurofibromatosis type 1; HD: Huntington’s disease; RTS: Rothmund–Thomson syndrome; XPD: Xeroderma Pigmentosum D; HGPS: Hutchinson–Gilford progeroid syndrome; ATH: ataxia telangiectasia heterozygous; AT ataxia telangiectasia; AD: Alzheimer’s disease). Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three replicates, at least. The asterisks are shown for AD cells vs. controls only. **(B)** Representative immunofluorescence images of micronuclei observed 24 h post-irradiation (2 Gy X-rays) in the indicated cells with DAPI staining. The arrows show isolated micronuclei during exonucleosis. Histogram showing the number of micronuclei per 100 cells assessed before irradiation or 24 h post-irradiation. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ .



Micronuclei are cytogenetic endpoints resulting from the propagation of unrepaired DSB to G2/M phase and their transformation as chromosome fragments [14]. The yield of micronuclei has been shown to be quantitatively correlated with cellular radiosensitivity [14,20]. In the 10 AD fibroblasts tested, the yields of spontaneous and RI micronuclei were significantly higher than those of radioresistant controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) (Figure 1B). SF2 and micronuclei data from AD fibroblasts were found consistent with correlations with 200 different human cell lines, showing a large spectrum of radiosensitivity [14] (Figure S1).

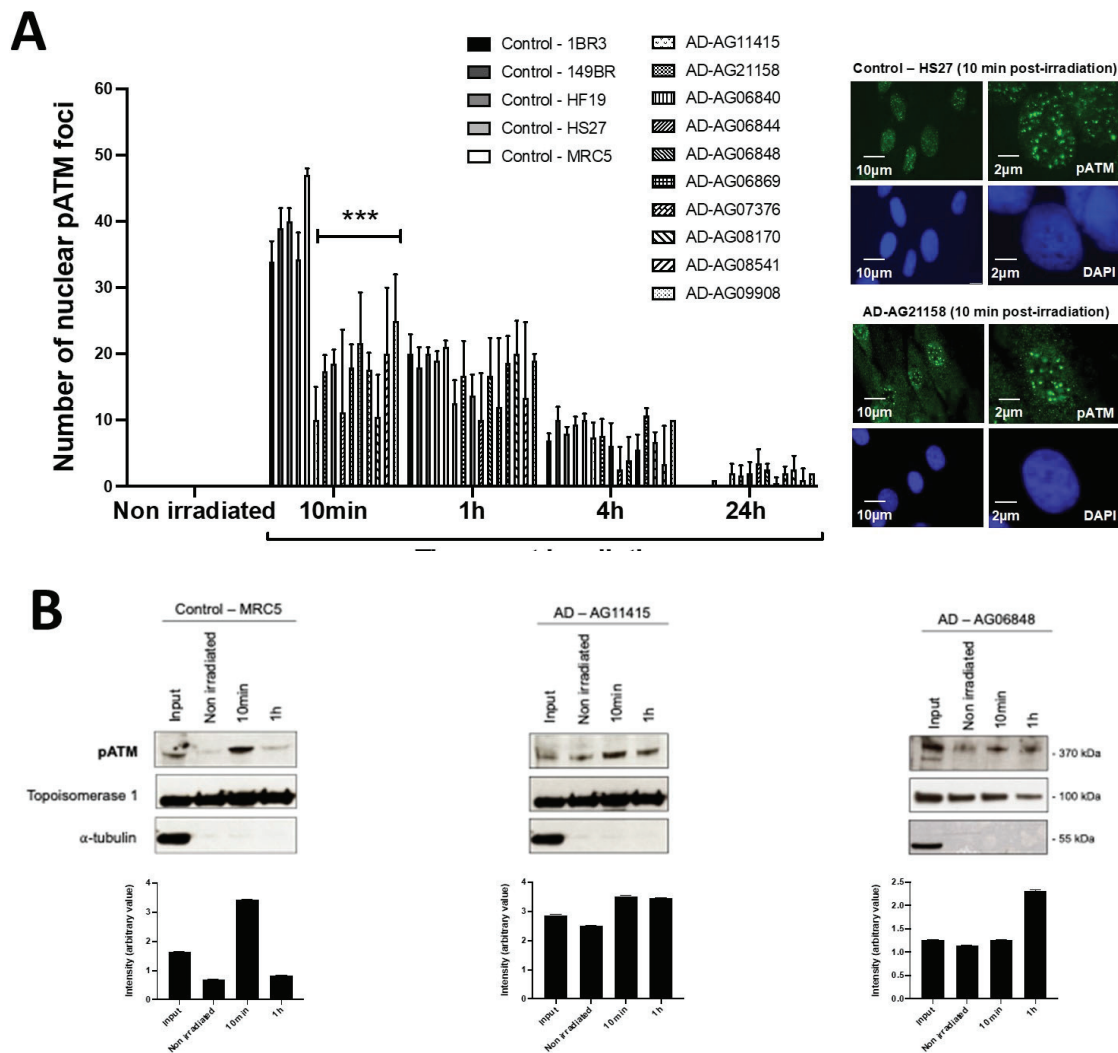
Since the ATM phosphorylation of the X variant of the H2A histone ( $\gamma$ H2AX) was demonstrated to form nuclear foci at the RI DSB sites recognized by NHEJ [42], anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence was applied to AD fibroblasts. While no difference was observed at 4 and 24 h post-irradiation, the number of  $\gamma$ H2AX foci assessed 10 min and 1 h post-irradiation was found systematically lower in the AD fibroblasts than in the radioresistant controls ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively) (Figure 2). These findings were found similar to those obtained from cells deriving from syndromes associated with moderate radiosensitivity, cancer proneness or accelerated aging [22–26]. It is noteworthy that the  $\gamma$ H2AX foci were either absent or impaired in AT cells, in agreement with the literature [8,27]. Again,  $\gamma$ H2AX data from AD data obeyed a correlation between  $\gamma$ H2AX and SF2 data established with 200 human fibroblast cell lines [14] (Figure S2).



**Figure 2.**  $\gamma$ H2AX foci data from AD fibroblasts. Representative immunofluorescence images of nuclear  $\gamma$ H2AX foci observed 10 min after irradiation (2 Gy X-rays) in the indicated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear  $\gamma$ H2AX foci per cell assessed before irradiation or at 10 min, 1 h, 4 h and 24 h post-irradiation. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$ .

In the frame of the RIANS model, the above data suggest a lack of ATM-dependent RI DSB recognition by NHEJ [8]. At the end of the repair process, trans-autophosphorylated ATM (pATM) monomers formed ATM dimers that were revealed by the formation of pATM foci in the nucleus and by a broader staining in the cytoplasm [17]. It is noted that pATM-positive signals indicate the presence of ATM dimers, while the anti-ATM antibody cannot discriminate ATM monomers and dimers [17,32]. By applying anti-pATM immunofluorescence, the number of RI pATM foci in AD fibroblasts at 10 min post-irradiation appeared significantly lower than in the radioresistant controls ( $p < 0.01$ ) (Figure 3). Such observation was consolidated by pATM immunoblots of nuclear extracts that showed a lower increase of the nuclear pATM molecules at 10 min post-irradiation in AD fibroblasts than in the

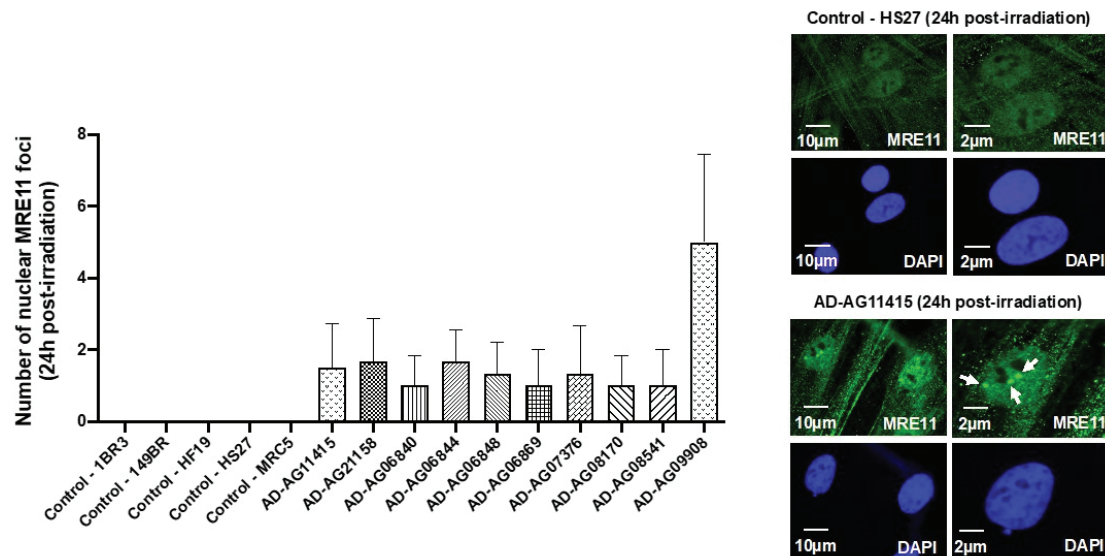
radioresistant controls (Figure 3). It is noteworthy that qPCR analysis of ATM synthesis did not reveal any difference between the radioresistant controls and the AD fibroblasts, suggesting that the RIANS is independent of the ATM protein synthesis. Besides, the pATM data observed at 10 min post-irradiation were unlikely due to any change of ATM expression that may generally occur some hours post-irradiation. Again, these findings were consistent with the pATM data observed in syndromes associated with moderate radiosensitivity, cancer proneness or accelerated aging [22–26]. Lastly, it must be stressed that AD data also obeyed a correlation between pATM and SF2 data that has been established with 200 other human fibroblast cell lines [14] (Figure S3).



**Figure 3.** pATM foci and immunoblot data from AD fibroblasts. (A) Representative immunofluorescence images of nuclear pATM foci observed 10 min after irradiation (2 Gy X-rays) in the indicated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear pATM foci per cell assessed before irradiation or at 10 min, 1, 4 and 24 h post-irradiation. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. \*\*\*,  $p < 0.001$ . (B) Immunoblots performed with anti-pATM antibodies in nuclear extracts from cells processed before irradiation or at 10 min and 1 h post-irradiation (2 Gy X-rays). Topoisomerase I and  $\alpha$ -tubulin served as cell fractionation and loading controls. The corresponding quantified Western blot bands were expressed as arbitrary units.

In our previous reports, a delayed RIANS was generally associated with abnormal radiation-induced re-localization of nuclear foci formed by the MRE11 nuclease. Particularly, cells from aging syndromes were found characterized by a delayed production of MRE11 foci, while cells from cancer syndromes generally showed early MRE11 foci [21]. By

applying anti-*MRE11* immunofluorescence, all the AD fibroblasts tested elicited a number of nuclear *MRE11* foci at 24 h post-irradiation, significantly higher than that of the controls ( $p < 0.01$ ), again supporting the relationship between late *MRE11* foci and aging (Figure 4).



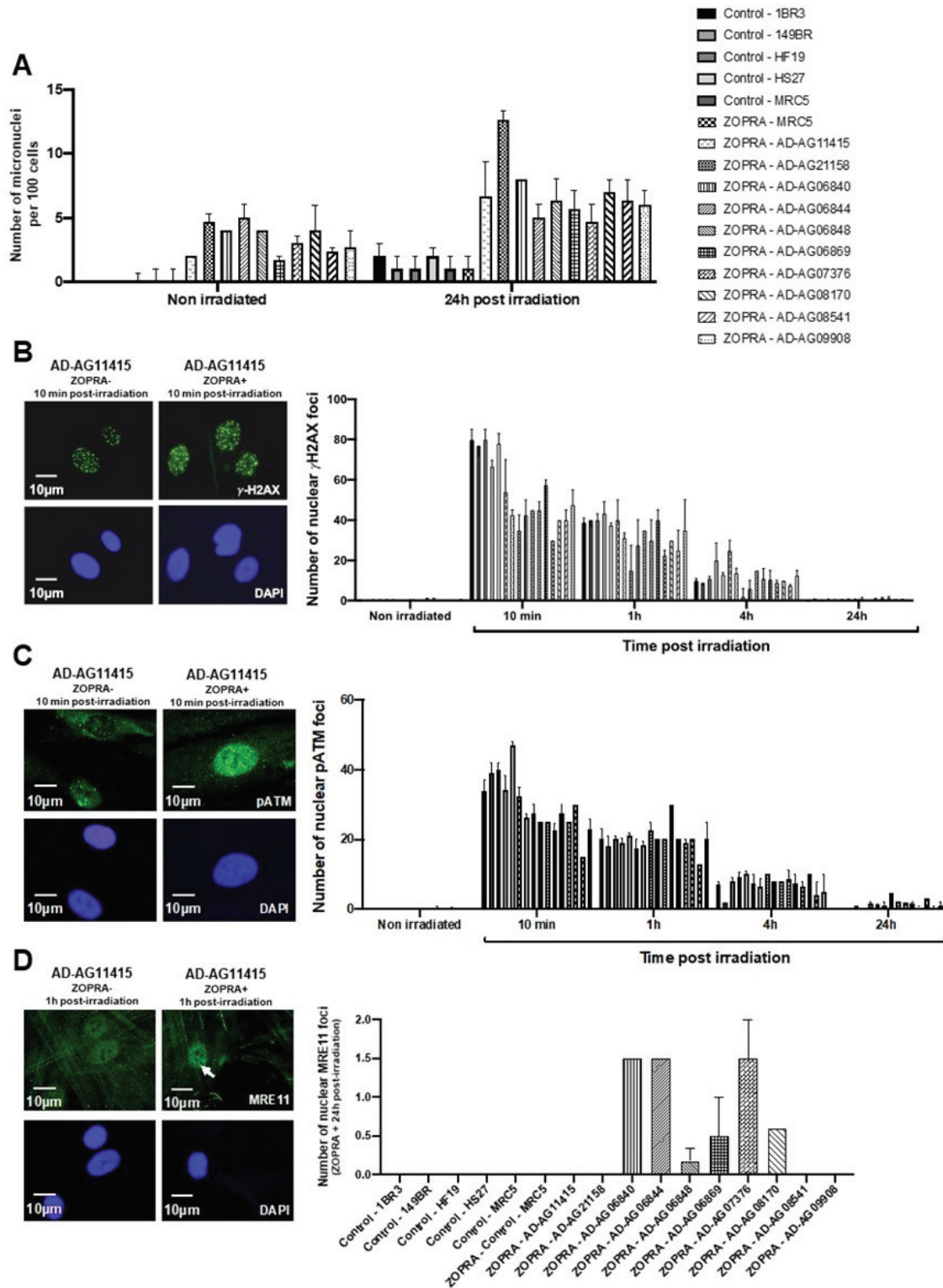
**Figure 4.** *MRE11* foci from AD fibroblasts. Representative immunofluorescence images of nuclear *MRE11* foci observed 24 h after irradiation (2 Gy X-rays) in the indicated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear *MRE11* foci per cell assessed before irradiation or at 24 h post-irradiation. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. White arrows indicate the nuclear *MRE11* foci.

Altogether, our findings suggested that AD is associated with significant but moderate cellular radiosensitivity with impaired yields of micronuclei,  $\gamma$ H2AX, pATM and *MRE11* foci, consistent with a delayed RIANs. It must be stressed here that the radiobiological features of the 10 AD fibroblast cell lines tested were not found to be dependent on age, gender or the genotype of the corresponding donors (Table 1 and Figure S4). Furthermore, all the relationships between the different RIANs biomarkers tested obeyed inter-correlations recently established with 200 fibroblast cell lines, showing a large spectrum of radiosensitivity [14] (see Supplementary Data), which suggests a strong quantitative relevance between the data assessed in AD cells.

### 3.2. Combination of Zoledronate and Pravastatin May Partially Protect Some AD Fibroblasts from IR

In the frame of the RIANs model, it was shown that bringing more ATM monomers into the nucleus significantly contributed to enhancing the radioresistance [17,35]. A radio-protective effect with the combination of bisphosphonates and statins, particularly with zoledronate and pravastatin (ZOPRA), was reported: the ZOPRA treatment accelerated the diffusion of the ATM monomers across the nuclear membrane in a number of genetic diseases [22–24,26,35]. Surprisingly, when applied to the 10 AD fibroblast cell lines, the ZOPRA treatment did not significantly change the yield of RI micronuclei (Figure 5A). It contributed to increase the number of  $\gamma$ H2AX (Figure 5B) and pATM foci assessed 10 min post-irradiation, but this trend was not significant for all the cell lines tested (Figure 5C). Regarding the *MRE11* foci, the late *MRE11* foci disappeared in only 4 of the 10 AD fibroblast cell lines (Figure 5D). Altogether, these findings suggest that the ZOPRA treatment may protect, at least partially, some AD fibroblasts from IR, while it has been applied more successfully in cancer syndromes with similar radiobiological features as AD cells [35]. It must be stressed that the ZOPRA treatment is not efficient in protecting the ATM-mutated cells since it cannot overcome the loss of the ATM protein function [35]. Besides, applying ATM inhibitors in our conditions would not help to understand the specificities of AD cells

since the activity of ATM kinase is required for the formation of ATM dimers, whether cytoplasmic or nuclear. The partial action of ZOPRA treatment in AD cells prompted us to hypothesize that ZOPRA molecules' diffusion in the nucleus was specifically prevented in AD cells, and we further investigated the cellular features of AD cells.



**Figure 5.** Effects of the ZOPRA treatment on AD fibroblasts. (A) Histogram showing the number of micronuclei per 100 cells in ZOPRA- and non-ZOPRA-treated cells, as indicated. After ZOPRA treatment, cells were exposed at 2 Gy X-rays, followed by 24 h for repair. The non-ZOPRA-treated.

cell data are those shown in Figure 1A. Each bar represents the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three replicates, at least. (B) Representative immunofluorescence images of nuclear  $\gamma$ H2AX foci observed after or without ZOPRA treatment, followed by 2 Gy X-rays and 10 min for repair. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear  $\gamma$ H2AX foci per cell observed in ZOPRA-treated cells irradiated at 2 Gy, followed by the indicated times for repair. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. (C) Representative immunofluorescence images of nuclear pATM foci observed after or without ZOPRA treatment, followed by 2 Gy X-rays and 10 min for repair. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear pATM foci per cell observed in ZOPRA-treated cells irradiated at 2 Gy, followed by the indicated times for repair. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. (D) Representative immunofluorescence images of nuclear MRE11 foci observed after or without ZOPRA treatment, followed by 2 Gy X-rays and 24 h for repair. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. Histogram showing the number of nuclear pATM foci per cell observed in ZOPRA-treated cells irradiated at 2 Gy, followed by 24 h for repair. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates, at least. White arrows indicate nuclear pATM foci.

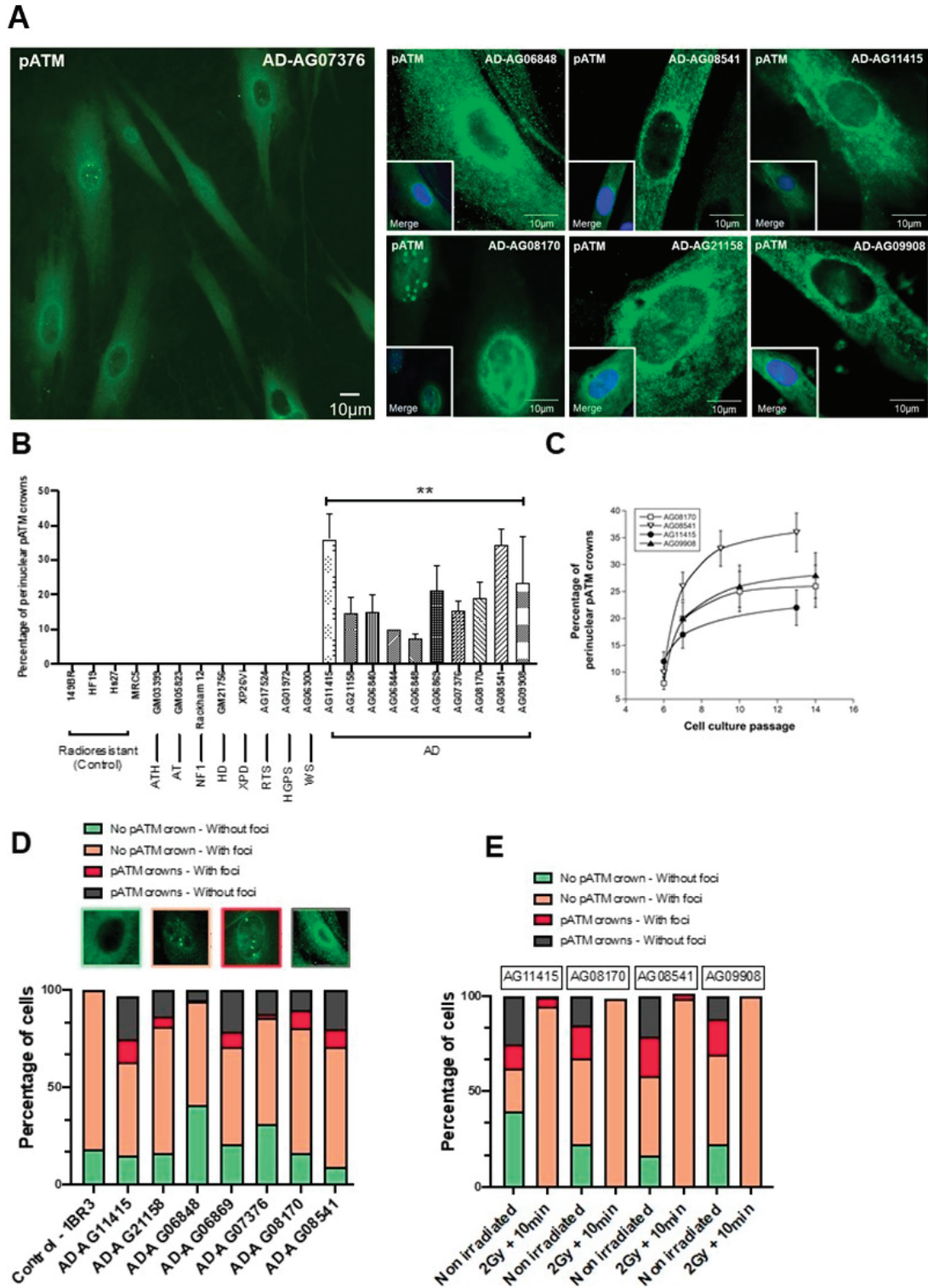
### 3.3. AD Fibroblasts Spontaneously Show Specific Abnormal Perinuclear Localization of the ATM Protein

During the immunofluorescence experiments described above, a strong perinuclear pATM staining was noticed in non-irradiated AD fibroblasts, suggesting an abnormally high concentration of ATM dimers around the nuclear membrane. The percentage of cells with perinuclear pATM crowns varied from 7 to 44 at the lowest passages tested, among the AD cell lines tested (Figure 6A,B). No correlation was found between the percentage of cells with perinuclear pATM crowns and the age at the skin sampling gender or known mutation status of the AD donors, consistent with the fact that these last three endpoints are not necessarily linked to the AD progress (Figure S4). In contrast, the percentage of cells with perinuclear pATM crowns in AD cells progressively increased as a function of the cell culture passage and reached a plateau, suggesting a sigmoidal function of the passage with a threshold (ranging from passage 7 to 10) and a plateau (ranging from 20% to 40% of cells with perinuclear pATM crowns) (Figure 6C).

The perinuclear pATM crowns were totally absent in radioresistant controls cultured in the same passage range, whether irradiated or not (Figure 6B). Again, in the same passage range, no perinuclear pATM crown was observed in the non-AD fibroblasts derived from the other genetic syndromes described in Table 1, regardless of their radiosensitivity and whether they were irradiated or not (Figure 6B). It must be stressed that this statement is particularly true for fibroblasts from Huntington's disease (HD), Hutchinson–Gilford progeroid syndrome (HGPS), Xeroderma Pigmentosum D (XPD), Werner's syndrome (WS) and tuberous sclerosis complex syndrome (TSC), suggesting a strong specificity of this molecular feature for AD among the neurodegenerative or aging diseases tested (Figure 6B). Lastly, no perinuclear pATM crown was observed in the 200 radiosensitive skin fibroblasts of the COPERNIC collection derived from non-AD cancer patients treated by radiotherapy [8].

In each of the non-irradiated AD fibroblast cell lines tested, we identified four different patterns of pATM staining with different relative proportions, supporting a great heterogeneity in the AD fibroblast populations, but also an ordered temporal progression among the different patterns: (1) Cytoplasmic pATM broad staining without nuclear pATM foci, reflecting the absence of significant genotoxic stress, as observed in a number of non-AD fibroblasts and in radioresistant controls. (2) Cytoplasmic pATM broad staining with nuclear pATM foci, reflecting the presence of significant genotoxic stress, as observed in some cases of non-AD fibroblasts showing spontaneous DSB. (3) Perinuclear pATM crowns with nuclear pATM foci, suggesting that pATM molecules were still able to cross the nuclear membrane, as observed in AD fibroblasts only. (4) Perinuclear pATM crowns without pATM foci, suggesting that pATM molecules were unable to cross the nuclear membrane,

as observed in AD fibroblasts only. The ordered succession of these four patterns suggested a specific response to stress that may result in an agglutination or a “traffic-jam” of ATM molecules around the nuclear membrane, preventing the ATM nucleoshuttling and maybe the diffusion of ZOPRA molecules (Figure 6D).



**Figure 6.** Specific spontaneous perinuclear localization of pATM in AD fibroblasts. (A) Representative immunofluorescence images of the perinuclear localization of pATM protein in AD cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. (B) Histogram showing the percentage of spontaneous.

perinuclear pATM crowns observed in the indicated non-irradiated cells after an anti-pATM immunofluorescence. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of four replicates, at least. \*\*,  $p < 0.01$ . (C) Percentage of perinuclear pATM crowns as a function of cell culture passage in the indicated AD cells. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of three replicates. (D) Relative proportions of four specific patterns of the perinuclear pATM crowns observed in the indicated cells after anti-pATM immunofluorescence. The data were obtained during the experiments that served for the quantification of the pATM crowns in cells (shown in panel B). (E) Relative proportions of four specific patterns of the perinuclear pATM crowns observed in the indicated cells after anti-pATM immunofluorescence, assessed before or after irradiation (2 Gy + 10 min).

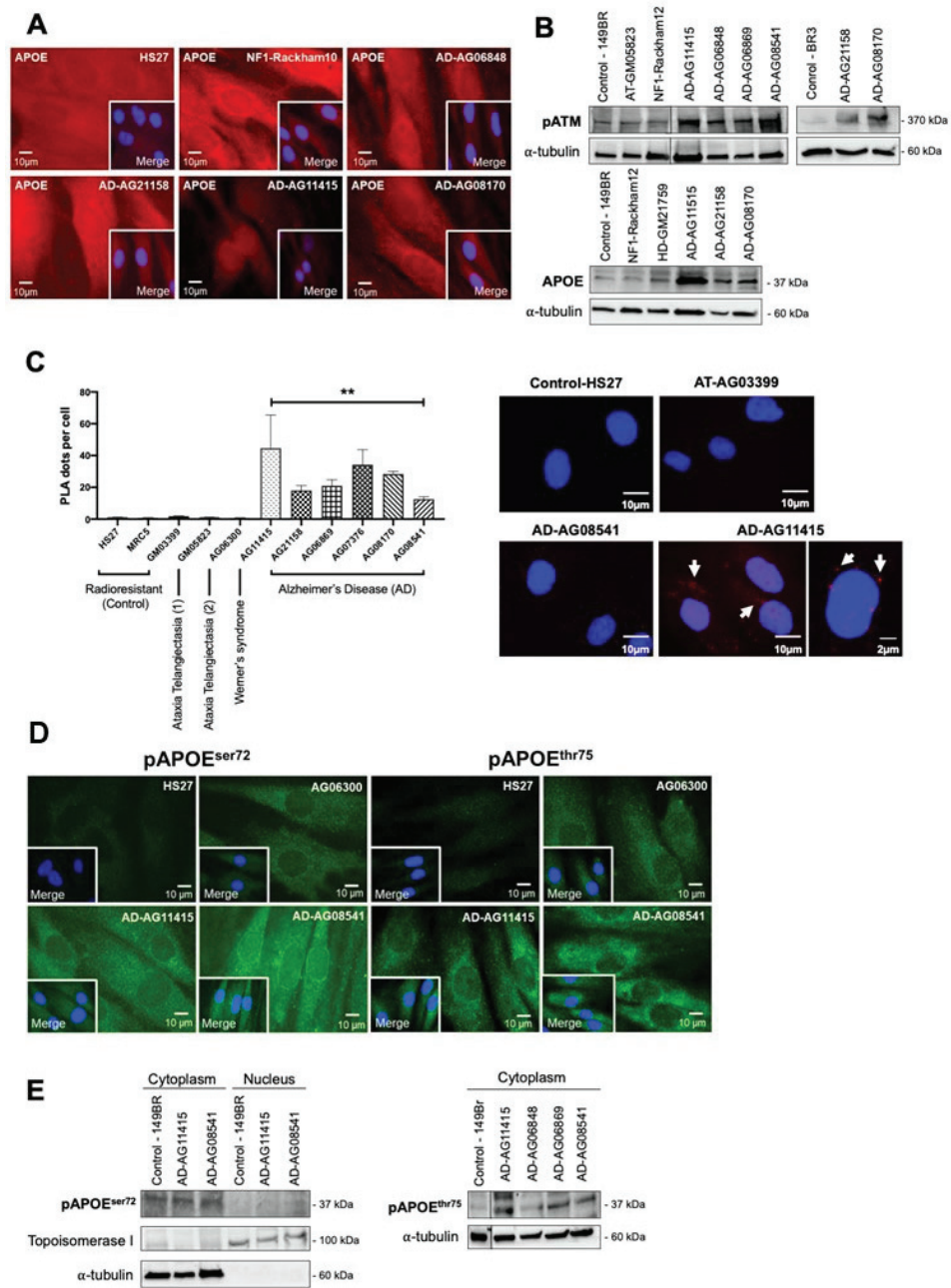
After irradiation, the number of these perinuclear pATM crowns (patterns 3 and 4) drastically decreased 10 min after 2 Gy, regardless of the AD fibroblasts tested (Figure 6E). Since the pATM signals disappeared after irradiation, these findings suggest that the irradiation triggers the monomerization of ATM dimers, at least transiently.

### 3.4. AD Fibroblasts Show a Specific Protein Partnership between ATM and APOE Proteins

In the frame of the RIANs model, the ATM dimers dissociated in monomers in response to the oxidative stress [17], as already suggested [32]. Such monomers may be sequestered in the cytoplasm by overexpressed protein ATM substrates, called “X-proteins”: we have shown that each genetic disease associated with moderate radiosensitivity and delayed RIANs was characterized by one X-protein, at least [17]. We therefore examined which X-protein may be specifically both overexpressed in the cytoplasm and phosphorylated by ATM in AD fibroblasts. Among the potential X-protein candidates for AD, we quickly eliminated the  $\beta$ -amyloid peptides and the tau proteins since they did not show evident perinuclear staining in the 10 AD fibroblasts tested. In contrast, it appeared that the APOE protein, that is currently documented in AD research [43], showed: (1) Spontaneous cytoplasmic and perinuclear localization of APOE protein in the 10 AD fibroblasts tested, similar to fibroblasts provided from some other neurodegenerative or aging syndromes, when observed with anti-APOE immunofluorescence (Figure 7A). (2) Spontaneous cytoplasmic overexpression of APOE and pATM proteins, higher in all the AD fibroblasts tested than in controls, when observed by immunoblots with cytoplasmic extracts (Figure 7B). (3) A specific cytoplasmic interaction between ATM and APOE proteins in all the AD fibroblasts tested when observed with the proximity ligation assay (PLA) (Figure 7C).

Particularly, the PLA revealed dots (or foci) of interaction between ATM and APOE proteins that were found significantly more numerous in the cytoplasm of AD cells than in radioresistant controls. In fibroblasts derived from neurodegenerative or aging syndromes such as Werner’s syndrome, the PLA foci were either absent or much less numerous ( $p < 0.001$ ). Lastly, it is noteworthy that such PLA dots were also absent in ATM-mutated fibroblasts. It is also noteworthy that there is no human syndrome associated with null expression of APOE to serve as a negative control (Figure 7C).

Interestingly, the in silico analysis of the APOE sequence revealed the presence of two putative ATM phosphorylation SQ/TQ domains defined elsewhere [44]: the APOE<sup>ser72</sup> and the APOE<sup>thr75</sup>. In order to investigate whether these domains were involved in the interaction between ATM and APOE, we developed phosphospecific antibodies against both phosphorylated forms. Immunofluorescence analysis clearly showed that both spontaneous pAPOE signals were mainly localized in the cytoplasm and were stronger in the cytoplasm than in the nucleus. Furthermore, the pAPOE signals were also higher in AD fibroblasts than in controls. However, the conclusions reached with immunoblots were less clear: while both anti-pAPOE<sup>ser72</sup> and anti-pAPOE<sup>thr75</sup> antibodies revealed significant cytoplasmic forms of pAPOE, the anti-pAPOE<sup>thr75</sup> antibody did not provide reproducible and clear signals from nuclear extracts, suggesting a potential rarity and/or instability of the specific pAPOE<sup>thr75</sup> in the nucleus (Figure 7D,E).



**Figure 7.** ATM and APOE interactions in AD fibroblasts. (A) Representative immunofluorescence images of the spontaneous APOE subcellular localization in the indicated non-irradiated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. (B) Immunoblots performed with anti-pATM and anti-APOE antibodies on cytoplasmic extracts from the indicated non-irradiated cells. Alpha-tubulin served as a cell fractionation and loading control. (C) The proximity ligation assay (PLA) with anti-ATM and anti-APOE antibodies was performed on the indicated non-irradiated cells. Histogram showing the PLA dots scored by immunofluorescence microscopy, that represent the detected ATM–APOE interaction. Each plot represents the mean ± SEM of three replicates. Representative PLA immunofluorescence images in the indicated non-irradiated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. \*\*,  $p < 0.01$ . (D) Representative immunofluorescence images of the spontaneous pAPOE<sup>ser72</sup> and pAPOE<sup>thr75</sup> subcellular localization in the indicated non-irradiated cells. The DAPI signal served as nuclear counterstaining. (E) Immunoblots performed with anti-pAPOE<sup>ser72</sup> and -pAPOE<sup>thr75</sup> antibodies in cytoplasmic or nuclear extracts from the indicated cells. Topoisomerase I and alpha-tubulin served as loading controls and as cytoplasmic and nuclear cell fractionation controls, respectively.



Altogether, these data were consistent with the formation of perinuclear pATM crowns in non-irradiated AD fibroblasts that may contain specific ATM-phosphorylated forms of APOE protein.

#### 4. Discussion

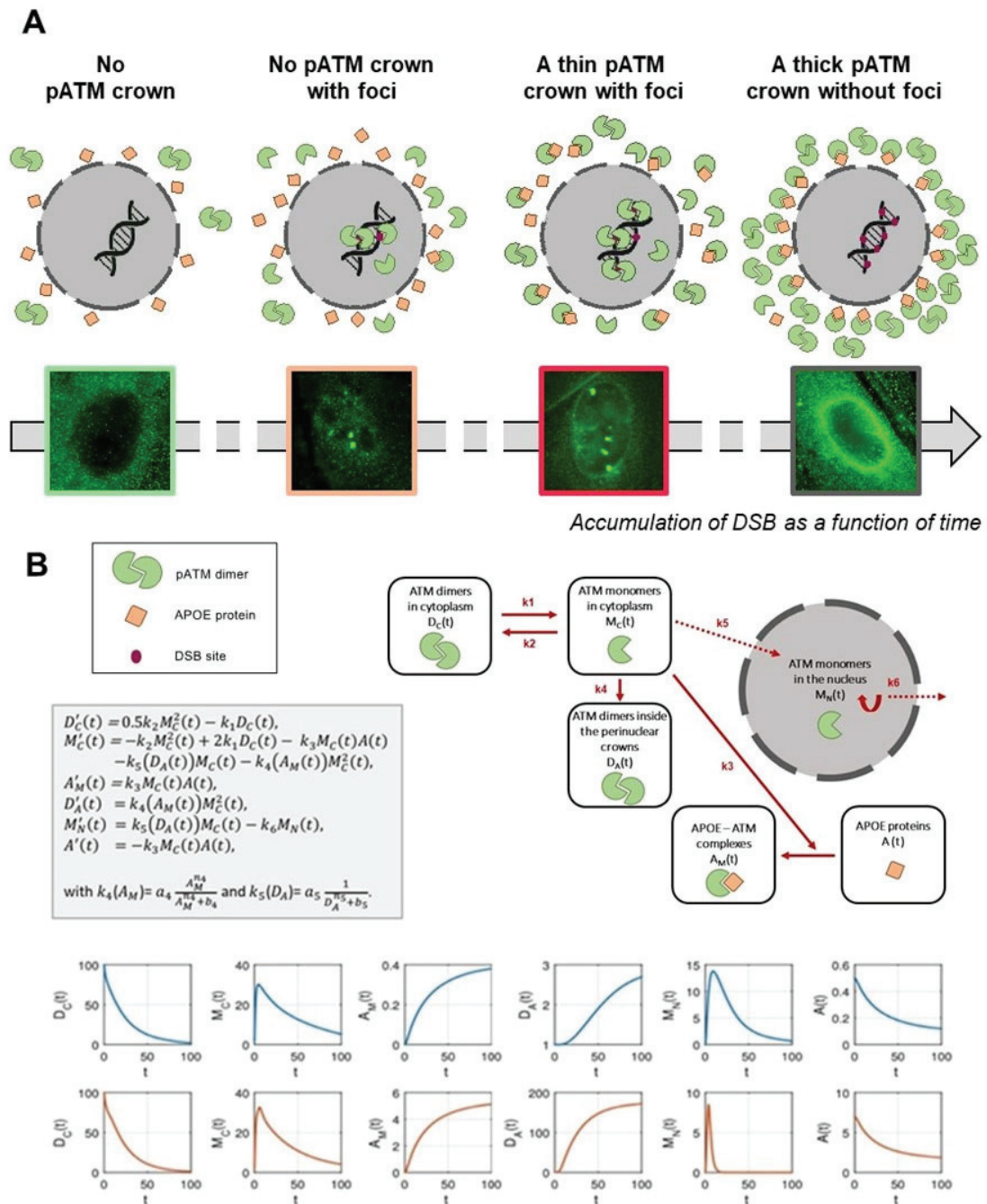
The initial goal of this study was to document, at the molecular level, the radiosensitivity of AD fibroblasts that was previously pointed out at the cellular scale [5–7]. To this aim, we deliberately chose to apply a routine approach based on the RIANs model. Such approach has been successfully applied to a number of genetic diseases, including aging syndromes [22–27]. During our investigations, a specific perinuclear localization of the pATM forms was noticed in all the non-irradiated AD fibroblast cell lines tested. This feature was not observed in any other fibroblast cell lines derived from the aging, cancer syndromes or apparently healthy donors tested at the same cell culture passages. In addition, the percentage of cells with perinuclear pATM crowns increased with the cell culture passage in AD fibroblasts, suggesting an age-dependent evolution. Such perinuclear pATM crowns disappeared, transiently at least, after an irradiation. We therefore hypothesized that these perinuclear crowns might be used as a specific biomarker of AD, for the early detection of AD, the progression of the disease, and potentially, for its treatment.

As described in Section 1, in the frame of the RIANs model, the RI oxidative stress causes the formation of ATM monomers from the cytoplasmic ATM dimers. The ATM monomers diffuse in the nucleus and participate to the recognition of DSB by NHEJ. A delayed RIANs caused by the sequestration of ATM monomers in the cytoplasm via overexpressed cytoplasmic ATM substrates (called X-proteins) provides moderate radiosensitivity associated with cancer proneness or accelerated aging [17]. Here, four molecular endpoints (micronuclei,  $\gamma$ H2AX, pATM and MRE11) converged to the same conclusions. Altogether, our data, through the RIANs model, provide the first molecular explanation of the radiosensitivity of cells derived from AD patients, in agreement with the historical observations at the cellular scale [5–7].

The spontaneous perinuclear localization of pATM forms prompted us to identify any X-protein candidate that would localize very close to the nuclear membrane in AD cells. Unlike  $\beta$ -amyloid peptides and tau proteins, the APOE protein reached the three major requirements: (1) APOE was found implicated in certain forms of AD, although there is still confusion between the roles of an overexpressed APOE protein in cells and the APOE $\epsilon$  polymorphism status [43]. (2) In silico studies showed that APOE holds putative ATM phosphorylation SQ/TQ domains [44]. (3) APOE, as an apolipoprotein, was found to be involved in the protein trafficking through cellular and nuclear membranes and the regulation to cholesterol [45–47]. Four observations consolidated our hypothesis: (1) APOE was found spontaneously more expressed in all the AD fibroblasts tested than in the controls (Figure 8B), (2) a partnership between ATM and APOE may occur through SQ/TQ phosphorylation (Figure 8), (3) PLA data suggested that some ATM-APOE complexes may be found close to the nuclear membrane (Figure 7C), and (4) the localization of the phosphospecific forms of the APOE (pAPOE) was consistent with the ATM-pAPOE interaction (Figure 7C,D). At this point, it is important to recall that the anti-pATM<sup>ser1981</sup> antibodies specifically reveal auto-phosphorylated dimers and not ATM monomers [17]. Hence, the presence of a perinuclear pATM crown revealed by anti-pATM immunofluorescence suggests a high concentration of ATM dimers close to the nuclear membrane.

What scenario may unify both the high accumulation of ATM dimers and ATM-pAPOE complexes? A permanent oxidative stress is responsible for the formation of spontaneous DNA breaks, but also for a continuous monomerization of the ATM dimers, as already suggested by treating cells with hydrogen peroxide [32]. Hence, some ATM monomers may be sequestered in the close vicinity of the nuclear membrane by APOE proteins, explaining the specific phosphorylated forms of APOE (pAPOE) revealed by the pAPOE<sup>ser72</sup> or pAPOE<sup>thr75</sup> immunofluorescence and the PLA data (Figure 7). Once the ATM-pAPOE complexes form, the stress-induced diffusion of ATM monomers may

progressively cause a highly localized concentration of ATM monomers, leading to ATM re-dimerization, and therefore producing a pATM perinuclear crown, easily visible with anti-pATM immunofluorescence. Hence, this model of accretion of ATM monomers strongly suggests that the perinuclear crowns of pATM are composed of an inner layer formed by ATM monomers, and that pAPOE forms and an outer layer formed by ATM dimers. In a cumulative and progressive process, this phenomenon may specifically contribute in AD cells to an increase of the number of cells with perinuclear pATM crowns and an increase of the crown “thickness”. Such model is, therefore, consistent with the patterns 1, 2, 3 and 4 described in Figure 8.



**Figure 8.** (A) Mechanistic model of the formation of the perinuclear pATM crowns in AD fibroblasts. The environmental stress, amplified by the potential predisposition to DNA damage impairment, produces oxidative stress, causing DNA strand breaks and monomerization of cytoplasmic ATM.

dimers, consistent with the RIANS model. In a context in which APOE, an ATM phosphorylation substrate, is overexpressed, the ATM monomers phosphorylate and preferentially bind to APOE by forming ATM-APOE complexes, instead of diffusing in the nucleus to recognized DSB, and trigger their repair by NHEJ. These complexes progressively prevent the ATM nucleoshuttling, which increases the concentration of ATM monomers around the nucleus. As a result, ATM monomers re-associate by forming ATM dimers around the nucleus, which prevents recognition of DSB that accumulate in nucleus. This re-dimerization of ATM monomers is easily visible by immunofluorescence as perinuclear pATM crowns. **(B)** Mathematical modeling of the formation of perinuclear pATM crowns. The first equation in  $D_C$  represents the variation of ATM dimers,  $D_C'(t)$ . The first term on the right side represents the formation of a dimer from two monomers, and the second term stands for the monomerization of an ATM dimer into two ATM monomers. Similarly, in the second equation, the right side describes, respectively, the dimerization, the monomerization, the APOE-ATM complex formation, the passage to the nucleus and the pATM crown, populated by dimerization in the crown. The third equation describes the formation of the APOE-ATM complex, and the fourth equation describes the crowding of the crown through dimerization of ATM monomers in the nucleus neighborhood. The fifth equation represents the passage to the nucleus with a degradation term, and the last equation stands for the loss of the free APOE protein to form a complex with ATM monomers. Representative examples of the variations of each parameter are shown in blue for non-AD radioresistant controls and in red for AD cells.

In order to support the above mechanistic model, and notably the occurrence of the different patterns of the pATM perinuclear crowns shown in Figure 3, we designed a brand-new mathematical approach consisting of six nonlinear differential equations. Each equation describes the kinetics of the concentrations of a specific protein form involved in the mechanistic model:  $D_C$  and  $M_C$ , time-dependent functions, reflect the ATM dimers and the ATM monomers in the cytoplasm, respectively.  $D_A$ ,  $A$  and  $A_M$ , time-dependent functions, reflect the dimers in the immediate vicinity of the nucleus, the free APOE monomers and the ATM-pAPOE complexes, respectively (Figure 8). Lastly,  $M_N$  reflects the nuclear ATM monomers varying with time. This mathematical approach was applied to simulate the consequences of a continuous oxidative stress induction with a low (such as in the controls) or a high cytoplasmic APOE protein level (such as in AD cells) (Figure 8). The resulting blue kinetics reflecting the control data clearly showed a slow production of ATM dimers, the absence of ATM-pAPOE complexation and a facilitated diffusion of ATM monomers in the nucleus (Figure 8). In contrast, in AD cells, the ATM-pAPOE complexation increased together with the formation of ATM dimers in the close vicinity of the nucleus. As a result, the function reflecting the ATM monomers in the nucleus rapidly decreased to zero. By further investigating this mathematical modeling, it was possible to explain the four perinuclear pATM crown patterns defined above. To this aim, initial  $A(0)$  parameter values were modified.

By considering both biological and mathematical models, the fact that the ZOPRA treatment did not fully correct the molecular AD phenotype with all four molecular endpoints tested (micronuclei,  $\gamma$ H2AX, pATM and MRE11) may be supported by the high concentration of ATM proteins cumulated in the close vicinity of the nucleus that did not help the statins and bisphosphonates to diffuse in the nucleus. In contrast, both models can also explain that a dose of IR, such as that mimicking a standard radiotherapy session, may cause a massive monomerization of ATM dimers early after irradiation, leading to the destruction of the perinuclear pATM crowns. Further investigations are, however, required to evaluate the benefit of a ZOPRA treatment in AD patients after radiotherapy, and to explore whether radiotherapy may influence the pattern and/or the number of perinuclear pATM crowns, as suggested in Figure 6D.

The spontaneous perinuclear pATM and pAPOE crowns found specifically in AD fibroblasts raised several questions about their potential role as specific biomarkers of AD: can they help in the detection of AD, the estimation of the disease progression and/or the definition of a possible predisposition to AD? Our experimental findings and the associated mathematical model were consistent with a progressive acceleration of aging due to non-

recognized DNA breaks that cumulate in the nucleus throughout life. Such statement is consistent with numerous studies suggesting that AD results from a cumulative oxidative stress [48,49]. Can our observations in AD fibroblasts reflect the same biological features in brain cells, notably in hippocampus cells? The relevance of the RIANS model has been verified in numerous tissues, including brain astrocytes [50]. Furthermore, cutaneous fibroblasts were shown to be the tissue model more representative of the individual response to IR than the other tissues [8]. Nevertheless, to sample brain cells would raise many more ethical and practical problems than skin biopsies. While brain cells are characterized by a low concentration of ATM protein [51] and most ATM molecules were found cytoplasmic [28–32], our findings may be consistent with a slower and less efficient ATM nucleoshuttling in brain cells, accompanied by a higher sensitivity to DNA breaks, with more significant clinical consequences than those observed in skin fibroblasts. Further investigations are needed to verify this hypothesis.

The cumulative nature of the perinuclear pATM and pAPOE crowns' formation also raised the question of a correlation between the yield or the pattern of the crowns and the disease progression. In this study, the clinical data about the progression of the disease in the 10 AD cell lines were not available. Besides, it must be stressed that post-mortem human brain data would not be useful to answer this question since they would not provide the threshold of perinuclear pATM crowns necessary for significant clinical features. Furthermore, the causes of cellular death and the progression of AD are not likely to be equally correlated with the perinuclear pATM crowns. Again, further clinical investigations will help document the AD progression and its associated clinical criteria.

Finally, our findings raised the question of a potential predisposition to AD that would be based on the existence of a significant amount of perinuclear pATM crowns at the earliest age. However, our experimental data and the mathematical model suggest that the environmental stress and the genetic factors may unequally contribute to increase or even accelerate the formation of perinuclear pATM crowns. Such hypothesis may explain the heterogeneity of the AD cases, notably vis-à-vis the age at diagnosis.

## 5. Conclusions

Altogether, our experimental findings and the mathematical model were consistent with the hypothesis that in the development of AD, there is a progressive accumulation of ATM-pAPOE and pATM-pATM dimeric complexes around the nuclear membrane in response to oxidative stress throughout life, facilitated by the predisposition of overexpressed APOE protein in the cytoplasm. Such specific subcellular localization of ATM may prevent the RIANS, i.e., the recognition and repair of DNA strand breaks by the ATM kinase. Irradiation may make the perinuclear pATM crowns disappear. For the first time, to our knowledge, the ATM kinase was shown to be involved in the pathology of AD, and its interaction with APOE may play a major role in aging, which may lead to a new approach in the understanding of AD. Particularly, with further investigations, our findings may help in the definition and the detection of individual predisposition to AD, helpful in the early diagnosis of AD.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12131747/s1>, Figure S1: Correlation between SF2 and residual micronuclei data. Figure S2: Correlation between SF2 and residual  $\gamma$ H2AX foci data. Figure S3: Correlation between SF2 and pATMmax data. Figure S4: The number of perinuclear pATM crowns per 100 cells vs. the age at skin sampling.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.B., M.B. and N.F.; software, A.C. and L.P.-M.; data acquisition and methodology, E.B., L.P.-M., L.S., E.L.R., J.A.-C., A.G., A.C., M.L.F., C.D. and S.P.; validation and data analysis, E.B., L.P.-M., L.S., E.L.R., J.A.-C., A.G., A.C., M.L.F., C.D., S.P. and N.F.; writing and original draft preparation, E.B., M.B. and N.F.; review and editing, E.B., L.P.-M., L.S., E.L.R., J.A.-C., A.G., C.D., M.L.F., A.C., S.P., M.B. and N.F.; project administration and funding acquisition, N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'Avenir—INDIRA project, N.F.), Association Neurofibromatose et Recklinghausen (RACKHAM project, N.F.), National Space Agency (CNES) (ATHENA and BERNADOTTE projects, N.F.) and Inserm Transfert (TAG-MAAL Project).

**Institutional Review Board Statement:** Besides the notable exception of the cell lines belonging to the COPERNIC collection (see Table 1), all the fibroblast cell lines used in this study were purchased from commercial repositories (see the Materials and Methods Section). As already mentioned in the Materials and Methods Section, this study was performed with some fibroblast cell lines from the COPERNIC collection, which was approved by the regional Ethical Committee. Cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437 and DC2021-3957 to the Ministry of Research. The database was declared under the reference number IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300 to the Ministry of Research.

**Informed Consent Statement:** The commercial repositories that provided the fibroblast cell lines used in this study applied all the ethics and regulations related to human samplings. All the anonymous COPERNIC patients were informed and signed consent according to the ethics recommendations, notably for their consent to participate and for the publication of anonymous data (informed and written consent, anonymization and acceptance for publication).

**Data Availability Statement:** The data presented here are either present in a deposited database (see the Materials and Methods Section) or will be made available upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We thank Sylvie Bouvier and Erick Mercier from CHU de Nimes, France, for their technical assistance with the APOE genotyping.

**Conflicts of Interest:** A patent related to the early diagnosis of Alzheimer's disease from the perinuclear ATM crowns was deposited under the reference number 23305025.1 on 9 January 2023.

## References

1. Sery, O.; Povova, J.; Misek, I.; Pesak, L.; Janout, V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: A review. *Folia Neuropathol.* **2013**, *51*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nikolac Perkovic, M.; Pivac, N. Genetic Markers of Alzheimer's Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1192*, 27–52.
3. Glenner, G.G.; Wong, C.W.; Quaranta, V.; Eanes, E.D. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: Their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* **1984**, *2*, 357–369. [[PubMed](#)]
4. Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y.C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H.M.; Binder, L.I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4913–4917. [[CrossRef](#)]
5. Tobi, S.E.; Moquet, J.E.; Edwards, A.A.; Lloyd, D.C.; Itzhaki, R.F. Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *J. Med. Genet.* **1990**, *27*, 437–440. [[CrossRef](#)]
6. Robbins, J.H.; Otsuka, F.; Tarone, R.E.; Polinsky, R.J.; Brumback, R.A.; Nee, L.E. Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Hypersensitivity to X rays in cultured cell lines. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1985**, *48*, 916–923. [[CrossRef](#)]
7. Smith, T.A.; Itzhaki, R.F. Radiosensitivity of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Mutat. Res.* **1989**, *217*, 11–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.; Forcheron, F.; Viau, M.; et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 450–460. [[CrossRef](#)]
9. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)]
10. Pereira, S.; Bodgi, L.; Duclos, M.; Canet, A.; Ferlazzo, M.L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Deneuve, S.; Vogin, G.; Foray, N. Fast and binary assay for predicting radiosensitivity based on the nucleoshuttling of ATM protein: Development, validation and performances. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *100*, 353–360. [[CrossRef](#)]
11. Belkacemi, Y.; Colson-Durand, L.; Granzotto, A.; Husheng, S.; To, N.H.; Majdoul, S.; Guet, S.; Herve, M.L.; Fonteneau, G.; Diana, C.; et al. The Henri Mondor Procedure of Morbidity and Mortality Review Meetings: Prospective Registration of Clinical, Dosimetric, and Individual Radiosensitivity Data of Patients with Severe Radiation Toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *96*, 629–636. [[CrossRef](#)]
12. Vogin, G.; Bastogne, T.; Bodgi, L.; Gillet-Daubin, J.; Canet, A.; Pereira, S.; Foray, N. The Phosphorylated ATM Immunofluorescence Assay: A High-performance Radiosensitivity Assay to Predict Postradiation Therapy Overreactions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *101*, 690–693. [[CrossRef](#)]
13. Deneuve, S.; Mirjolet, C.; Bastogne, T.; Duclos, M.; Retif, P.; Zrounba, P.; Roux, P.-E.; Poupart, M.; Vogin, G.; Foray, N.; et al. Proof of Concept of a Binary Blood Assay for Predicting Radiosensitivity. *Cancers* **2021**, *13*, 2477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. [[CrossRef](#)]
15. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose-Response A Publ. Int. Hormesis Soc.* **2020**, *18*, 1559325820913784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-Response A Publ. Int. Hormesis Soc.* **2018**, *16*, 1559325818789836. [[CrossRef](#)]
17. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Viau, M.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Pereira, S.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Devic, C.; Fervers, B.; Charlet, L.; et al. DNA Double-Strand Breaks Induced in Human Cells by Twelve Metallic Species: Quantitative Inter-Comparisons and Influence of the ATM Protein. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Fervers, B.; Charlet, L.; Foray, N. DNA Double-Strand Breaks Induced in Human Cells by 6 Current Pesticides: Intercomparisons and Influence of the ATM Protein. *Biomolecules* **2022**, *12*, 250. [[CrossRef](#)]
20. Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. Rev.* **2016**, *770*, 369–386. [[CrossRef](#)]
21. El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.; Leblond, P.; Combemale, P.; et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ferlazzo, M.L.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Lartin, O.; Devic, C.; Vogin, G.; Pereira, S.; Foray, N. Mutations of the Huntington's Disease Protein Impact on the ATM-Dependent Signaling and Repair Pathways of the Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks: Corrective Effect of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49*, 1200–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ferlazzo, M.L.; Bach-Tobdji, M.K.E.; Djerad, A.; Sonzogni, L.; Burlet, S.F.; Devic, C.; Granzotto, A.; Bodgi, L.; Djefal-Kerrar, A.; Foray, N. Radiobiological characterization of tuberous sclerosis: A delay in the nucleo-shuttling of ATM may be responsible for radiosensitivity. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *55*, 4973–4983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)]
25. Moulay Lakhdar, I.; Ferlazzo, M.L.; Al Choboq, J.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Thariat, J.; Foray, N. Fibroblasts from Retinoblastoma Patients Show Radiosensitivity Linked to Abnormal Localization of the ATM Protein. *Curr. Eye Res.* **2020**, *46*, 546–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Combemale, P.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Bencokova, Z.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Burlet, S.F.; Pinson, S.; Amini-Adle, M.; Al-Choboq, J.; et al. Individual Response to Radiation of Individuals with Neurofibromatosis Type I: Role of the ATM Protein and Influence of Statins and Bisphosphonates. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *59*, 556–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Al-Choboq, J.; Nehal, M.; Sonzogni, L.; Granzotto, A.; El Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Maalouf, M.; Berthel, E.; Aral, B.; Corradini, N.; et al. Molecular and Cellular Responses to Ionization Radiation in Untransformed Fibroblasts from the Rothmund-Thomson Syndrome: Influence of the Nucleo-Shuttling of the ATM Protein Kinase. *Radiation* **2023**, *3*, 21–38. [[CrossRef](#)]
28. Watters, D.; Khanna, K.K.; Beamish, H.; Birrell, G.; Spring, K.; Kedar, P.; Gatei, M.; Stenzel, D.; Hobson, K.; Kozlov, S.; et al. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* **1997**, *14*, 1911–1921. [[CrossRef](#)]
29. Alexander, A.; Cai, S.L.; Kim, J.; Nanez, A.; Sahin, M.; MacLean, K.H.; Inoki, K.; Guan, K.L.; Shen, J.; Person, M.D.; et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4153–4158. [[CrossRef](#)]
30. Guo, Z.; Kozlov, S.; Lavin, M.F.; Person, M.D.; Paull, T.T. ATM activation by oxidative stress. *Science* **2010**, *330*, 517–521. [[CrossRef](#)]
31. Slonina, D.; Kowalczyk, A.; Janecka-Widla, A.; Kabat, D.; Szatkowski, W.; Biesaga, B. Low-Dose Hypersensitive Response for Residual pATM and gammaH2AX Foci in Normal Fibroblasts of Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2018**, *100*, 756–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Paull, T.T. Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 711–738. [[CrossRef](#)]
33. Foray, N.; Priestley, A.; Alsbeih, G.; Badie, C.; Capulas, E.P.; Arlett, C.F.; Malaise, E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 271–283. [[PubMed](#)]
34. Varela, I.; Pereira, S.; Ugalde, A.P.; Navarro, C.L.; Suarez, M.F.; Cau, P.; Cadinanos, J.; Osorio, F.G.; Foray, N.; Cobo, J.; et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 767–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Restier-Verlet, J.; Drouet, M.; Pras, P.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Al-Choboq, J.; El Nachef, L.; Francois, S.; Bourguignon, M.; et al. Molecular Influence of the ATM Protein in the Treatment of Human Cells with Different Radioprotective Drugs: Comparisons between Antioxidative and Pro-Episkevic Strategies. *Biomolecules* **2023**, *13*, 524. [[CrossRef](#)]

36. Fertil, B.; Malaise, E.P. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1981**, *7*, 621–629. [[CrossRef](#)]
37. Foray, N.; Marot, D.; Gabriel, A.; Randrianarison, V.; Carr, A.M.; Perricaudet, M.; Ashworth, A.; Jeggo, P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2860–2871. [[CrossRef](#)]
38. Ristic, M.; Brockly, F.; Piechaczyk, M.; Bossis, G. Detection of Protein-Protein Interactions and Posttranslational Modifications Using the Proximity Ligation Assay: Application to the Study of the SUMO Pathway. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1449*, 279–290.
39. Deschavanne, P.J.; Fertil, B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1996**, *34*, 251–266. [[CrossRef](#)]
40. Weichselbaum, R.R.; Nove, J.; Little, J.B. X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 920–925.
41. Arlett, C.F.; Harcourt, S.A. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res.* **1980**, *40*, 926–932.
42. Rothkamm, K.; Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Serrano-Pozo, A.; Das, S.; Hyman, B.T. APOE and Alzheimer’s disease: Advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* **2021**, *20*, 68–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kim, S.T.; Lim, D.S.; Canman, C.E.; Kastan, M.B. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37538–37543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fenili, D.; McLaurin, J. Cholesterol and apoe: A target for Alzheimer’s disease therapeutics. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 553–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Getz, G.S.; Reardon, C.A. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3479. [[CrossRef](#)]
47. Dong, H.K.; Gim, J.A.; Yeo, S.H.; Kim, H.S. Integrated late onset Alzheimer’s disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives. *Gene* **2017**, *597*, 10–16. [[CrossRef](#)]
48. Angelova, P.R.; Abramov, A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: From physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 692–702. [[CrossRef](#)]
49. Collin, F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Granzotto, A.; Bencokova1, Z.; Vogin, G.; Devic, C.; Joubert, A.; Balosso, J.; Foray, N. DNA double-strand breaks repair and signaling of human gliomas and normal brain cells in response to radiation: Potential impact of the ATM- and BRCA1-dependent pathways. In *Brain Tumors/Book 3*; Abujamra, A.L., Ed.; Intechweb: Rijeka, Croatia, 2011.
51. Soares, H.D.; Morgan, J.I.; McKinnon, P.J. Atm expression patterns suggest a contribution from the peripheral nervous system to the phenotype of ataxia-telangiectasia. *Neuroscience* **1998**, *86*, 1045–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Article

# X-rays-Induced Bystander Effect Consists in the Formation of DNA Breaks in a Calcium-Dependent Manner: Influence of the Experimental Procedure and the Individual Factor

Juliette Restier-Verlet <sup>1,†</sup>, Aurélie Joubert <sup>1,†</sup>, Mélanie L. Ferlazzo <sup>1</sup>, Adeline Granzotto <sup>1</sup>, Laurène Sonzogni <sup>1</sup>, Joëlle Al-Choboq <sup>1</sup>, Laura El Nachef <sup>1</sup>, Eymeric Le Reun <sup>1</sup>, Michel Bourguignon <sup>1,2</sup> and Nicolas Foray <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1296 unit “Radiation: Defense/Health/Environment” Centre Léon-Bérard, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup> Department of Biophysics and Nuclear Medicine, Université Paris Saclay Versailles St Quentin en Yvelines, 78035 Versailles, France

\* Correspondence: nicolas.foray@inserm.fr; Tel.: +33-4-78-78-28-28

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Radiation-induced bystander effects (RIBE) describe the biological events occurring in non-targeted cells in the vicinity of irradiated ones. Various experimental procedures have been used to investigate RIBE. Interestingly, most micro-irradiation experiments have been performed with alpha particles, whereas most medium transfers have been done with X-rays. With their high fluence, synchrotron X-rays represent a real opportunity to study RIBE by applying these two approaches with the same radiation type. The RIBE induced in human fibroblasts by the medium transfer approach resulted in a generation of DNA double-strand breaks (DSB) occurring from 10 min to 4 h post-irradiation. Such RIBE was found to be dependent on dose and on the number of donor cells. The RIBE induced with the micro-irradiation approach produced DSB with the same temporal occurrence. Culture media containing high concentrations of phosphates were found to inhibit RIBE, while media rich in calcium increased it. The contribution of the RIBE to the biological dose was evaluated after synchrotron X-rays, media transfer, micro-irradiation, and 6 MeV photon irradiation mimicking a standard radiotherapy session: the RIBE may represent less than 1%, about 5%, and about 20% of the initial dose, respectively. However, RIBE may result in beneficial or otherwise deleterious effects in surrounding tissues according to their radiosensitivity status and their capacity to release Ca<sup>2+</sup> ions in response to radiation.

**Keywords:** bystander effect; DNA double-strand breaks; calcium; radiosensitivity



**Citation:** Restier-Verlet, J.; Joubert, A.; Ferlazzo, M.L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Al-Choboq, J.; El Nachef, L.; Le Reun, E.; Bourguignon, M.; Foray, N. X-rays-Induced Bystander Effect Consists in the Formation of DNA Breaks in a Calcium-Dependent Manner: Influence of the Experimental Procedure and the Individual Factor. *Biomolecules* **2023**, *13*, 542. <https://doi.org/10.3390/biom13030542>

Academic Editor: Marshall Williams

Received: 24 January 2023

Revised: 22 February 2023

Accepted: 7 March 2023

Published: 16 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Since more than 100 years, a considerable body of data suggests the existence of biological effects in non-targeted cells situated in close proximity to irradiated ones [1,2]. Even if these effects are not necessarily generated by a single cause, and despite the fact that their molecular bases are not fully identified yet, radiobiologists have currently described them under the single term of radiation-induced bystander effect (RIBE) [3–6]. RIBE has been documented with various endpoints like gene mutation induction, DNA damage, apoptosis, and/or malignant transformation [7–14] and by applying various experimental procedures like cytoplasmic irradiations [9,15], exposures to alpha-particles [6,16,17], charged particle microbeams [9,18] and irradiated culture medium transfers [19,20]. To date, it has been difficult to develop a mechanistic and unified model of RIBE without identifying the molecular and cellular features that are common to all these experimental procedures. Medium transfer and micro-irradiation approaches are the most current methodologies to investigate RIBE. However, most micro-beam experiments have involved heavy ions or alpha particles, whereas most medium transfer experiments have been performed with X-rays [9,15]. Hence, in order to avoid any methodological bias and technical artifact, a



major step to elucidate the RIBE mechanisms would be to apply both medium transfer and micro-irradiation by using the same type of radiation. Synchrotrons are accelerators of electrons that, after being decelerated, produce high-fluence X-rays. Such high-fluence synchrotron X-rays permit to irradiate cells by micro-tracks at a non-negligible dose rate and by covering a sufficiently homogenous irradiation. Synchrotron X-rays represent therefore a real opportunity to investigate RIBE by applying medium transfer and micro-irradiation approaches using the same type of radiation [21–25].

In parallel to this technical opportunity, it has been demonstrated that radiation-induced DNA double-strand breaks (DSB), one of the major DNA damages induced by ionizing radiation, can be determined by the phosphorylation of H2AX histone ( $\gamma$ H2AX) which forms nuclear foci at the DSB sites. These  $\gamma$ H2AX foci are easily quantifiable by immunofluorescence [26]. The presence of  $\gamma$ H2AX foci in RIBE cells has already been reported [20,27]. In literature, the formation of late DSB appears to be a major feature of RIBE. However, it must be stressed that nuclear  $\gamma$ H2AX foci reflect a subset of radiation-induced DSB, those that are recognized by the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway, predominant in mammalian quiescent cells. Hence, some other DSB can be produced by RIBE but may not be revealed by  $\gamma$ H2AX foci; some other biomarkers are therefore needed to complete the molecular characterization of RIBE to determine whether other DNA repair pathways than NHEJ are involved in RIBE. The nuclease MRE11 forms nuclear foci after irradiation and produces a subset of DSB that are not managed by NHEJ [28]. Since the  $\gamma$ H2AX foci/MRE11 foci ratio may condition the individual response to radiation [29], the nature of the DSB involved in RIBE raises also the question of the influence of the individual factor in this radiobiological effect.

Lastly, in parallel to the generation of some late DSB and the potential involvement of the MRE11 nuclease, another current observation described in the literature about RIBE is the radiation-induced extracellular flux of  $\text{Ca}^{2+}$  ions that may propagate among the RIBE cells [30]. Besides, lindane, an inhibitor of gap-junctions, has been found to inhibit RIBE, which highlighted the role of intercellular connections in RIBE. However, it is noteworthy that lindane also disturbs calcium homeostasis [11,31]. Furthermore, the formation of radiation-induced DSB and the activation of MRE11 nucleases have also been shown to depend on  $\text{Ca}^{2+}$  ions [32,33]. Hence, the amount and the availability of calcium before irradiation appear to be two key elements for the occurrence and extent of RIBE.

In this study, we attempted to provide a unified mechanistic model of RIBE that would be independent of the experimental protocol. To achieve this aim, as a first step, both medium transfer and micro-irradiation approaches were applied with synchrotron 50 keV X-rays to a human radioresistant fibroblast cell line by using  $\gamma$ H2AX foci as molecular endpoints. As a second step, the role of the MRE11 nuclease in RIBE and the influence of calcium and its contribution to the total dose were evaluated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Lines

Four human untransformed cutaneous fibroblasts cell lines were chosen to avoid any bias linked to genomic stability. Fibroblasts were routinely cultured at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  humid conditions as monolayers with Dulbecco's modified Eagle's minimum medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin, and streptomycin. In all the experiments, fibroblasts were maintained in the plateau phase of growth (95–99% in G0/G1) to overcome any cell cycle effect. The radioresistant 1BR3 cell line was derived from an apparently healthy donor, and its radiobiological features were published elsewhere [34–36]. The 14CLB and 200CLB cell lines were originated from a donor who showed an adverse tissue reaction after anti-cancer radiotherapy and from a donor who showed spontaneous breast cancer treated by surgery, respectively. Finally, the GM01142 cell line was derived from a donor suffering from retinoblastoma syndrome and purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA) [37]. These cell lines belong to the "COPERNIC" collection, managed by our

lab and approved by the regional Ethical Committee. The COPERNIC cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437 and DC2021-3957 to the Ministry of Research. Our radiobiological database was protected under the reference number IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300 [36].

## 2.2. Anti-Oxidative and Calcium-Dependent and Independent Drugs

*N*-acetyl-L-cysteine (NAC) (#A7250), NaCl, 0.9% (physiological serum, #S9888), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (#342483), and CaCl<sub>2</sub> (#C1016) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Calcium and magnesium free-phosphate-buffered-saline solution (PBS or PBBwCa; #14040091) and calcium-free PBS (PBSw/oCa; #14190144) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

## 2.3. High-Energy Photons Irradiations

High-energy photon irradiations were performed with a 6 MeV photon medical irradiator (SL 15 Philips) (dose-rate: 6 Gy.min<sup>-1</sup>) at the anti-cancer Centre Léon-Bérard (CLB) (Lyon, France). Dosimetry was certified by the radiophysicists of the CLB [35,36].

## 2.4. Synchrotron Low-Energy X-rays Irradiation

Experiments involving synchrotron X-rays were performed at 50 keV at the biomedical ID17 beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France). Irradiation features were detailed elsewhere [38–40]. Micro-irradiations were performed with a set-up made of two 100- $\mu$ m-wide parallel micro-tracks separated by 300  $\mu$ m. Dosimetry was routinely checked by radiochromic films [40].

## 2.5. Medium Transfer Approach

If another number of cells is not indicated, 10<sup>6</sup> cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks to reach confluence (Figure S1, Supplementary Materials). After 3 days of incubation, the confluent donor cells were irradiated in the indicated medium and maintained for an incubation period of t1 (10 min–4 h) at 37 °C. The medium was then removed and centrifuged for 2 min (1500 rpm, 200 $\times$  g, 37 °C) and the supernatant was then applied to unirradiated confluent autologous receptor cells and maintained for an incubation period of t2 (1–24 h) at 37 °C. The immunofluorescence was then processed.

## 2.6. Free Calcium Quantification

The content of free calcium was determined by atomic absorption spectrometry using an air-acetylene flame. Confluent cells were scraped, centrifuged for 2 min (1500 rpm, 200 $\times$  g, 4 °C) and the supernatant was removed. Cells were then washed, and two-fold diluted in a solution containing 2.5% HCl, 0.65% lanthane oxide, and 0.005% CsCl. Calcium concentration was obtained after calibration with Ca standards [41].

## 2.7. Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol was described elsewhere [42,43]. Briefly, cells fixed in paraformaldehyde for 10 min at room temperature and were permeabilized in 0.5% Triton X-100 solution for 5 min at 4 °C. Primary and secondary antibody incubations were performed for 40 and 20 min at 37 °C, respectively. The anti- $\gamma$ H2AX<sup>ser139</sup> (#05636; Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, France) and the anti-MRE11 (#56211; QED Bioscience, San Diego, CA, USA) antibodies were used at 1:800 and 1:100, respectively. Incubations with anti-mouse fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) secondary antibodies were performed at a ratio of 1:100 at 37 °C for 20 min. Slides were mounted in 4',6'-Diamidino-2-Phenyl-indole (DAPI)-stained Vectashield (Abcys, Paris, France). Nuclear foci were examined with Olympus fluorescence microscope (Olympus France S.A.S, Rungis, France). Foci scoring procedure applied here has received the certification agreement of CE mark and ISO-13485 quality management system norms. Our foci scoring procedure also developed some features that are protected in the frame of the Soleau Envelop and

patents (FR3017625 A1, FR3045071 A1, EP3108252 A1) [29,36,43,44]. One hundred nuclei were examined per condition and per experiment to score the standard nuclear  $\gamma$ H2AX and MRE11 foci. The size of  $\gamma$ H2AX foci was controlled by the Cells software program linked to the Olympus microscope. All the foci whose surface was lower than  $1 \mu\text{m}^2$  was considered as “tiny” foci. The distance from the micro-tracks was determined by moving the micrometric wheel of the microscope and by verifying the position based on the average size of cell nuclei.

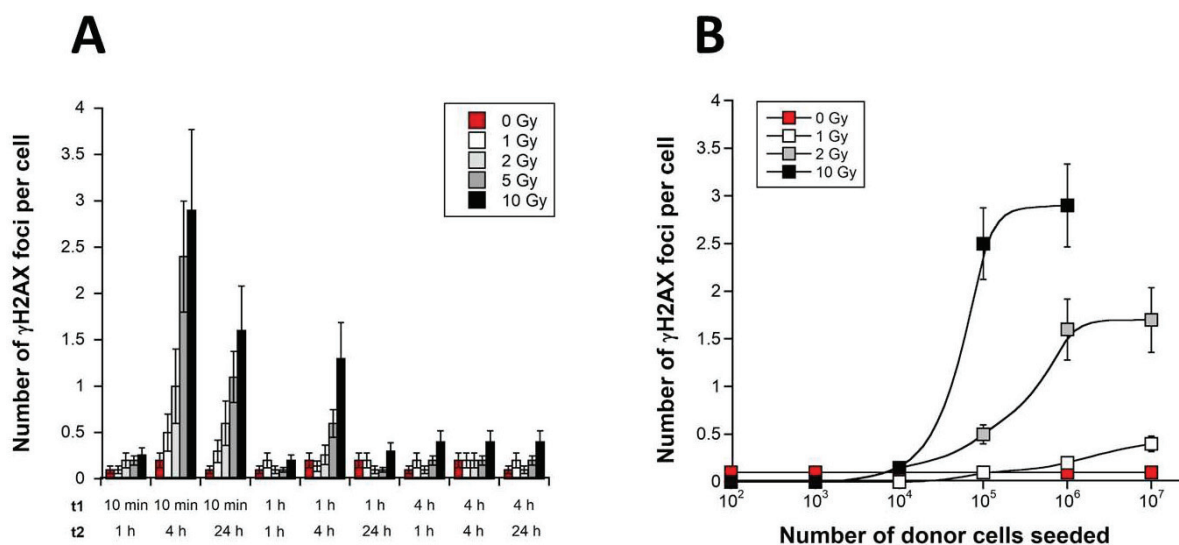
### 2.8. Statistical Analysis

Statistical significance between data points was verified with the one-way ANOVA test, and the statistical significance between two curves was verified with the non-parametric Friedman test. Statistical analysis was performed by using Kaleidagraph v4 (Synergy Software, Reading, PA, USA). Data fitting was performed with the indicated mathematical formulas.

## 3. Results

### 3.1. RIBE Induced by a Medium Transfer Approach

The radioresistant 1BR3 fibroblasts were irradiated in the plateau phase of growth with monochromatic 50 keV synchrotron X-rays in DMEM medium. The DMEM medium was maintained for t1 post-irradiation. The DMEM medium was thereafter applied to unirradiated autologous receptor cells for t2. The RIBE DSB revealed by nuclear  $\gamma$ H2AX foci was examined in receptor cells with t1 ranging from 10 min to 4 h and t2 ranging for 1 to 24 h. An incubation of donor cells for ten min (t1) after irradiation followed by an incubation of receptor cells for 4 h (t2) provided the largest number of  $\gamma$ H2AX foci per cell. This conclusion was reached regardless the initial dose (Figure 1A).



**Figure 1.** Characterization of the RIBE induced by a medium transfer approach with 50 keV synchrotron X-rays. **(A)** One million confluent 1BR3 donor fibroblasts were irradiated at the indicated doses with monochromatic 50 keV synchrotron X-rays in DMEM medium that was kept in the presence of donor cells for t1 post-irradiation (10 min–4 h), and then applied to unirradiated autologous receptor cells for t2 (1–24 h). The number of  $\gamma$ H2AX foci per cell was plotted as a function of the t1 and t2 values. Each  $\gamma$ H2AX data value represents the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent replicates. **(B)** By applying the same methodology, the number of  $\gamma$ H2AX foci per cell was plotted against the number of donor cells irradiated at the indicated doses. Each  $\gamma$ H2AX data value represents the mean  $\pm$  SEM of three independent replicates. Data were fitted to a sigmoidal function.

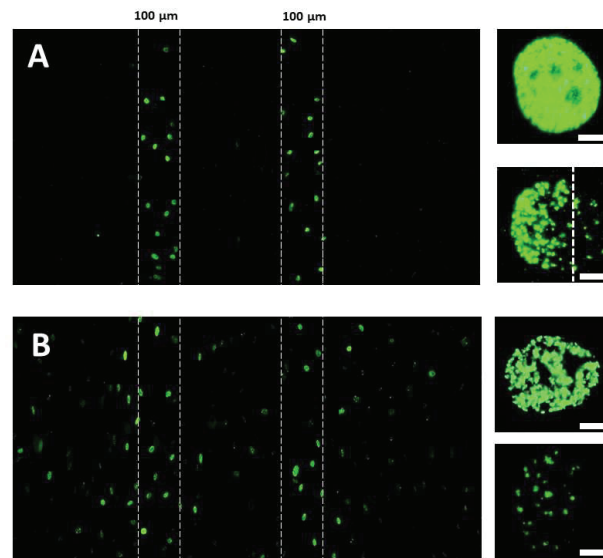
We examined thereafter whether the number of irradiated donor cells strongly affects the  $\gamma$ H2AX data in the optimal medium transfer conditions defined above, namely  $t_1 = 10$  min and  $t_2 = 4$  h. A large range of irradiated donor cells (from  $10^2$  to  $10^7$  cells) was tested. No significant RIBE was observed with  $10^2$  to  $10^4$  irradiated cells. The number of  $\gamma$ H2AX foci per cell obeyed a sigmoidal function of the number of irradiated cells with a threshold found at  $10^4$  irradiated cells (Figure 1B). The shape of the sigmoidal curve changed with the incident dose: the higher the dose, the higher the RIBE extent. In our conditions, a maximal RIBE was observed at doses higher than 2 Gy and with more than  $10^6$  irradiated cells (Figure 1B). Finally, in all these experiments, cells with  $\gamma$ H2AX-positive signals were dispatched heterogeneously among the receptor cells, but the maximal number of  $\gamma$ H2AX foci per cell never exceeded 5 and generally averaged between 1 and 2  $\gamma$ H2AX foci per cell, which would correspond to a standard exposure ranging between 25 and 50 mGy i.e., less than 1% initial dose [45].

Altogether, our findings suggested that the medium transfer approach with monochromatic 50 keV synchrotron X-rays induces RIBE that results in DSB recognized by NHEJ (i.e.,  $\gamma$ H2AX positive) occurring from 10 min post-irradiation and remaining persistent up to 4 h post-irradiation. Such RIBE was found to be dependent on the dose and on the number of irradiated cells and may be equivalent to a dose of some tens of mGy. It is noteworthy that no  $\gamma$ H2AX foci was observed when transfer medium was irradiated in the absence of cells, supporting that the occurrence of RIBE requires the presence of donor cells during irradiation (data not shown). Lastly, it is noteworthy that no apoptotic body was observed in RIBE fibroblasts.

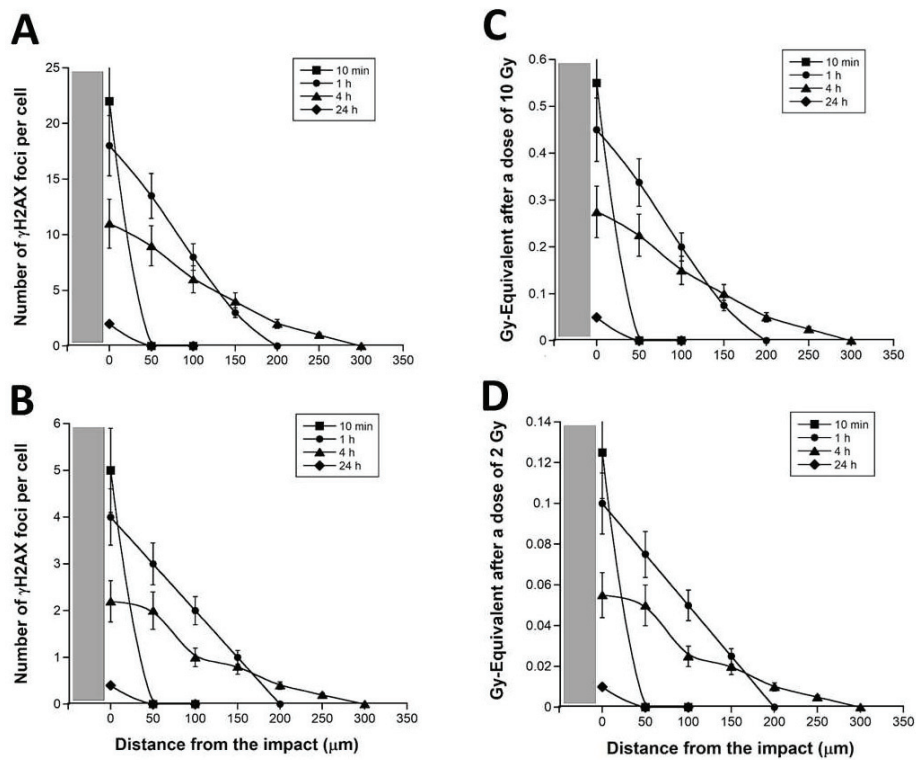
### 3.2. RIBE Induced by a Micro-Irradiation Approach

The formation of RIBE DSB was examined in the vicinity of two 100- $\mu$ m-wide parallel 50 keV synchrotron X-ray micro-tracks separated by 300  $\mu$ m. Four initial doses were applied to the radioresistant 1BR3 fibroblasts: 1, 2, 5 and 10 Gy. Ten minutes after exposure to 10 Gy X-rays, irradiated cells in both micro-tracks were easily identifiable by an intense broad  $\gamma$ H2AX staining in which the  $\gamma$ H2AX were not distinguishable. Indeed, by considering that a dose of 1 Gy X-rays induces about 40 DSB per human diploid non-transformed fibroblast,  $10 \times 40$  DSB/Gy = 400 DSB were expected in each cell [46]. In our conditions, each  $\gamma$ H2AX foci can be distinguishable in a fibroblast nucleus when their number does not exceed 100 [46] (Figure 2). In the cells situated at the outer edges of the micro-tracks, some  $\gamma$ H2AX foci may be identifiable (Figure 2). In the cells situated at more than 10  $\mu$ m from the micro-tracks, some  $\gamma$ H2AX foci were randomly dispatched in the nuclei, irrespectively of the orientation of the synchrotron X-rays micro-tracks. Considering the mean-free path of 50 keV X-rays, the DSB revealed by the  $\gamma$ H2AX foci in cells situated at more than 10  $\mu$ m from the micro-tracks cannot be physically induced by synchrotron X-rays (Figure 2). Furthermore, since more than 95% cells are in G0/G1 phase (Figure S1), and since irradiated cells into the micro-tracks represented about 1% of the whole cell population seeded in the microscope slides, the DSB observed outside from the micro-tracks cannot be due to cell migration. Hence, our observations supported that the synchrotron X-rays micro-irradiation set-up applied here can produce a significant RIBE.

The number of  $\gamma$ H2AX foci per cell decreased as a function of the distance from the micro-tracks. The mathematical function that links the number of  $\gamma$ H2AX foci and the distance from the micro-tracks was also found dependent on the post-irradiation time (Figure 3). Particularly, the  $\gamma$ H2AX foci observed in RIBE cells appeared early (10 min) after irradiation. In our conditions, the maximal number of  $\gamma$ H2AX foci was reached at 1 h post-irradiation. The larger distance from the micro-tracks at which some  $\gamma$ H2AX foci were still observed was reached at 4 h post-irradiation (Figure 3A,B). Similar observations were made with the other doses tested (data not shown for 1 and 5 Gy).



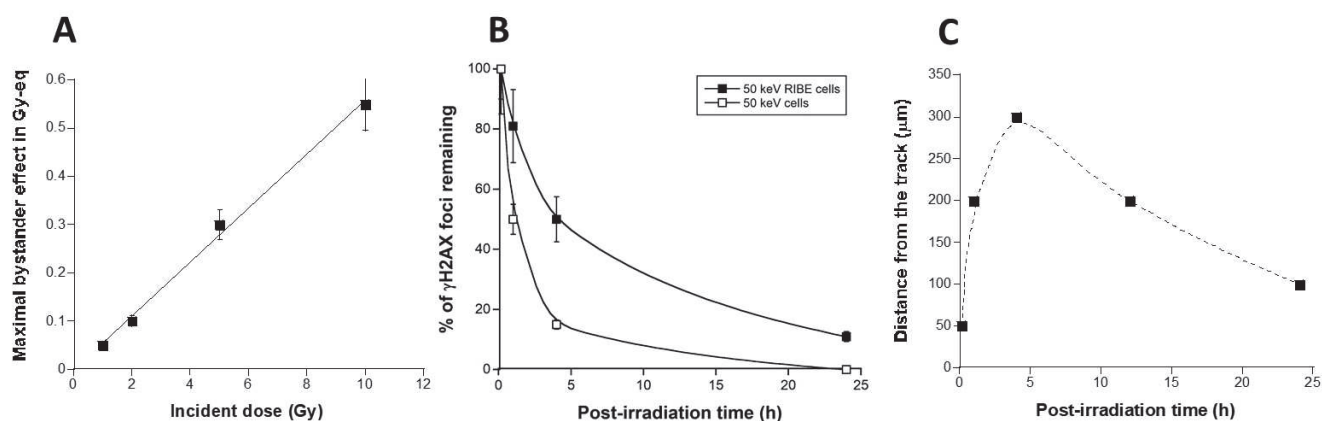
**Figure 2.** Characterization of the RIBE induced by a micro-irradiation approach with 50 keV synchrotron X-rays. Anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence was applied to the radioresistant 1BR3 fibroblasts irradiated at 10 Gy. Two 100- $\mu$ m-wide parallel 50 keV synchrotron X-rays micro-tracks separated by 300  $\mu$ m were generated (delimited by white dashed lines). Cells were fixed 10 min (A) or 4 h (B) post-irradiation and  $\gamma$ H2AX immunofluorescence was applied (10 $\times$  magnification). Inserts. Representative examples of  $\gamma$ H2AX-positive nuclei situated either inside or at the edge of the micro-tracks (10 min post-irradiation) (A) or either inside or 200  $\mu$ m far from the micro-tracks (B) (100 $\times$  magnification). The white bars represent 5  $\mu$ m.



**Figure 3.** Spatial distribution of  $\gamma$ H2AX foci in RIBE cells after a 50 keV synchrotron X-rays micro-irradiation. Anti- $\gamma$ H2AX immunofluorescence was applied to confluent 1BR3 cells subjected to X-rays micro-irradiation (10 Gy, A,C panels or 2 Gy, (B,D) panels) and cells were fixed at the indicated post-irradiation times. The number of  $\gamma$ H2AX per RIBE cell was plotted against the distance from

the micro-tracks. The grey zone represents a half micro-track. The number of  $\gamma$ H2AX foci per cell shown in (A,B) panels was divided by 40 to express the corresponding data in Gy-equivalent ((C,D) panels). Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least three replicates.

By considering that a dose of 1 Gy X-rays induces about 40 DSB per human diploid non-transformed fibroblast [46], the numbers of  $\gamma$ H2AX foci can be expressed in Gy-equivalent by dividing them by 40: considering the slope of the curve shown in Figure 3C,D, the RIBE appeared to be equivalent to about 5.6% of the incident dose (Figure 4A).



**Figure 4.** Specificities of the RIBE induced after a 50 keV synchrotron X-rays micro-irradiation in the 1BR3 fibroblasts. (A) Maximal RIBE expressed in Gy-equivalent (Gy-eq) as a function of dose (Gy) and deduced from the data shown in Figure 3C,D. These data were fitted to a linear formula ( $y = -0.00255 + 0.056 x$ ;  $r = 0.997$ ) (solid line). (B) RIBE DSB repair kinetics. The 10  $\mu$ m  $\gamma$ H2AX data shown in Figure 3 (2 Gy data) were plotted against the corresponding repair times. The resulting DSB repair kinetic of RIBE cells (closed squares) was compared with the DSB repair kinetic obtained with the same cell lines but from a standard (direct) 50 keV X-rays irradiation (open squares). These data were fitted to the Bodgi's formula (solid lines) [47]. (C) From data shown in Figure 3, the distance from the track at which the number of  $\gamma$ H2AX foci was found maximal was plotted against the corresponding post-irradiation time. Data were linked together with a smooth fit (dotted line).

The distance from the micro-track at which the number of  $\gamma$ H2AX foci was not nil whatever the post-irradiation time tested was 10  $\mu$ m (Figure 3): the repair kinetics of DSB assessed at such a distance from the micro-track reflects the repair rate of the RIBE DSB induced at 10  $\mu$ m from the micro-track. Such repair kinetics were obtained by plotting the number of  $\gamma$ H2AX foci against the corresponding post-irradiation time (Figure 4B). Interestingly, the resulting DSB repair kinetics appeared significantly different from the DSB repair kinetics found in the same radioresistant control fibroblasts but after a standard (direct) irradiation [29] ( $p < 0.01$ ) (Figure 4B). These findings suggest that the RIBE DSB are more slowly repairable than those induced by a single irradiation performed in standard conditions (Figure 4B). Such a statement remains true for 1, 5, and 10 Gy (data not shown).

Lastly, in order to better document the speed of the RIBE after a 50 keV synchrotron X-rays micro-irradiation, the maximal distance reached by  $\gamma$ H2AX foci was plotted against the corresponding post-irradiation time (Figure 4C). The resulting curve elicited two phases of appearance/disappearance of the RIBE DSB: an increasing pseudo-linear slope reflecting the propagation of DSB in the RIBE cells and a decreasing pseudo-exponential phase reflecting the repair of DSB. In the first phase, the RIBE reached 300  $\mu$ m from the micro-tracks in the first 4 h post-irradiation (i.e., with average speed of 75  $\mu$ m/h). In the second phase, the RIBE described a decrease in the number of DSB and an inverse progression of 200  $\mu$ m from 4 to 24 h post-irradiation (i.e., with an average speed of 10  $\mu$ m/h) (Figure 4C).

### 3.3. The “Tiny” $\gamma$ H2AX Foci: A Common Feature of RIBE?

Some  $\gamma$ H2AX foci observed in the RIBE cells, whether after a medium transfer or a micro-irradiation showed a specific pattern: among the “standard”  $\gamma$ H2AX foci, some foci were found to be “tiny” (less than  $1 \mu\text{m}^2$ ) i.e., significantly smaller than those observed routinely in non-RIBE conditions (Figure 5A). It must be stressed that these tiny foci were not included in the foci scoring during the experiments described above (see Materials and Methods). In our conditions, such a tiny  $\gamma$ H2AX foci pattern has also been encountered when DSB and DNA single-strand breaks (SSB) are present concomitantly, i.e., when chromatin is relaxed in the presence of DSB (Figure 5A). This is notably the case after high doses of UV through the base damage conversion into SSB and after a  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment that produces SSB and DSB concomitantly (Figure 5A). Some tiny  $\gamma$ H2AX foci may be also observed 10 min after 2 Gy in human fibroblasts derived from radiosensitive donors, likely due to the presence of both SSB and DSB (Figure 5A). However, in this case, the tiny  $\gamma$ H2AX foci are generally less persistent than the standard ones and disappear about 2 h after 2 Gy X-rays, reflecting the short repair half-time of SSB (about 20 min in human fibroblasts) and the longer repair half-time of DSB (about 1 h in human fibroblasts) [46]. SSB are not detected directly via the  $\gamma$ H2AX signals, but they trigger the chromatin decondensation that disperses several of the H2AX molecules concentrated around one DSB site: a “standard”  $\gamma$ H2AX focus revealing one DSB becomes a cloud of “tiny” foci revealing some SSB around (Figure 5A).

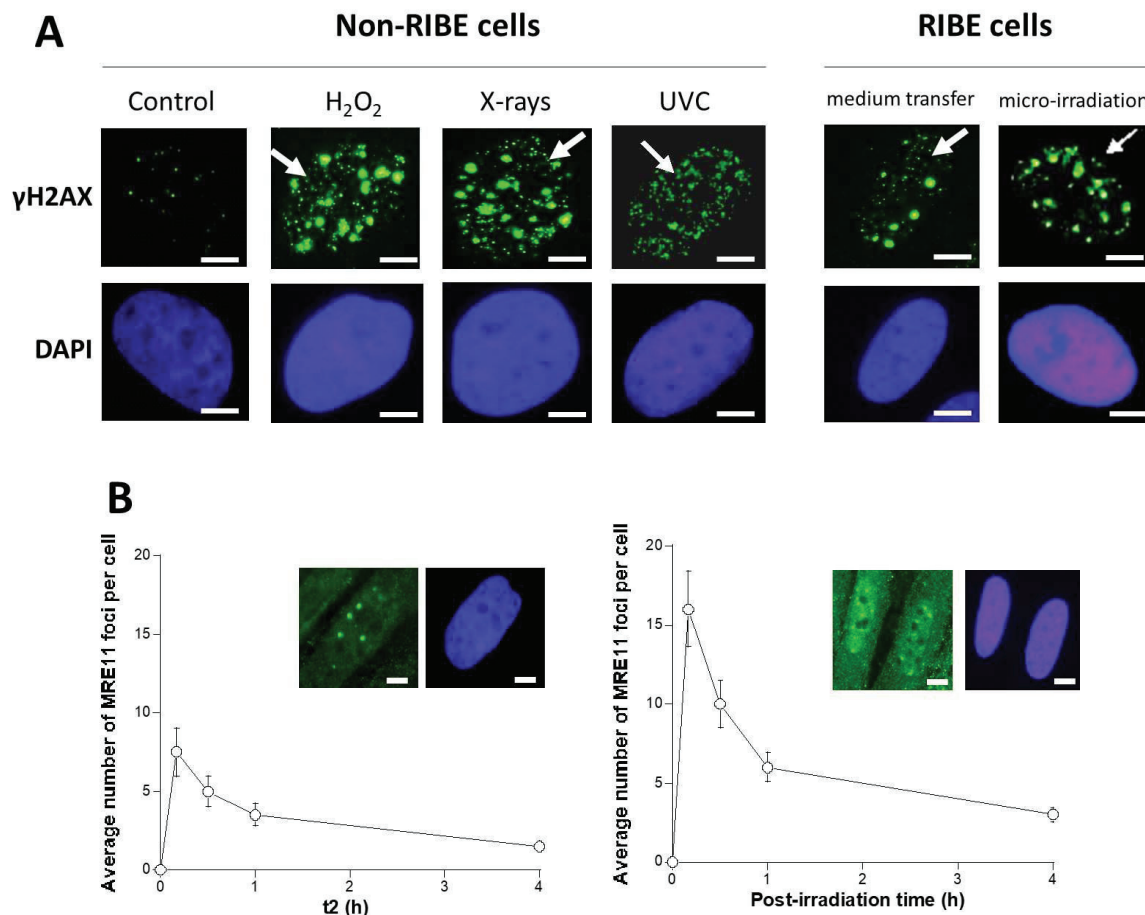
Whether with the medium transfer or the micro-irradiation approach, the tiny  $\gamma$ H2AX foci were observed together with standard ones, suggesting a continuous production of SSB with the presence of DSB during RIBE. Oxidative stress generally activates TFHII components and nucleases like MRE11 [48]. Activated MRE11 nuclease has been shown to be responsible for the formation of SSB, whether after X-rays or UV [49]. The ATM kinase has been shown to phosphorylate MRE11 foci, which triggers the formation of nuclear MRE11 foci. The MRE11 foci were also found early after exposure to UV [50]. Whether with the medium transfer or the micro-irradiation approach, MRE11 foci appeared early after irradiation (10 min) in RIBE cells, and their numbers increased during the first hour post-irradiation. Thereafter, the number of MRE11 foci in the RIBE cells decreased to zero at 24 h post-irradiation. Interestingly, the kinetics of MRE11 foci appeared similar to that of  $\gamma$ H2AX foci, with two phases composed of a rapid appearance rate and a slow disappearance rate (Figures 4 and 5B).

Altogether, our findings support strong analogies between the RIBE generated by the medium transfer and the micro-irradiation approach. The RIBE signals can be persistent for 4 h post-irradiation and observable up to 300  $\mu\text{m}$  from the radiation impact.

### 3.4. Culture Medium Composition and RIBE

All the above experiments were performed in DMEM medium supplemented with bovine serum. Since RIBE has been found to be strongly dependent on specific chemical species [51], we examined whether the chemical composition of the DMEM medium impacts RIBE. As a first step, medium transfer was performed with physiological serum (NaCl, 0.9%) and calcium and magnesium free-phosphate-buffered saline solution (PBSw/oCa), without bovine serum or antibiotics. By applying 1, 2, 5 and 10 Gy synchrotron X-rays with  $t_1 = 10$  min and  $t_2 = 4$  h to one million 1BR3 fibroblasts in physiological serum, the number of  $\gamma$ H2AX foci appeared to be similar to that observed with DMEM (Figure 6A,B). Conversely, no significant RIBE was observed with PBSw/oCa and with physiological serum combined with phosphates ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), while PBS with calcium allowed the occurrence of a significant RIBE (Figure 6A,B). These findings suggested that: (1) physiological serum (NaCl, 0.9%) is the minimal medium allowing RIBE. Neither bovine serum nor antibiotics significantly impact upon the RIBE occurrence (data not shown). (2) PBSw/oCa is the minimal medium preventing RIBE. PBSw/oCa contains more than 1 mM  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  and 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , suggesting that phosphates are more abundant in PBSw/oCa than in any other medium tested (Table 1). Phosphates are known for their affinity with calcium. By

using PBS with calcium (PBSwCa; 0.91 mM CaCl<sub>2</sub>), the number of γH2AX foci per cell was found to be larger than with PBSw/oCa (*p* < 0.01) but remained statistically lower than with DMEM that contains higher calcium concentrations (1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) (*p* < 0.001) (Table 1) (Figure 6A).

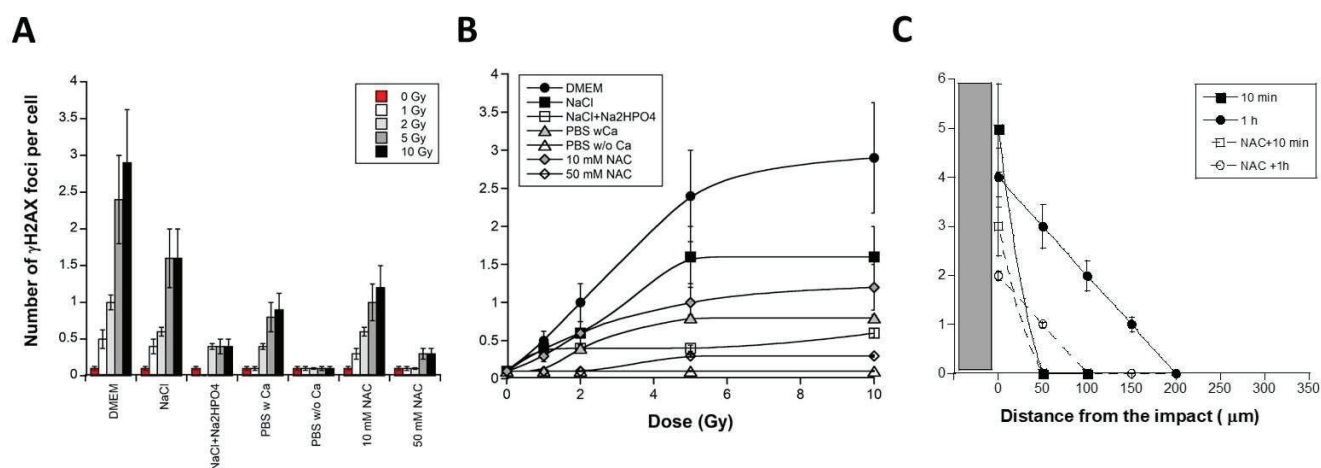


**Figure 5.** Tiny γH2AX foci as a specific feature of RIBE cells. (A) Different patterns of γH2AX foci observed in the radioresistant 1BR3 fibroblasts exposed to 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1 h, 1 Gy X-rays + 1 h, and 15 J.m<sup>-2</sup> UVC + 1 h (left panel). Representative examples of RIBE nuclei after medium transfer (2 Gy; t<sub>1</sub> = 10 min; t<sub>2</sub> = 4 h) and micro-irradiation (10 Gy; 1 h) (right panel). White arrows indicate tiny foci. Nuclei were counterstained by DAPI. White bars represent 5 μm. (B) Average number of MRE11 foci per cell as a function of t<sub>2</sub> (for the medium transfer approach after 2 Gy) or as a function of post-irradiation time (for the micro-irradiation approach after 2 Gy). Inserts are representative MRE11 immunofluorescence images assessed 1 h post-irradiation with DAPI counterstaining. White bars represent 5 μm.

**Table 1.** Concentration (mM) of phosphates and calcium in the culture media used here.

	NaCl (0.9%)	DMEM	PBS and PBSw/oCa
NaCl	153	110.34	137.93
KCl	0	5.33	2.67
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0.916	8.06
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0	1.47
Phosphates	0	~1	~10
Calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0	1.8	0.9 (for PBS)
RIBE-induced DSBs	+	+	-



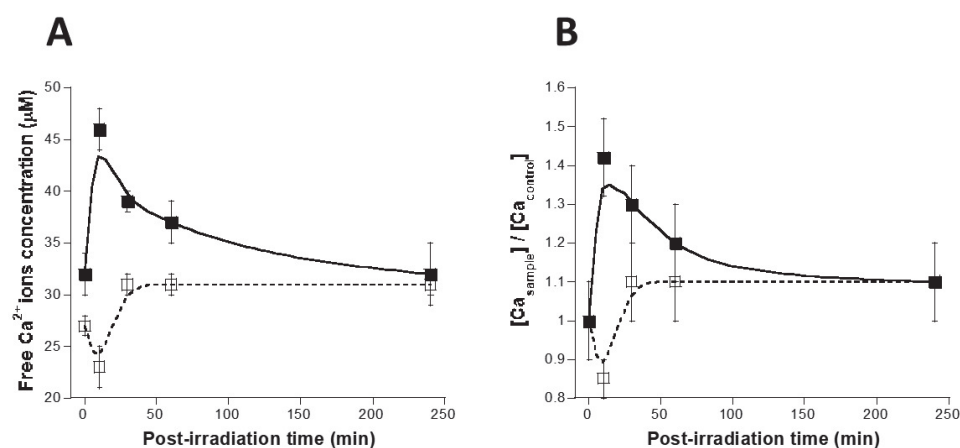


**Figure 6.** Effect of calcium on the RIBE. One million confluent 1BR3 fibroblasts were irradiated at the indicated doses with monochromatic 50 keV synchrotron X-rays by applying the medium transfer approach ( $t_1 = 10$  min and  $t_2 = 4$  h) with the indicated medium. Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least three replicates. (B). The data shown in panel (A) were plotted as function of the initial dose. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of three independent replicates. (C). Spatial distribution of  $\gamma$ H2AX foci in RIBE cells after monochromatic 50 keV synchrotron X-rays micro-irradiation. The data represented by closed symbols are those shown in the Figure 3B at 10 min and 1 h post-irradiation. Data represented by open symbols correspond to the  $\gamma$ H2AX data in presence of 50 mM NAC. Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least three replicates. In presence of PBSw/oCa, no  $\gamma$ H2AX foci was observed (data not shown). The grey zone represents a half micro-track.

Interestingly, when a powerful anti-oxidative drug like N-acetylcysteine (NAC) was applied to receptor cells, less  $\gamma$ H2AX foci appeared. Particularly, 50 mM NAC resulted in 5-fold decreased yield of  $\gamma$ H2AX foci, suggesting that NAC influences the production of late DSB by preventing the formation of RIBE-induced reactive oxygen species (ROS) and DNA damage (Figure 6C). Similarly, when the micro-irradiation approach was applied in PBSw/oCa, the RIBE did not occur (data not shown), supporting again the dependence of RIBE vis-à-vis ROS, phosphates and availability of calcium.

### 3.5. Calcium and RIBE

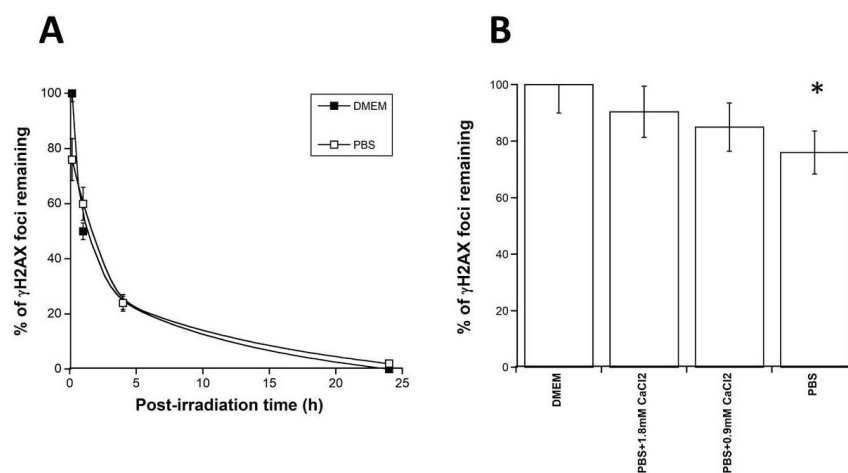
A number of authors have reported the existence of a radiation-induced release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ions between 10 min and 1 h post-irradiation [30,52]. Literature and our findings prompted us to verify whether RIBE is dependent upon the availability of free  $\text{Ca}^{2+}$  ions. One million 1BR3 fibroblasts were irradiated (10 Gy) in either PBSw/oCa or physiological serum and the free calcium concentration was determined in irradiated media 10, 30, 60 and 240 min post-irradiation by using flame atomic absorption spectrometry [41] (Figure 7). With the physiological serum, the free  $\text{Ca}^{2+}$  ions concentration increased 10 min post-irradiation and remained higher than controls up to 60 min post-irradiation. Conversely, no significant increase was found when cells were irradiated in PBSw/oCa (Figure 7). Our findings suggest that the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ions release may diffuse from irradiated cells into extracellular medium. The presence of phosphates like those containing in PBSw/oCa may contribute to prevent the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  ions release (Figure 7A,B).



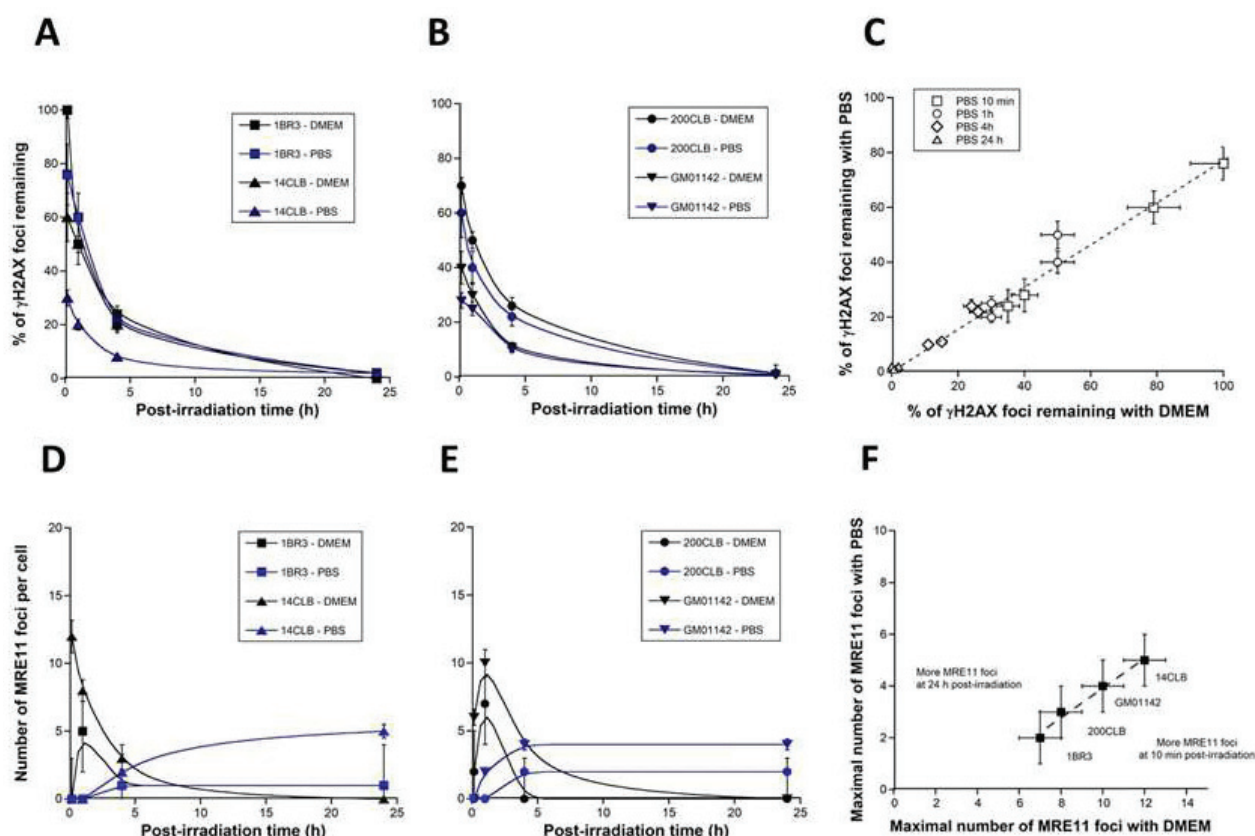
**Figure 7.** Calcium and RIBE. (A) Radiation-induced Ca<sup>2+</sup> ions release in the radioresistant 1BR3 fibroblasts. One million 1BR3 fibroblasts were irradiated (10 Gy) in either PBSw/oCa (open squares; smooth fit with dotted line) or physiological serum (closed squares; smooth fit with closed line). Free Ca<sup>2+</sup> ions concentration was determined in media 10, 30, 60, and 240 min post-irradiation. Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least two replicates. (B) Data shown in panel (A) were normalised.

### 3.6. Contribution of RIBE to the Radiation Dose-Effect

Our findings suggest that RIBE represents a contribution to the biological dose that depends on the irradiation protocol: with monochromatic 50 keV synchrotron X-rays, the RIBE induced by medium transfer and micro-irradiation represents less than 1% and about 5% of the initial dose, respectively. In order to compare these findings with a more current irradiation scenario, we evaluated the relative contribution to the dose of the Ca-dependent events during conditions of irradiation mimicking a standard anti-cancer radiotherapy session with high-energy photons. To this aim, cells were irradiated with a 6 MeV photons medical irradiator by applying different drugs pre-treatments promoting or inhibiting the radiation induced Ca<sup>2+</sup> ions release (Figures 8 and 9).



**Figure 8.** Influence of calcium on the DSB repair kinetics of the radioresistant 1BR3 fibroblasts. Cells were irradiated (2 Gy) with 6 MeV photons in presence of the indicated media. Each data plot represents the mean  $\pm$  standard error of at least three replicates. (A) Kinetics of  $\gamma$ H2AX foci. Data were fitted to the Bodgi's formula [47]. (B) Histogram representing the  $\gamma$ H2AX foci values (as percentage of foci remaining) assessed 10 min post-irradiation with the indicated media. Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least three replicates. Asterisk represents  $p < 0.05$ .



**Figure 9.** Calcium, RIBE and radiosensitivity. The indicated four fibroblast cell lines with different radiosensitivity status were irradiated (2 Gy) with 6 MeV photons in presence of the indicated media (DMEM or PBS) and subjected to anti- $\gamma$ H2AX (A,B) or -MRE11 (D,E) immunofluorescence at the indicated post-irradiation times. Each data plot represents the mean  $\pm$  SEM of at least three replicates. Data were fitted to the Bodgi's formula [47]. (C) The  $\gamma$ H2AX data obtained with DMEM and PBS shown in panels (A,B) were plotted together with their corresponding error bars (SEM). The dotted line corresponds to the following formula:  $y = 0.75x$  ( $r = 0.99$ ). (F) The MRE11 data obtained with DMEM and PBS shown in panels (D,E) from the indicated four fibroblast cell lines were plotted together with their corresponding error bars (SEM). The dotted line corresponds to the following formula:  $y = -1.83 + 0.576 \times$  ( $r = 0.989$ ).

A dose of 2 Gy high-energy photons delivered to the radioresistant 1BR3 cells in DMEM produced about  $74 \pm 6$   $\gamma$ H2AX foci per cell at 10 min post-irradiation. In these conditions, all the  $\gamma$ H2AX foci disappeared at 24 h post-irradiation. While the irradiation in physiological serum did not change these values significantly (data not shown), an irradiation performed in PBS produced  $60 \pm 4$   $\gamma$ H2AX foci per cell at 10 min post-irradiation i.e., about 20  $\gamma$ H2AX foci less than with DMEM ( $p < 0.05$ ) (Figure 8A). By expressing  $\gamma$ H2AX foci data as percentage of  $\gamma$ H2AX foci remaining, such value corresponds to about 75–80%  $\gamma$ H2AX foci assessed at 10 min with PBS. In other terms, calcium-dependent events contribute to about 20–25% of the initial dose. Interestingly, by adding  $\text{CaCl}_2$  to PBS, the number of  $\gamma$ H2AX foci per cell reached that assessed with DMEM ( $p > 0.2$ ) (Figure 8B). It is noteworthy that, in all these experiments, the tiny  $\gamma$ H2AX foci appeared 10 min post-irradiation but disappeared thereafter (data not shown).

### 3.7. Individual Radiosensitivity and RIBE

In the previous experiments, we examined the occurrence and the intensity of RIBE in the untransformed radioresistant 1BR3 fibroblasts that show a survival fraction at 2 Gy (SF2) higher than 60% [28]. In these radioresistant cells, the ATM kinase diffuses rapidly in the nucleus in response to radiation [53]. Once in the nucleus, the ATM kinase can

phosphorylate the H2AX variant histone to form the  $\gamma$ H2AX foci at the sites of DSB that are recognized by NHEJ [53]. In parallel, the ATM kinase phosphorylates the MRE11 protein, which triggers the formation of MRE11 foci, reflecting the inhibition of the nuclease activity of the MRE11 protein [28]. In radiosensitive cells showing a delay in the radiation-induced ATM nucleo-shuttling (RIANS), some cytoplasmic and overexpressed proteins prevent the RIANS and form multiprotein complexes with ATM in the cytoplasm. As a result, the delay in RIANS may facilitate continuous activation of the MRE11 nuclease [28]. In order to examine the influence of individual radiosensitivity on RIBE, four fibroblast cell lines showing different radiosensitivity and RIANS status were irradiated (2 Gy high-energy photons) in DMEM or PBS and submitted to anti- $\gamma$ H2AX and MRE11 immunofluorescence. Foci data were plotted against the post-irradiation time (Figure 9).

With regard to the  $\gamma$ H2AX data, the number of foci decreased faster when irradiation was made in PBS than in DMEM (Figure 9A), whatever the radiosensitivity. Furthermore, the  $\gamma$ H2AX data assessed 10 min post-irradiation, reflecting the DSB subset recognized by NHEJ were systematically lower in PBS than in DMEM ( $p < 0.01$ ) (Figure 9A).

Interestingly, when the corresponding DMEM and PBS data were plotted together, it appeared that PBS pre-treatment resulted in the disappearance of about 25%  $\gamma$ H2AX foci, whatever the radiosensitivity and the post-irradiation time (Figure 9B). These findings support that the inhibition of the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  ions release by a culture medium rich in phosphates results in a significant (25%) decrease of the formation of DSB or else of the recognition of DSB by NHEJ (Figure 9B). The extent of such a process occurs independently of the radiosensitivity, likely because it involves chemical reactions common to all the cells. However, the biological consequences of such RIBE are likely to be dependent on radiosensitivity.

With regard to the MRE11 data, all the foci kinetics showed their maximum early after irradiation (10 min or 1 h) when irradiation was performed in DMEM. By contrast, when irradiation was performed in PBS, the shapes of the MRE11 foci kinetics changed drastically and became curvilinear, with a maximal value of MRE11 foci reached later after irradiation (4 or 24 h post-irradiation) (Figure 9C). Interestingly, irradiation of cells performed in PBS also resulted in about twice fewer foci than those observed with DMEM, independently of the radiosensitivity. Since MRE11 foci reflect the inactivation of the nuclease activity of MRE11 by ATM, our findings suggest that the inhibition of the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  ion release by the PBS results in limiting the generation of DNA breaks by MRE11 nuclease but delaying its total inactivation. Conversely, the promotion of RIBE amplifies the MRE11 nuclease activity by generating more DNA breaks and earlier.

## 4. Discussion

### 4.1. A Unified Model for RIBE?

While RIBE has been abundantly documented in literature, its molecular bases remain unclear [3–6,20,54]. Historically, *in vitro* RIBE was initially observed with alpha-particles, which generated some doubts with regard the biological nature of the RIBE since physical scattering encountered with high LET-particles can induce energy micro-depositions far from their initial impact [3–6]. Injuries at gap junctions have been also proposed as a common cause of RIBE. However, gap junctions inhibitors were shown to reduce the RIBE generated by alpha particles while they were found inefficient in medium transfer experiments involving X-rays [11,20,55]. Despite such controversies, a temporal analogy in the formation of RIBE DSB was suggested with both approaches, namely micro-irradiations with alpha-particles and medium transfer with X-rays [3,10,55,56]. However, to be relevant, such an analogy should be observed with the same type of radiation. As evoked in the Introduction, thanks to their high fluence, synchrotron X-rays represented a real opportunity to perform both medium transfer and micro-irradiations approaches with the same radiation type [21–25].

#### 4.2. Chemically Induced DNA Breaks as Major Feature of RIBE?

RIBE DSB differ from DSB induced by X-rays by their late occurrence. With both medium transfer and micro-irradiation approaches RIBE DSB were observed from 10 min to 4 h post-irradiation while the “physically” induced DSB observed after a “direct” irradiation are generated some microseconds after irradiation [57]. High doses of UV also generate late DSB after the conversion of base damage to SSB during the excision-resynthesis process and the conversion of SSB to DSB if base damage and/or SSB are too numerous [58]. Such succession from one DNA damage type to another requires some time and may explain the occurrence of late DSB. The presence of foci formed by the MRE11 nuclease that was found to be involved in base damage, SSB, and DSB repair supports such a hypothesis [59]. However, the most important clue of the concomitant presence of SSB and DSB is reflected by the “tiny”  $\gamma$ H2AX foci that were systematically observed in RIBE cells. Some tiny  $\gamma$ H2AX foci were also observed after UV exposure and treatments to  $H_2O_2$  and disappeared after treatment with anti-oxidative drugs like NAC. Such observations strongly suggest that tiny  $\gamma$ H2AX foci reflect the presence of some DSB (if not, no  $\gamma$ H2AX signal would appear) and chromatin decondensation due to numerous SSB that disturb the  $\gamma$ H2AX signals. Hence, tiny  $\gamma$ H2AX foci in RIBE cells may reveal the existence of a strong oxidative stress, generating base damage, SSB, and DSB. A number of anti-oxidative drugs have been used to modulate RIBE [8,55]. This is notably the case for DMSO, catalase, and superoxide dismutase, that have been shown to inhibit RIBE, whether after micro-irradiation or medium transfer. In this study, data obtained with NAC suggest that the occurrence of RIBE is influenced by scavenging oxidative species and that RIBE DSB can be considered as “chemically” induced DSB [60].

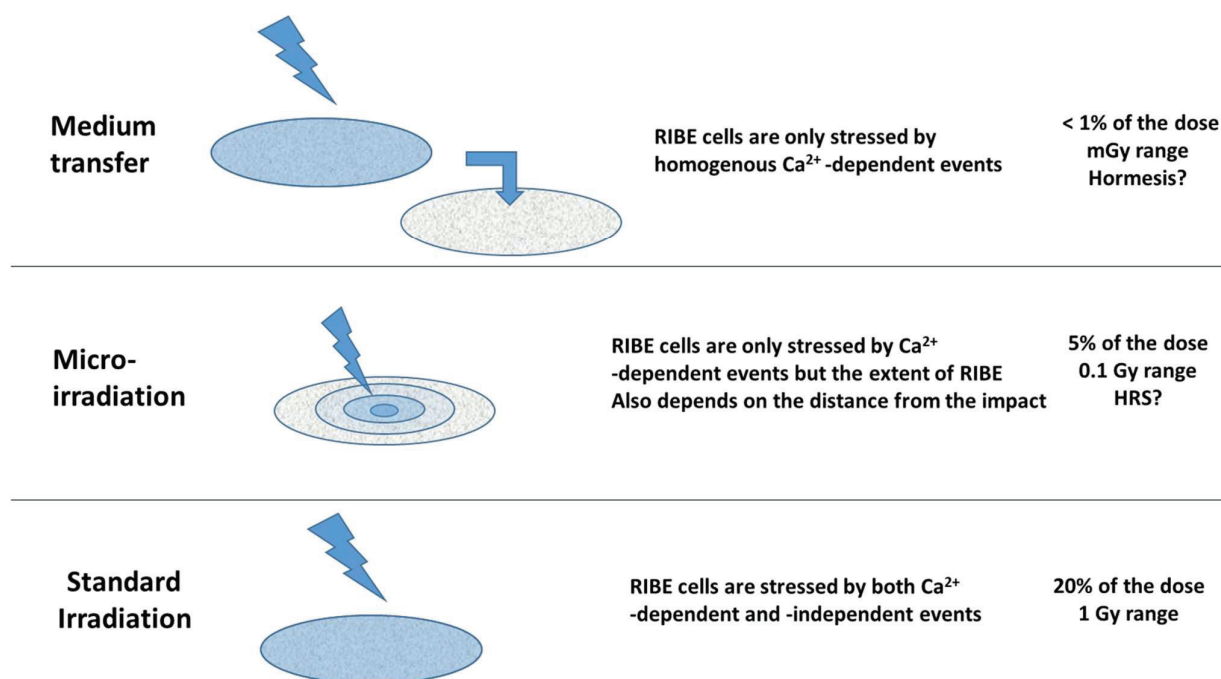
#### 4.3. Dependence of RIBE on Calcium and Phosphates

Differences in RIBE intensity observed between culture media as simple as PBS or physiological serum are impressive and fully eliminate any potential impact of bovine serum, antibiotics, or any specific complement present in the culture medium. Former observations have strongly suggested that extracellular flux of  $Ca^{2+}$  ions is a key event in RIBE [30]. Calcium plays a central role in cell viability and stress signaling notably with micromolar intracellular concentrations (a human fibroblast contains about 150 nM  $Ca^{2+}$ ) and millimolar concentrations in extracellular medium (DMEM medium contains 1.8 mM  $CaCl_2$ ) [61–63]. Hence, if all irradiated cells would release their intracellular free  $Ca^{2+}$  ions, significant RIBE would occur after irradiation of  $10^4$  cells, at least, to produce more than 1.8 mM free  $Ca^{2+}$  ions. Although probably overestimated, this calculation is in agreement with the hypothesis that RIBE is strongly dependent on the number of irradiated cells [64]. Furthermore, the fact that a minimal radiation dose is sufficient to trigger extracellular  $Ca^{2+}$  ion release may explain why RIBE is not necessarily linearly dose-dependent [27,65]. Altogether, these conclusions invite us to carefully evaluate the irradiated tissue volumes and the corresponding number of cells irradiated for better quantifying RIBE.

Lastly, the calcium-dependence of RIBE has been generally supported through activation of signaling pathways leading to apoptosis [61]. To overcome cell cycle effects and genome instability, we used here confluent non-transformed human fibroblasts. Human fibroblasts are generally subjected to mitotic death and senescence rather than apoptosis [35]. Hence, with the cellular model chosen here, apoptosis does not appear as a predominant feature of RIBE [62,66,67].

#### 4.4. RIBE and Its Contribution to the Radiation Dose: Differences between the Approaches Tested

Our findings show that the contribution of RIBE to the biological dose may depend on the irradiation conditions (Figure 10).



**Figure 10.** Schematic summary of the RIBE according to the irradiation protocol. For medium transfer, micro-irradiation and “standard” irradiation, all or a subset of cells are concerned by calcium-dependent events leading to RIBE DSB. For each protocol, the calcium-dependent events contribute differentially to the total dose and some specific radiobiological phenomena may occur (hormesis or HRS).

In the case of micro-irradiation, the cells that are directly targeted by irradiation received also the indirect calcium dependent RIBE. By contrast, cells at the edge of micro-tracks and further received only the radiation-induced  $\text{Ca}^{2+}$  ions release: RIBE likely obeys a Fick’s diffusion law [68], a function of the time and the distance from the impact. The RIBE is inasmuch intense as cells are closed to the micro-tracks (Figure 10). Under these conditions, the RIBE cells received a dose equivalent to the integral of the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  ions release during the time of the experiment. The dispersion of  $\gamma\text{H2AX}$  foci in cells far from the micro-tracks supports the idea that micro-irradiation may be considered as a series of successively infinitesimal medium transfers from the micro-tracks through medium (Figure 10). As shown in Figures 3 and 4, the equivalent dose received by cells situated at 10  $\mu\text{m}$  from the micro-tracks represents 5% of the initial dose (i.e., some fraction of Gy). Interestingly, this dose may belong to the range of doses generating the hypersensitivity to low dose phenomenon (HRS) [44,69,70]. At this stage, the RIBE induced by micro-irradiation may therefore produce deleterious effects in the surrounding tissues, notably if they are radiosensitive (HRS preferentially occurs in radiosensitive cells) [45] (Figure 10).

In the case of medium transfer, the receptor cells received only the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  for a shorter period of emission ( $t_1$ ) than with micro-irradiation. As shown in Figure 1, the equivalent dose received by receptor cells represents less than 1% of the initial dose (i.e., in the mGy range if the initial dose is 2 Gy). Interestingly, this dose range belongs to the doses generating the hormesis phenomenon [45]. At this stage, the RIBE induced by medium transfer, may therefore produce a beneficial effect in the surrounding tissues, more particularly if the cells are radioresistant (hormesis preferentially occurs in radioresistant cells) [45] (Figure 10).

In the case of a standard irradiation (e.g., mimicking radiotherapy), the irradiated cells received both the direct ionizations and the radiation induced  $\text{Ca}^{2+}$  ion release in a homogenous manner. As shown in Figure 8, the calcium-dependent events may represent about 20% of the initial dose. Such contribution remains strongly dependent on the calcium

content/number of the cells or tissues irradiated and on the homogeneity of the irradiation (particles vs. rays). The fact that the calcium-dependent contribution to the biological dose represents 20% required further investigations to better relate the assessment of the physical dose with a better evaluation of the biological one (Figure 10).

## 5. Conclusions

By applying both medium transfer and micro-irradiations approaches to radioresistant fibroblasts with 50 keV synchrotron X-rays, our findings suggest a temporal coincidence with the occurrence of RIBE DSB from 10 min to 4 h post-irradiation. By using different culture media, RIBE appears to be strongly calcium-dependent and the contribution of such specific events to the dose have been determined for medium transfer, micro-irradiations and irradiation mimicking a standard radiotherapy session. Our findings suggest that the RIBE contribution to the dose differs from the irradiation protocol and may result in beneficial or otherwise deleterious effects in surrounding tissues. The extent of the RIBE appears to be dependent on the number of cells irradiated. Further experiments are needed to ask whether/how the RIBE impacts the response of radiosensitive cells and how the calcium availability of cells/tissues interplays with this response.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom13030542/s1>, Figure S1: Representative example of an image of fibroblasts monolayer taken from light microscopy (X10).

**Author Contributions:** Conceptualization, J.R.-V., A.J. and N.F.; data acquisition and methodology, J.R.-V., A.J., M.L.F., A.G., L.S., J.A.-C. and L.E.N.; Validation and data analysis, E.L.R., M.B. and N.F.; writing—original draft preparation, NF; writing, reviewing and editing, M.B. and N.F.; project administration, and funding acquisition, N.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Commissariat General à l'Investissement (Programmes Investissement d'Avenir (INDIRA Project)) and the Centre National d'Etudes Spatiales (ICARE Project).

**Institutional Review Board Statement:** As already mentioned in Materials and Methods, this study has been performed with human fibroblast cell lines that belong to the COPERNIC collection of the lab that has been approved by the regional Ethical Committee. Cell lines were declared under the numbers DC2008-585, DC2011-1437 and DC2021-3957 to the Ministry of Research.

**Informed Consent Statement:** All the anonymous donors of the COPERNIC collection evoked above were informed and signed consent according to the ethics and regulatory recommendations, notably for their consent to participate and for publication of anonymous data.

**Data Availability Statement:** All the data can be provided on reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors thank all the staff of the Biomedical Beamline (ID17) of the European Synchrotron Research Facility (Grenoble, France) and the Radiotherapy Department of Centre Léon-Bérard for their technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Mothersill, C.; Rusin, A.; Fernandez-Palomo, C.; Seymour, C. History of bystander effects research 1905-present; what is in a name? *Int. J. Radiat. Biol.* **2018**, *94*, 696–707. [[CrossRef](#)]
2. Bouchacourt, L. Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différents régions du corps. *Comptes-Rendus Sess. L'assoc. Française L'av. Sci.* **1911**, *52*, 942–947.
3. Mothersill, C.; Seymour, C.B. Radiation-induced bystander effects—implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 158–164.
4. Shuryak, I.; Brenner, D.J. Review of Quantitative Mechanistic Models of Radiation-Induced Non-Targeted Effects (Nte). *Radiat. Prot. Dosim.* **2020**, *192*, 236–252. [[CrossRef](#)]
5. Mothersill, C.; Rusin, A.; Seymour, C. Relevance of Non-Targeted Effects for Radiotherapy and Diagnostic Radiology; A Historical and Conceptual Analysis of Key Players. *Cancers* **2019**, *11*, 1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Nagasawa, H.; Little, J.B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6394–6396.
7. Iyer, R.; Lehnert, B.E.; Svensson, R. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1290–1298.
8. Azzam, E.I.; De Toledo, S.M.; Spitz, D.R.; Little, J.B. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5436–5442.
9. Zhou, H.; Randers-Pehrson, G.; Waldren, C.A.; Vannais, D.; Hall, E.J.; Hei, T.K. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2099–2104. [[CrossRef](#)]
10. Nagasawa, H.; Huo, L.; Little, J.B. Increased bystander mutagenic effect in DNA double-strand break repair-deficient mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2003**, *79*, 35–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 473–478. [[CrossRef](#)]
12. Little, J.B.; Nagasawa, H.; Li, G.C.; Chen, D.J. Involvement of the nonhomologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations. *Radiat. Res.* **2003**, *159*, 262–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lyng, F.M.; Seymour, C.B.; Mothersill, C. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: A possible mechanism for bystander-induced genomic instability? *Radiat. Res.* **2002**, *157*, 365–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sawant, S.G.; Randers-Pehrson, G.; Geard, C.R.; Brenner, D.J.; Hall, E.J. The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat. Res.* **2001**, *155*, 397–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wu, L.J.; Randers-Pehrson, G.; Xu, A.; Waldren, C.A.; Geard, C.R.; Yu, Z.; Hei, T.K. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4959–4964. [[CrossRef](#)]
16. Deshpande, A.; Goodwin, E.H.; Bailey, S.M.; Marrone, B.L.; Lehnert, B.E. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: Evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.* **1996**, *145*, 260–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lehnert, B.E.; Goodwin, E.H.; Deshpande, A. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2164–2171.
18. Zhou, H.; Suzuki, M.; Geard, C.R.; Hei, T.K. Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses. *Mutat. Res.* **2002**, *499*, 135–141. [[CrossRef](#)]
19. Mothersill, C.; Seymour, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *71*, 421–427.
20. Sokolov, M.V.; Smilenov, L.B.; Hall, E.J.; Panyutin, I.G.; Bonner, W.M.; Sedelnikova, O.A. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* **2005**, *24*, 7257–7265. [[CrossRef](#)]
21. Tomita, M.; Maeda, M.; Maezawa, H.; Usami, N.; Kobayashi, K. Bystander cell killing in normal human fibroblasts is induced by synchrotron X-ray microbeams. *Radiat. Res.* **2010**, *173*, 380–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sprung, C.N.; Cholewa, M.; Usami, N.; Kobayashi, K.; Crosbie, J.C. DNA damage and repair kinetics after microbeam radiation therapy emulation in living cells using monoenergetic synchrotron X-ray microbeams. *J. Synchrotron Radiat.* **2011**, *18*, 630–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fernandez-Palomo, C.; Schultke, E.; Smith, R.; Brauer-Krisch, E.; Laissue, J.; Schroll, C.; Fazzari, J.; Seymour, C.; Mothersill, C. Bystander effects in tumor-free and tumor-bearing rat brains following irradiation by synchrotron X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **2013**, *89*, 445–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fernandez-Palomo, C.; Mothersill, C.; Brauer-Krisch, E.; Laissue, J.; Seymour, C.; Schultke, E. gamma-H2AX as a marker for dose deposition in the brain of wistar rats after synchrotron microbeam radiation. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fernandez-Palomo, C.; Brauer-Krisch, E.; Laissue, J.; Vukmirovic, D.; Blattmann, H.; Seymour, C.; Schultke, E.; Mothersill, C. Use of synchrotron medical microbeam irradiation to investigate radiation-induced bystander and abscopal effects in vivo. *Phys. Med. PM Int. J. Devoted Appl. Phys. Med. Biol. Off. J. Ital. Assoc. Biomed. Phys.* **2015**, *31*, 584–595. [[CrossRef](#)]
26. Rothkamm, K.; Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)]
27. Yang, H.; Asaad, N.; Held, K.D. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* **2005**, *24*, 2096–2103. [[CrossRef](#)]
28. El-Nachef, L.; Al-Choboq, J.; Restier-Verlet, J.; Granzotto, A.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Bouchet, A.; Leblond, P.; Combemale, P.; et al. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7158. [[CrossRef](#)]
29. Le Reun, E.; Bodgi, L.; Granzotto, A.; Sonzogni, L.; Ferlazzo, M.L.; Al-Choboq, J.; El-Nachef, L.; Restier-Verlet, J.; Berthel, E.; Devic, C.; et al. Quantitative correlations between radiosensitivity biomarkers show that the ATM protein kinase is strongly involved in the radiotoxicities observed after radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10434. [[CrossRef](#)]
30. Szumiel, I.; Sochanowicz, B.; Buraczewska, I. Ca<sup>2+</sup> mobilization is related to the lethal effect of X-irradiation in L5178Y cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, *58*, 125–131. [[CrossRef](#)]
31. Silvestroni, L.; Fiorini, R.; Palleschi, S. Partition of the organochlorine insecticide lindane into the human sperm surface induces membrane depolarization and Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 691–698. [[CrossRef](#)]



32. Nair, A.; Pillai, V.S.; Chittela, R.K. Characterization of the N-terminal domain of Mre11 protein from rice (OsMre11) *Oryza sativa*. *Plant Sci.* **2021**, *302*, 110730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Giannakis, C.; Forbes, I.J.; Zalewski, P.D.  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}(2+)$ -dependent nuclease: Tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by  $\text{Zn}^{2+}$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *181*, 915–920. [[CrossRef](#)]
34. Foray, N.; Fertil, B.; Alsbeih, M.G.; Badie, C.; Chavaudra, N.; Iliakis, G.; Malaise, E.P. Dose-rate effect on radiation-induced DNA double-strand breaks in the human fibroblast HF19 cell line. *Int. J. Radiat. Biol.* **1996**, *69*, 241–249. [[CrossRef](#)]
35. Foray, N.; Priestley, A.; Alsbeih, G.; Badie, C.; Capulas, E.P.; Arlett, C.F.; Malaise, E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 271–283. [[PubMed](#)]
36. Granzotto, A.; Benadjaoud, M.A.; Vogin, G.; Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Bodgi, L.; Pereira, S.; Sonzogni, L.; Forcheron, F.; Viau, M.; et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2016**, *94*, 450–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Moulay Lakhdar, I.; Ferlazzo, M.L.; Al Choboq, J.; Berthel, E.; Sonzogni, L.; Devic, C.; Granzotto, A.; Thariat, J.; Foray, N. Fibroblasts from Retinoblastoma Patients Show Radiosensitivity Linked to Abnormal Localization of the ATM Protein. *Curr Eye Res.* **2020**, *46*, 546–557. [[CrossRef](#)]
38. Biston, M.C.; Joubert, A.; Adam, J.F.; Elleaume, H.; Bohic, S.; Charvet, A.M.; Esteve, F.; Foray, N.; Balosso, J. Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2317–2323. [[CrossRef](#)]
39. Corde, S.; Balosso, J.; Elleaume, H.; Renier, M.; Joubert, A.; Biston, M.C.; Adam, J.F.; Charvet, A.M.; Brochard, T.; Le Bas, J.F.; et al. Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3221–3227. [[PubMed](#)]
40. Brauer-Krisch, E.; Serduc, R.; Siegbahn, E.A.; Le Duc, G.; Prezado, Y.; Bravin, A.; Blattmann, H.; Laissue, J.A. Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue. *Mutat Res.* **2010**, *704*, 160–166. [[CrossRef](#)]
41. Arnaud, J.; Bellanger, J.; Bienvenu, F.; Chappuis, P.; Favier, A. Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann. Biol. Clin.* **1986**, *44*, 77–87.
42. Foray, N.; Marot, D.; Gabriel, A.; Randrianarison, V.; Carr, A.M.; Perricaudet, M.; Ashworth, A.; Jeggo, P. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2860–2871. [[CrossRef](#)]
43. Ferlazzo, M.; Berthel, E.; Granzotto, A.; Devic, C.; Sonzogni, L.; Bachelet, J.T.; Pereira, S.; Bourguignon, M.; Sarasin, A.; Mezzina, M.; et al. Some mutations in the xeroderma pigmentosum D gene may lead to moderate but significant radiosensitivity associated with a delayed radiation-induced ATM nuclear localization. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *96*, 394–410. [[CrossRef](#)]
44. Bodgi, L.; Foray, N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: Resolution of the linear-quadratic model. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 117–131. [[CrossRef](#)]
45. Devic, C.; Ferlazzo, M.L.; Berthel, E.; Foray, N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Hormesis Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleoshuttling of ATM Protein. *Dose-Response A Publ. Int. Hormesis Soc.* **2020**, *18*, 1559325820913784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Foray, N.; Bourguignon, M.; Hamada, N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res. Rev.* **2016**, *770*, 369–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bodgi, L.; Granzotto, A.; Devic, C.; Vogin, G.; Lesne, A.; Bottollier-Depois, J.F.; Victor, J.M.; Maalouf, M.; Fares, G.; Foray, N. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J. Theor. Biol.* **2013**, *333*, 135–145. [[CrossRef](#)]
48. Mirzoeva, O.K.; Petrini, J.H. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 281–288. [[CrossRef](#)]
49. Paull, T.T. 20 Years of Mre11 Biology: No End in Sight. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Rapp, A.; Greulich, K.O. After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4935–4945. [[CrossRef](#)]
51. Cali, B.; Ceolin, S.; Ceriani, F.; Bortolozzi, M.; Agnellini, A.H.; Zorzi, V.; Predonzani, A.; Bronte, V.; Molon, B.; Mammano, F. Critical role of gap junction communication, calcium and nitric oxide signaling in bystander responses to focal photodynamic injury. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10161–10174. [[CrossRef](#)]
52. Yan, J.; Khanna, K.K.; Lavin, M.F. Defective radiation signal transduction in ataxia-telangiectasia cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2000**, *76*, 1025–1035. [[PubMed](#)]
53. Berthel, E.; Foray, N.; Ferlazzo, M.L. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers* **2019**, *11*, 905. [[CrossRef](#)]
54. Burdak-Rothkamm, S.; Short, S.C.; Folkard, M.; Rothkamm, K.; Prise, K.M. ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 993–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Azzam, E.I.; de Toledo, S.M.; Little, J.B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* **2003**, *22*, 7050–7057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mothersill, C.; Seymour, C. Radiation-induced bystander effects: Are they good, bad or both? *Med. Confl. Surviv.* **2005**, *21*, 101–110. [[CrossRef](#)]

57. Gulston, M.; de Lara, C.; Jenner, T.; Davis, E.; O'Neill, P. Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1602–1609. [[CrossRef](#)]
58. Prise, K.M.; Folkard, M.; Kuosaite, V.; Tartier, L.; Zyuzikov, N.; Shao, C. What role for DNA damage and repair in the bystander response? *Mutat. Res.* **2006**, *597*, 1–4. [[CrossRef](#)]
59. Paull, T.T.; Gellert, M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell.* **1998**, *1*, 969–979. [[CrossRef](#)]
60. Morley, N.; Curnow, A.; Salter, L.; Campbell, S.; Gould, D. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B* **2003**, *72*, 55–60. [[CrossRef](#)]
61. Bootman, M.D.; Fearnley, C.; Smyrniak, I.; MacDonald, F.; Roderick, H.L. An update on nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2337–2350. [[CrossRef](#)]
62. Lyng, F.M.; Maguire, P.; McClean, B.; Seymour, C.; Mothersill, C. The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiat. Res.* **2006**, *165*, 400–409. [[CrossRef](#)]
63. Shao, C.; Lyng, F.M.; Folkard, M.; Prise, K.M. Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. *Radiat. Res.* **2006**, *166*, 479–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mothersill, C.; Seymour, C.B. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: Evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat. Res.* **1998**, *149*, 256–262. [[CrossRef](#)]
65. Ponnaiya, B.; Jenkins-Baker, G.; Bigelow, A.; Marino, S.; Geard, C.R. Detection of chromosomal instability in alpha-irradiated and bystander human fibroblasts. *Mutat. Res.* **2004**, *568*, 41–48. [[CrossRef](#)]
66. Lyng, F.M.; Maguire, P.; Kilmurray, N.; Mothersill, C.; Shao, C.; Folkard, M.; Prise, K.M. Apoptosis is initiated in human keratinocytes exposed to signalling factors from microbeam irradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **2006**, *82*, 393–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lyng, F.M.; Seymour, C.B.; Mothersill, C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 1223–1230. [[CrossRef](#)]
68. Fick, A. Über diffusion. *Ann. Der Phys.* **1855**, *170*, 59–86. [[CrossRef](#)]
69. Marples, B.; Collis, S.J. Low-dose hyper-radiosensitivity: Past, present, and future. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, *70*, 1310–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ryan, L.A.; Seymour, C.B.; Joiner, M.C.; Mothersill, C.E. Radiation-induced adaptive response is not seen in cell lines showing a bystander effect but is seen in lines showing HRS/IRR response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2009**, *85*, 87–95. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



ELSEVIER

Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



MISE AU POINT

## Risque individuel de cancer de sein et le triptyque « environnement, génétique et génomique » : une histoire de réparation de l'ADN ?

*Individual risk of breast cancer and the triptych 'environment, genetics and genomics': a story of DNA repair?*

Laura El-Nachef<sup>a</sup>, Eymeric Le Reun<sup>a</sup>,  
Michel Bourguignon<sup>a,b</sup>, Nicolas Foray<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> U1296 Inserm « Radiations : défense, santé, environnement », centre Léon-Bérard, 69008 Lyon, France

<sup>b</sup> Université Paris-Saclay-Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, 78035 Versailles, France

Reçu le 3 octobre 2022 ; accepté le 5 octobre 2022

### MOTS CLÉS

Cancer du sein ;  
Risque individuel ;  
Radiosensibilité ;  
ATM ;  
Réparation

**Résumé** Généralement que 90 à 95 % des cancers sont non-héréditaires. Toutefois, les mécanismes de transformation cellulaire qui initient le cancer restent encore méconnus et cette estimation reste donc mal documentée. Il apparaît aujourd'hui qu'à la fois des cassures de l'ADN mal réparées (produites par le phénomène d'hyper-recombinaison) et des défauts d'arrêts du cycle cellulaire sont requises pour que des cellules portant de nombreuses mutations s'amplifient et aboutissent à une masse critique de cellules transformées. Dans cet article, nous discutons du modèle du transit cytonucléaire de la protéine ATM qui pourrait expliquer cette double condition par la mutation de protéines-substrats qui pourraient ne pas être directement impliquées dans l'instabilité génomique et la réparation de l'ADN.

© 2022 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### KEYWORDS

Breast cancer;  
Individual risk;  
Radiosensitivity;  
ATM;  
Repair

**Abstract** It is currently considered that 90 to 95% of cancers are non-hereditary. However, the mechanisms of cellular transformation that initiate cancer are still unknown and this estimate therefore remains poorly documented. To date, it appears that both misrepaired DNA breaks (produced by the hyper-recombination phenomenon) and cell cycle arrest impairments are required for cells carrying numerous mutations to amplify and lead to a critical mass of transformed cells. In this article, we discussed about a model based on the nucleoshuttling

\* Auteur correspondant.

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

of the ATM protein that could explain this double requirement by the mutation of substrate proteins that might not be directly involved in genomic instability and DNA damage repair.  
© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

Quand on tente de faire le point de la littérature sur l'hérédité des cancers du sein, la plupart des revues convergent vers la même affirmation : environ 5 à 10 % des cancers du sein sont considérés comme héréditaires. Parmi les gènes de prédisposition génétique au cancer du sein, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHK2*, *ATM*, *BARD1* et *NF1* figurent en bonne place et leurs mutations (généralement hétérozygotes) représenteraient 75 % des cas supposés héréditaires [1,2]. Toutefois, quel crédit donner aux estimations actuelles alors que la grande majorité des chercheurs conviennent que tous les gènes de prédisposition au cancer ne sont pas encore connus ?

Réciproquement, les mêmes revues affirment que « 90 à 95 % des cancers du sein sont non-héréditaires, *peut-être liés à l'environnement* ? » [2,3]. Cette dernière partie de l'affirmation pose une autre question fondamentale : qu'est-ce qu'un environnement cancérigène ? Peut-il suffire à provoquer un cancer ? En d'autres termes, quelle est la véritable contribution de la prédisposition génétique et de l'effet de l'environnement dans la formation des cancers du sein ? L'environnement peut-il suffire sans prédisposition génétique pour provoquer un cancer ? Inversement, la prédisposition génétique, par nature endogène, peut-elle produire à elle-seule des cancers sans une action exogène ? Partons donc à la recherche des caractéristiques communes des cancers et tentons de donner quelques éléments de réponse à toutes ces questions.

## Cassures double-brin de l'ADN : un point commun à tous les cancers ?

Si on liste tous les syndromes de cancer héréditaires connus, quelle que soit la localisation de la tumeur, on s'aperçoit qu'ils ont en commun le phénomène d'hyper-recombinaison [4,5]. Alors que la vie biologique peut s'interpréter comme une lutte continuelle contre le stress oxydant, les cellules ayant survécu tout au long de l'évolution des espèces sont celles qui sont dotées des modes de réparation de cassures de l'ADN les plus efficaces. Parmi les dommages de l'ADN, ce sont les cassures double-brin, véritables « trous » dans l'ADN, qui sont les plus sévères [4,6].

Il existe deux modes de réparation des cassures double-brin dans les cellules de mammifères : la suture et la recombinaison.

### Réparation des cassures double-brin par suture

La suture, qui consiste à simplement rabouter les brins d'ADN cassés entre eux (en anglais : *non-homologous end-joining*, NHEJ). Il s'agit du mode prédominant chez les

mammifères et dans les cellules au repos (c'est-à-dire en quiescence, en phase G0/G1 du cycle). Si une ou plusieurs cassures double-brin ne sont pas suturées, elles peuvent entraîner la mort de la cellule. Dans les tissus, organes et individus, les cassures double-brin non suturées entraînent les phénomènes dits de radiosensibilité [4,6].

### Réparation des cassures double-brin par recombinaison

La recombinaison consiste à couper une séquence d'ADN au hasard, à l'insérer dans le trou formé par la cassure double-brin puis à lier les brins et resynthétiser à partir du brin coupé initialement la séquence manquante. La recombinaison est le mode de réparation primordial, hérité des bactéries, levures et dinosaures. Il s'effectue de préférence dans des cellules en croissance. Quand les cellules sont en mitose, la recombinaison s'effectue entre les brins d'ADN homologues, on parle de recombinaison homologue [7]. Mais celle-ci est généralement fidèle, donc, elle ne peut être à l'origine des cancers. À l'inverse, dans les cellules en quiescence (en phase G0/G1), les brins de l'ADN sont non-homologues : on parle de recombinaison non-homologue. La recombinaison est paradoxalement un mode de réparation qui casse l'ADN. Ainsi, alors que l'absence de recombinaison entraîne la mort de la cellule dès ses premières divisions (non-viabilité, mortalité à l'état embryonnaire), l'absence de contrôle de recombinaison non-homologue entraîne une accumulation considérable de cassures de l'ADN endogènes : c'est l'hyper-recombinaison [4,8]. Les cassures de l'ADN prises en charge par la recombinaison non-homologue sont plutôt mal réparées que non-réparées. Elles entraînent un processus de transformation cellulaire et de cancérisation. Après une irradiation qui induit des cassures de l'ADN, le phénomène d'hyper-recombinaison s'amplifie encore, augmentant ainsi le risque de cancer radioinduit (radiosusceptibilité) [4]. L'hyper-recombinaison spontanée, produisant des cassures de l'ADN, peut donc être considérée comme un stress « endogène ».

Tous les syndromes de cancer sont associés à une hyper-recombinaison : le risque de cancer entraîne donc également un risque de cancer radioinduit ou de cancer induit par tout agent cassant l'ADN, dès lors qu'il stimule l'hyper-recombinaison [4,5].

### Conditions nécessaires à la transformation cellulaire

Une cassure double-brin mal réparée dans une seule cellule suffit-elle pour provoquer un cancer ? Plusieurs cassures double-brin mal réparées dans une seule suffisent-elles pour provoquer un cancer ? Il semble que de tels événements dans une cellule isolée ne suffisent pas, d'après

la littérature, à produire une transformation durable [9]. À l'inverse, certains auteurs ont suggéré que plusieurs cassures double-brin mal réparées dans plusieurs cellules pourraient être à l'origine de processus cancérogènes [9]. Dans un tissu, composé de cellules à haute densité, la plupart des cellules de tissus de soutien sont dotées d'un système de contrôle du cycle cellulaire et de l'inhibition de contact qui assurent l'homéostasie et interdisent la dérive cellulaire. En l'absence d'un tel contrôle, des cellules peuvent proliférer librement. Ainsi, un des scénarios possibles de la cancérogénèse est que la prolifération cellulaire facilite l'augmentation du nombre de cellules portant des mutations. Dans le cas de cellules portant des cassures double-brin mal réparées, une absence de contrôle du cycle cellulaire pourrait ainsi provoquer la formation de colonies composées d'un grand nombre de cellules ayant des mutations [9].

La notion de transformation cellulaire à l'origine de la cancérisation pourrait donc impliquer à la fois des cassures double-brin mal réparées mais aussi une absence de contrôle du cycle cellulaire.

Cette double condition est en accord avec l'hypothèse déjà ancienne basée sur les trois étapes successives d'initiation, de promotion et de progression popularisées par Robert Weinberg pour expliquer la cancérogénèse [9]. À l'origine, l'étape d'initiation évoquait un événement moléculaire ou cellulaire, sa promotion pouvait s'exprimer à l'échelle cellulaire et la progression à l'échelle cellulaire et tissulaire. Si l'on se focalise sur les cassures mal réparées, puis sur l'amplification cellulaire qui produirait une masse critique de cellules mutées pour permettre l'extension du phénomène au tissu, l'événement d'initiation pourrait donc être l'hyper-recombinaison et les cassures mal réparées (échelle moléculaire). Des « court-circuits » successifs dans les arrêts du cycle (échelle cellulaire) pourraient constituer la phase de promotion. Un emballement rapide des processus à la fois cellulaire et tissulaire, conséquences des deux premières étapes pourrait constituer la phase de progression. Évidemment, cette hypothèse ne serait pas forcément spécifique au cancer du sein mais elle permettrait d'intégrer à la fois les stress endogènes (génétique) et exogènes (environnement) (Fig. 1).

## Vers un retour de l'ancienne notion d'allostérie ?

L'hypothèse développée dans le chapitre précédent, bien que logique, remet cependant en cause l'un des principes fondamentaux de la biologie : celui affirmant qu'à une protéine ne peut être associée qu'une seule fonction biologique. En fait, pour un individu donné, un stress environnemental (exogène) ne peut être entièrement responsable de la première phase d'initiation d'un cancer car les mutations génétiques qu'ils causent s'effectuent de façon aléatoire sur le génome et donc il ne peut endommager spécifiquement des gènes dont la fonction serait justement impliquée dans la gestion des cassures de l'ADN ou bien dans le contrôle du cycle cellulaire. Par ailleurs, si la dose de stress est trop forte, elle provoque la mort des cellules plutôt que leur transformation : ainsi, un stress environnemental ne peut donc être cancérogène qu'à faibles doses ou à des doses dites sublétales [5].

Si on considère que le *primum movens* du processus de cancérogénèse est une mutation héréditaire d'un gène

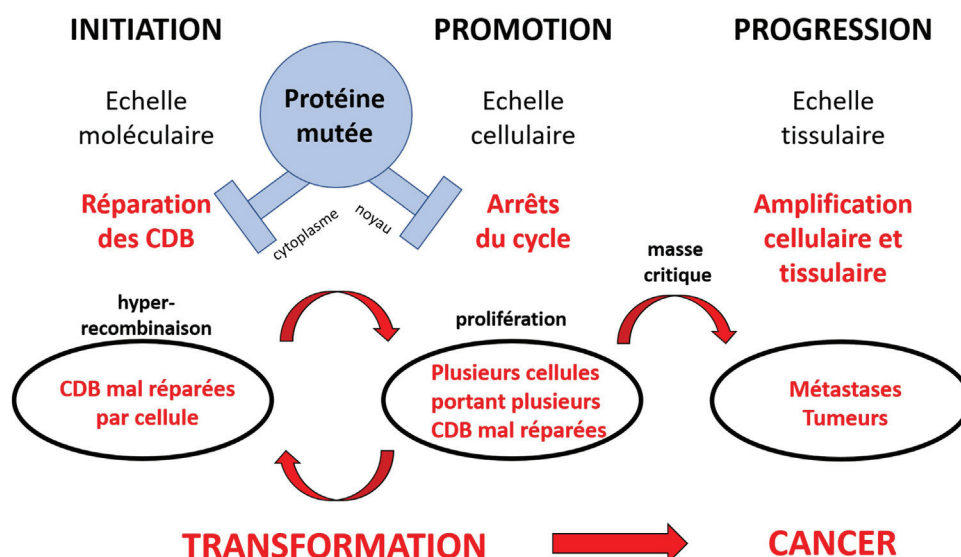
impliqué dans la gestion des cassures double-brin, l'étape d'initiation pourrait s'effectuer dès l'état embryonnaire et causer l'accumulation d'un certain nombre de cellules portant des cassures double-brin mal réparées. Au cours de la vie, un stress environnemental ne peut alors qu'amplifier le phénomène d'hyper-recombinaison et accélérer les étapes d'initiation, de promotion et de progression. Pourtant comme on l'a dit plus haut, une étape de promotion, c'est-à-dire d'amplification cellulaire est nécessaire pour obtenir un grand nombre de cellules filles portant les mêmes mutations originelles mais aussi d'autres nouvelles mutations. Mais la mutation du gène causant l'initiation ne peut pas en même temps causer un court-circuit des arrêts du cycle. En d'autres termes, le stress environnemental ne peut causer une mutation dans un gène qui serait justement impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire.

Ainsi, pour que l'hypothèse énoncée plus haut soit plausible, il faut donc considérer que la mutation du gène causée par l'hérédité soit responsable d'une mauvaise gestion des cassures double-brin et favorise en même temps une amplification cellulaire. Le dogme d'une protéine pour une fonction biologique doit donc être remis en cause.

Dans le cadre de la théorie de la cinétique enzymatique, l'équipe de Jacques Monod a fait l'hypothèse que la fixation d'un substrat protéique sur une protéine pouvait modifier la fixation d'un autre substrat à proximité et donc conditionner l'activité de certaines fonctions biologiques liées à chaque interaction protéique [10]. Par extension, ce principe, appelé principe d'allostérie, décrit la possibilité que, à partir d'une protéine qui interagirait avec de nombreux autres partenaires, plusieurs fonctions différentes seraient assurées ou non suivant la conformation des complexes multiprotéiques. Est-il possible d'évoquer ce principe pour expliquer que la mutation d'une protéine puisse influencer à la fois sur la réparation des cassures de l'ADN et les arrêts du cycle cellulaire ?

## Modèle du transit cytonucléaire de la protéine ATM ou modèle RIANs

Dans le cadre des recherches menées par l'U1296 Inserm (« Radiations : défense, santé, environnement »), l'accumulation de données radiobiologiques (collection Copernic) issues de patients radiosensibles soit traités par radiothérapie pour leur cancer, soit souffrant de syndrome génétique bien caractérisé a permis de développer un modèle mécanistique de la réponse individuelle aux radiations basée sur le transit cytonucléaire de la protéine ATM (*radiation-induced ATM nucleoshuttling*, RIANs en anglais) [11,12]. La protéine ATM est un acteur majeur de la réponse aux radiations ionisantes. Les mutations homozygotes d'ATM causent l'ataxie télangiectasie, syndrome génétique rare associé à la plus forte radiosensibilité connue chez l'homme et à de fortes prédispositions aux leucémies ou aux lymphomes [4]. Le modèle suivant a été proposé : 1) au repos, ou en l'absence de tout stress significatif, les protéines ATM sont présentes sous formes dimériques dans le cytoplasme ; 2) l'irradiation produit un stress oxydatif issu de la radiolyse de l'eau, induit des cassures de l'ADN et déclenche la monomérisation des formes cytoplasmiques de la protéine ATM ; 3) Les monomères d'ATM diffusent dans le noyau et assurent la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin par suture ; 4) Tout retard de transit conduit à des cassures double-brin non-reconnues qui



**Fig. 1.** Initiation, promotion et progression tumorale. Les syndromes de cancers sont tous associés à une forte hyper-recombinaison, responsables de cassures double-brin mal réparées. Ce processus pourrait faire partie de la phase d'initiation des cancers, au titre de la théorie de Weinberg [9]. Afin d'amplifier le nombre de cassures double-brin mal réparées et celui des cellules portant ces mutations, les arrêts du cycle cellulaire généralement provoqués par le stress et les cassures double-brin ne doivent pas être respectés. Ainsi, le phénomène de transformation cellulaire requiert à la fois le phénomène d'hyper-recombinaison et le « court-circuitage » des arrêts du cycle. CDB : cassure double-brin.

participent directement à l'effet létal sous la forme d'une radiosensibilité [11,12]. Ce retard s'accompagne également d'un risque élevé de cancer radioinduit (radiosusceptibilité) causé par les cassures double-brin mal réparées prises en charge par la recombinaison ou bien par le vieillissement accéléré (radiodégénérescence) causé par des cassures double-brin non réparées mais tolérées un temps par la cellule [4,5] (Fig. 2).

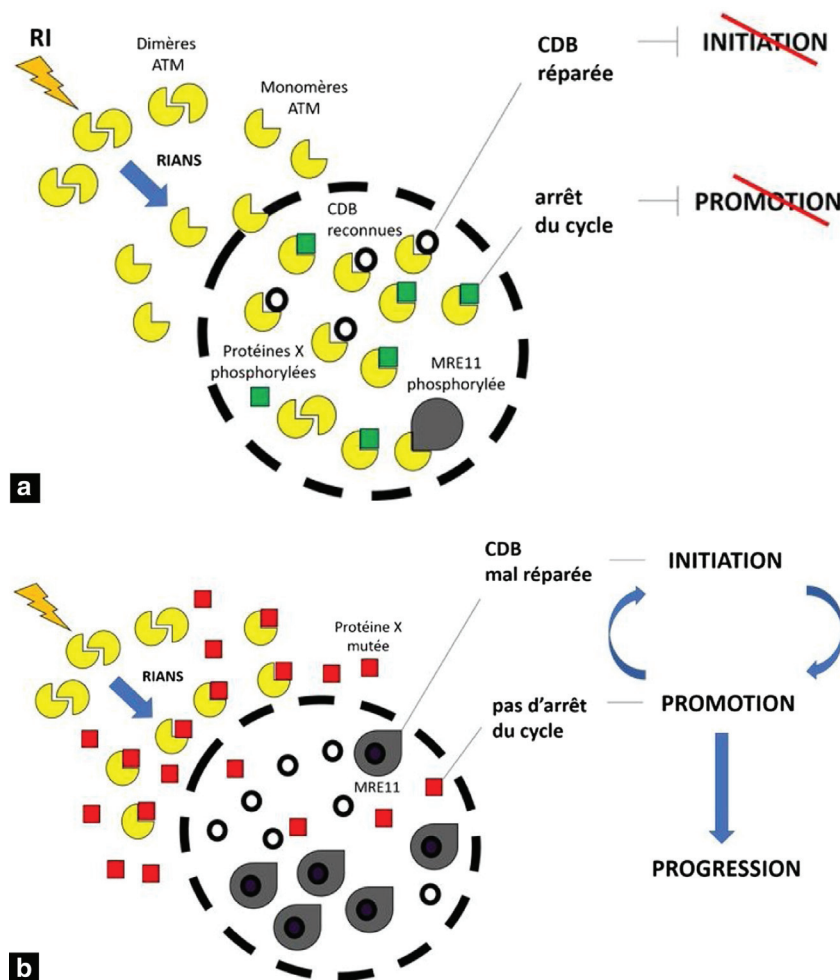
De façon intéressante, le retard de transit d'ATM pourrait ralentir également l'inhibition de la protéine MRE11. Cette protéine est une nucléase, c'est-à-dire qu'elle peut couper l'ADN. Une telle protéine peut donc « hacher » très rapidement l'ADN s'il n'est pas mis fin à son activité. MRE11 pourrait ainsi participer au processus d'hyper-recombinaison. À l'inverse, quand ATM interagit avec MRE11, l'activité nucléasique de MRE11 s'interrompt : en plus de stimuler la réparation des cassures double-brin par suture, les monomères d'ATM ayant diffusé dans le noyau peuvent également inhiber l'activité de MRE11 et participer à la réduction du phénomène d'hyper-recombinaison [5]. Il est fortement probable que ATM puisse inhiber l'activité d'autres nucléases participant à l'hyper-recombinaison. De recherches dans ce sens permettraient de mieux connaître ce phénomène si important pour la cancérogénèse (Fig. 2).

En parallèle du rôle de la protéine MRE11, une autre protéine se distingue dans le modèle RIANS, la protéine CHK2, qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase de quiescence. En fait, l'interaction entre les monomères d'ATM et CHK2 bloque les cellules en G0/G1. À l'inverse, en l'absence de monomères ATM disponibles, les protéines CHK2 libres et non phosphorylées lèvent les arrêts du cycle et favorisent l'amplification cellulaire [13]. Ainsi, en plus de l'hyper-recombinaison, tout retard dans le transit cytonucléaire d'ATM permet l'amplification cellulaire et donc la multiplication de cellules portant des cassures double-brin mal réparées [5] (Fig. 2).

Le retard de transit cytonucléaire de la protéine ATM peut être causé par la formation de complexes multiprotéines cytoplasmiques entre ATM et des protéines appelées X dont

la mutation est la cause du syndrome génétique considéré. La radiosensibilité de nombreuses maladies génétiques a été caractérisée par le modèle RIANS [11,12]. Les protéines X obéissent à deux conditions : 1) ce sont des substrats d'ATM, c'est-à-dire des protéines qui s'associent spécifiquement à la protéine ATM ; 2) leurs mutations hétérozygotes conduisent à leur surexpression dans le cytoplasme. Ainsi, en « captant » les monomères d'ATM dans leur transit du cytoplasme au noyau, les protéines X forment des complexes ATM-X qui ralentissent voire interdisent l'entrée de monomères d'ATM dans le noyau (Fig. 2).

Depuis 2014, nous avons identifié une vingtaine de protéines X dont les mutations hétérozygotes causent des syndromes génétiques associés à une radiosensibilité, radiosusceptibilité ou radiodégénérescence [11]. En particulier, les protéines codées par les gènes de prédisposition au cancer du sein citées en début d'article sont des substrats d'ATM et sont localisées au moins dans le cytoplasme. Prenons l'exemple de la protéine BRCA1 : elle porte plus d'une dizaine de sites de phosphorylation d'ATM, signes d'une très grande affinité avec la protéine ATM et montre également des formes cytoplasmiques, notamment quand elles sont mutées [14]. Par ailleurs, les mutations hétérozygotes de BRCA1 sont généralement associées à leur surexpression dans le cytoplasme [15]. En effet, même si cela peut paraître contre-intuitif, les formes mutées pour BRCA1 sont plus abondantes dans les cellules de patientes porteuses de mutations hétérozygotes que les formes sauvages dans les cellules d'individus non-porteurs [16]. Ainsi très abondants dans le cytoplasme, les complexes ATM-BRCA1 limitent l'arrivée des monomères d'ATM dans le noyau, ce qui augmente le nombre de cassures double-brin non prises en charge par la suture, celui des cassures produites par l'hyper-recombinaison via la protéine MRE11 et favorise également l'amplification cellulaire via la protéine CHK2. Ainsi, dans le cadre du modèle RIANS à travers ces multiples substrats X, la protéine ATM peut à la fois être impliquée dans la production de mutations et leur propagation dans un grand nombre de cellules. À ce titre, n'importe quelle protéine X



**Fig. 2.** Modèle du transit cytonucléaire de la protéine ATM (*radiation-induced ATM nucleoshuttling* [RIANS]) et processus de transformation cellulaire. a. Après un stress (par exemple : irradiation), les dimères de la protéine ATM se monomérisent et diffusent dans le noyau. Les monomères d’ATM contribuent à phosphoryler les histones H2AX sur le site des cassures double-brin, ce qui initie leur reconnaissance par le mode de réparation par suture (ligature d’extrémités non homologues) ainsi que les protéines X qui contribuent à arrêter le cycle cellulaire. Ce scénario décrit des cellules radiorésistantes, non prédisposées à la transformation. b. Dans le cas de mutations hétérozygotes des protéines X, celles-ci sont surexprimées dans le cytoplasme. Ces protéines X mutées se lient aux monomères d’ATM et limitent le nombre de monomères ATM libres de diffuser dans le noyau. Ainsi, dans le noyau, les cassures double-brin ne sont pas reconnues par suture et peuvent être prises en charge par le mode de recombinaison non-homologue dépendant de MRE11. Les cassures double-brin sont alors mal réparées. En parallèle, les protéines X ne sont pas phosphorylées par ATM et les arrêts du cycle ne sont alors pas assurés. Les cellules portant ainsi des mutations peuvent alors s’amplifier et favoriser le processus de transformation. CDB : cassure double-brin ; RI : radiations ionisantes ; RIANS : *radiation-induced ATM nucleoshuttling* (transit cytonucléaire de la protéine ATM).

pourrait conduire à un retard du transit d’ATM et une forte prédisposition au cancer [5,11].

### Modèle RIANS et cancer du sein

Comme on l’a dit plus haut, le retard du transit d’ATM peut également conduire à une radiodégénérescence et un vieillissement accéléré. Généralement, la prédisposition au cancer et le vieillissement (notamment les neurodégénérescences) sont des processus antagonistes car les cassures double-brin ne peuvent pas être à la fois mal réparées et non-réparées et tolérées. Récemment, nous avons montré que ce qui distingue une prédisposition au cancer et au cancer radioinduit (radiosusceptibilité) d’une radiodégénérescence est la localisation des protéines X dans le cytoplasme. En effet, la plupart des maladies de vieillissement accéléré ou de neurodégénérescence se distingue par des protéines X qui restent proches de la membrane

nucléaire : ainsi, les complexes ATM-X bloquent très efficacement tout transit d’ATM et peu de monomères deviennent nucléaires : les cassures double-brin sont plutôt non reconnues par suture et non-réparées [5]. Mais tout comme la sénescence, l’accumulation des cassures double-brin non réparées est très long. À l’inverse, pour les prédispositions au cancer, les protéines X sont généralement distribuées aléatoirement dans le cytoplasme ce qui permet à un flux minimal d’ATM de passer dans le noyau et ainsi de limiter l’activité nucléasique de MRE11 et l’hyper-recombinaison. Par ailleurs, si cette activité génératrice des cassures de l’ADN n’était pas limitée, elle conduirait à la létalité cellulaire et non à la transformation cellulaire [5]. Ainsi, toute protéine X qui serait distribuée dans le cytoplasme pourrait théoriquement initier et promouvoir un processus de transformation cellulaire : un grand nombre de protéines, même sans activité directe dans la gestion des dommages de l’ADN ou du cycle seraient dans ce cas. De nombreuses mutations héréditaires pourraient donc être responsables de

fortes prédispositions au cancer sans pour autant concerner directement la réponse au stress ou les mécanismes de carcinogénèse [5].

Le modèle mécanistique du transit d'ATM décrit reste valable pour tous les types de cancers. Quels aspects seraient spécifiques des cancers héréditaires du sein ?

L'expression de certaines protéines peut être spécifique d'un tissu donné. C'est le cas notamment des protéines BRCA1 et BRCA2 qui sont principalement exprimées dans le sein et dans les gonades [17]. À ce stade, on peut même parler de protéines X tissulaires par opposition aux protéines X syndromiques qui seraient spécifiques à chaque maladie génétique (par exemple : NF1 pour la neurofibromatose de type I) [18].

L'environnement inducteur de stress exogène peut être également spécifique à un tissu donné. Pour le sein, la présence de calcium sous forme ionique ou d'hormones peut produire un stress oxydatif spécifique qui amplifie et accélère le processus de transformation cellulaire [19].

Ainsi, des protéines X mutées pourraient avoir une double fonction :

- particulièrement surexprimées dans le sein, elles pourraient servir de substrats d'ATM dans le cytoplasme et limiter son transit et favoriser la mauvaise réparation des cassures double-brin ;
- non phosphorylées dans le noyau par ATM, elles pourraient ne pas assurer les arrêts du cycle et donc favoriser la prolifération.

## Conclusion

Grâce au modèle RIANS, on voit aujourd'hui que les mutations hétérozygotes de protéines qui n'ont pas d'implication directe dans la gestion des cassures de l'ADN ou du cycle cellulaire peuvent néanmoins être impliquées dans un processus cancérogène. En parallèle, un environnement favorable, qu'il soit spécifique et tissulaire ou cassant et exogène sera un facteur accélérant le processus cancérogène. Particulièrement, l'exposition aux radiations ionisantes apparaît comme un facteur de risque significatif plus particulièrement dans un contexte de susceptibilité individuelle. C'est dans ce sens que l'Autorité de sûreté nucléaire recommande, à travers son décret de 2019, de tenir compte de la susceptibilité individuelle avant tout radiodiagnostic [20]. Ainsi, il y aurait probablement plus de cancers du sein qui seraient liés à une composante génétique que les 5 à 10 % avancés dans la littérature. Notons que les études épidémiologiques n'ont ciblé que des gènes impliqués dans la gestion des cassures double-brin ou du cycle cellulaire. On comprend bien aussi que de nombreuses études devront documenter et consolider ces hypothèses mais, mieux évaluer le facteur individuel apparaît désormais comme un véritable enjeu sociétal, scientifique, clinique et économique.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Commissariat général à l'investissement pour son soutien (projet Indira).

## Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs n'ont pas déclaré leurs éventuels liens d'intérêts.

## Références

- [1] Cohen-Haguenaer O. Prédisposition héréditaire au cancer du sein (1)—Génétique. *Med Sci (Paris)* 2019;35(2):138–51.
- [2] Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(23):2339–47.
- [3] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet* 2021;397(10286):1750–69.
- [4] Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2016;770:369–86.
- [5] El-Nachef L, Al-Chobq J, Restier-Verlet J, Granzotto A, Berthel É, Sonzogni L, et al. Human radiosensitivity and radiosusceptibility: what are the differences? *Int J Mol Sci* 2021;22:7158.
- [6] Berthel É, Ferlazzo M, Devic C, Bourguignon M, Foray N. What does the history of research on the repair of DNA double-strand breaks tell us?—A comprehensive review of human radiosensitivity. *Int J Mol Sci* 2019;20:5339.
- [7] Dudás A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 2004;566(2):131–67.
- [8] Stary A. La recombinaison illégitime dans les cellules de mammifères. *Med Sci (Paris)* 1994;10:986–94.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
- [10] Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 1965;12:88–118.
- [11] Berthel É, Foray N, Ferlazzo ML. The nucleoshuttling of the ATM protein: a unified model to describe the individual response to high- and low-dose of radiation? *Cancers* 2019;11(7):905.
- [12] Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, et al. Influence of nucleoshuttling of the ATM protein in the healthy tissues response to radiation therapy: toward a molecular classification of human radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016;94(3):450–60.
- [13] Smith HL, Southgate H, Tweddle DA, Curtin NJ. DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Rev Mol Med* 2020;22:e2.
- [14] Dizin E, Ray H, Suau F, Voeltzel T, Dalla Venezia N. Caspase-dependent BRCA1 cleavage facilitates chemotherapy-induced apoptosis. *Apoptosis* 2008;13(2):237–46.
- [15] De Potter CR, Coene ED, Schelfhout VR. Localization of BRCA1 protein at the cellular level. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3(4):423–9.
- [16] Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* 1999;18(51):7334–42.
- [17] Hodgson A, Turashvili G. Pathology of hereditary breast and ovarian cancer. *Front Oncol* 2020;10:531790.
- [18] Combemale P, Sonzogni L, Devic C, Bencokova Z, Ferlazzo ML, Granzotto A, et al. Individual response to radiation of individuals with neurofibromatosis type I: role of the ATM protein and influence of statins and bisphosphonates. *Mol Neurobiol* 2022;59(1):556–73.
- [19] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell* 2020;38(2):167–97.
- [20] ASN. Arrêté du 8 février 2019 portant homologation de la décision no 2019-DC-0660 de l'Autorité de sûreté nucléaire du 15 janvier 2019 fixant les obligations d'assurance de la qualité en imagerie médicale mettant en œuvre des rayonnements ionisants. *JORF* 2019.



**Le Reun E, Chargari C. Curiethérapie à bas débit de dose pulsé (PDR) pour le traitement conservateur des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques de l'enfant. (461)**

### **But de l'étude**

Les rhabdomyosarcomes sont les tumeurs des tissus mous les plus fréquentes chez les enfants et les adolescents. Le tractus génito-urinaire concerne 20% des cas de RMS, incluant les tumeurs de la vessie et/ou de la prostate. La stratégie thérapeutique la plus fréquemment proposée pour les rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques repose sur une chimiothérapie initiale associée à une chirurgie conservatrice et/ou une radiothérapie externe (RTE). S'agissant de tumeurs de bon pronostic, chez des patients présentant une espérance de vie élevée, l'un des enjeux majeurs du traitement est de limiter les séquelles gastro-intestinales et génito-urinaires liées aux radiations. À ce titre, la curiethérapie à bas débit de dose pulsé (PDR) apparaît aujourd'hui comme une alternative à la RTE, permettant également un traitement personnalisé, guidé par imagerie. Nous rapportons ici la plus grande série de curiethérapie PDR guidée par l'image pour la prise en charge multimodale des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques pédiatriques, et la première à en examiner les facteurs dosimétriques et la corrélation potentielle avec la toxicité radique.

### **Matériel et méthodes**

Nous avons recueilli les paramètres cliniques et dosimétriques des enfants atteints de rhabdomyosarcome vésical et/ou prostatique, traités par curiethérapie à Gustave Roussy entre 2014 et 2020. Après implantation peropératoire des cathéters de curiethérapie, les patients ont réalisé une tomodensitométrie et une IRM, sur la base desquelles étaient contourés le CTV (prostate, col vésical et résidu tumoral) et les organes à risque (rectum, vessie, urètre, uretères et testicules). Pour les patients présentant une tumeur localisée, la dose prescrite était de 60.06 Gy en 143 pulses horaires de 0.42 Gy. En cas d'envahissement ganglionnaire, la dose prescrite était de 20 Gy en curiethérapie, complétée par une radiothérapie externe au niveau locorégional. Tout résidu macroscopique recevait au moins 50 Gy et tout résidu microscopique au moins 45 Gy. Le traitement PDR a été délivré à l'aide de sources d'Iridium-192.

### **Résultats et analyse statistique**

Nous avons identifié 75 patients, majoritairement des garçons (80%) avec un âge médian de 29 mois. Le nombre de localisations vésicales et prostatiques étaient semblables (n = 38 et n = 35). Le suivi médian était d'environ 3 ans, la survie sans progression de 96 %. La D90% au CTV variait de 38.4 à 77.6 Gy. La vessie présentait une D1cc médiane de 261 Gy et une D50% médiane de 38.6 Gy. Pour l'urètre, les D0.01cc et D0.5cc médianes étaient de 93.3 Gy et 12.1 Gy respectivement. La dose maximale (D0.01cc) aux uretères a atteint 31.5 Gy. Le rectum a reçu des doses médianes de : D0.01cc = 78.3 Gy, D0.5cc = 55.1 Gy et D1cc = 49 Gy. Environ un tiers des patients ont développé une toxicité urinaire (30.7%) de grade 2 ou 3, et 9.3% ont souffert de rectite de grade 2 ou 3. Plus de la moitié des enfants ne présentaient aucune toxicité de grade 2 ou plus (56%).

### **Conclusion**

La curiethérapie PDR apparaît comme un outil pertinent dans la prise en charge multimodale des rhabdomyosarcomes vésico-prostatiques de l'enfant, avec un rapport survie/toxicité satisfaisant. L'emploi systématique de l'imagerie comme support au contournage pourrait expliquer le faible taux de toxicité observé dans notre cohorte.

# SERMENT DU DOCTEUR

*En application de l'article L612-7 du code de l'éducation, les établissements d'enseignement supérieur et de recherche mettent en œuvre, dans le cadre des soutenances de leurs doctorantes et doctorants, une prestation de serment d'intégrité scientifique. Cette disposition est inscrite dans l'article 19bis de l'arrêté de la formation doctorale (évolution introduite par l'arrêté du 26 Août 2022 modifiant l'arrêté du 25 Mai 2016).*

« En présence de mes pairs.

« Parvenu à l'issue de mon doctorat en Radiobiologie, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »

\*\*\*\*\*

« In the presence of my peers.

« With the completion of my doctorate in Radiation Biology, in my quest for knowledge, I have carried out demanding research, demonstrated intellectual rigour, ethical reflection, and respect for the principles of research integrity. As I pursue my professional career, whatever my chosen field, I pledge, to the greatest of my ability, to continue to maintain integrity in my relationship to knowledge, in my methods and in my results. »